

Abstracts

Wissenschaftliches Hauptprogramm (Teil 1)



Gesellschaft für Dermopharmazie

Vorsitzende der Vortragsreihe

„Dermopharmazeutische Technologie und Biopharmazie“:

Prof. Dr. Rolf Daniels, Tübingen

Prof. Dr. Christel Müller-Goymann, Braunschweig

Vorsitzende der Vortragsreihe „Dermatopharmakologie“:

Prof. Dr. Hans F. Merk, Aachen

Prof. Dr. Monika Schäfer-Korting, Berlin

Wissenschaftliches Hauptprogramm, Teil 1:
Vortragsreihe „Dermopharmazeutische Technologie und Biopharmazie“

Charakterisierung und Stabilitätsprüfung von Nanoemulsionen mittels dynamischer Laserlichtstreuung und Elektronenmikros- kopie

*Prof. Dr. Claudia Valenta,
Departement für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie,
Universität Wien*

Nanoemulsionen sind kolloidale Mehrkomponentensysteme mit Teilchengrößen im Submikron-Bereich, die zur dermalen Applikation von lipophilen Arzneistoffen verwendet werden. Der verhältnismäßig geringe Gehalt an Tensiden macht diese Systeme besonders hautfreundlich und daher geeignet für die dermale und kosmetische Anwendung, die Formulierungen sind jedoch nur metastabil [1, 2, 3]. Die initiale Charakterisierung der Tröpfchengrößenverteilung sowie die fortlaufende Überprüfung der physikalischen Stabilität von Nanoemulsionen erfolgt gängigerweise durch Dynamische Lichtstreuung (DLS). Die Vor- und Nachteile dieser Technik bei Stabilitätsmessungen über einen längeren Zeitraum werden anhand von Beispielen diskutiert. Der Einfluss verschiedener Additiva auf die physikalische Stabilität des Emulsions-Systems kann mit dieser Technik gezeigt werden. Die besten Ergebnisse liefert die DLS-Technik bei monodispersen Proben im Submikron-Bereich. Da Nanoemulsionen jedoch auch zusätzliche Strukturen wie Tensidaggregate, liposomale Vesikel oder lamellare Strukturen enthalten können, welche die Messergebnisse beeinflussen, sind diese Ergebnisse nicht für alle Proben repräsentativ. Daher sind weitere Techniken notwendig, um die genaue Morphologie von Nanoemulsionen zu untersuchen und die DLS-Daten zu verifizieren. Eine der zuverlässigsten Techniken für diese Aufgabe ist die Transmissions-Elektronen-Mikroskopie nach Kryo-Preparation der flüssigen Nanoemulsionen (Kryo-TEM) [4]. Mit dieser Technik erhält man Strukturbilder der Nanoemulsionen in ihrem nativen, hydrierten Zustand sowie Informationen über die Homogenität der Probe. Auch die Aggregations-Tendenz der Emulsionstropfen kommt im Zuge solcher Versuche zum Vorschein. Eine Analyse von Nanoemulsionen ohne Kryo-Preparation ist möglich, da bei ausreichend guter Stabilisierung des Grenzflächenfilmes die flachen, vertrockneten Tensid-Hüllen der Öltröpfchen mitunter trotz des Hochvakuums innerhalb des Mikroskops erhalten bleiben. Hierdurch sind zwar Rückschlüsse über die Stabilität des Grenzflächenfilms der Öltröpfchen möglich, jedoch nicht über die gesamte Morphologie des Systems im nativen Zustand.

Literatur:

[1] S. Höller, A. Sperger, C.Valenta, (2009) Lecithin based nanoemulsions: a comparative study of the influence of non ionic surfactants and the cationic phytosphingosine on physicochemical behaviour and skin permeation, *Int. J. Pharm.* 370, 181-186



[2] V. Klang, N. Matsko, A.-M. Zimmermann, E. Vojnikovic, C. Valenta, (2010) Enhancement of stability and skin permeation by sucrostearate and cyclodextrins in progesterone nanoemulsions, *Int. J. Pharm.* 393, 152-160

[3] V. Klang, N. Matsko, K. Raupach, N. El-Hagin, C. Valenta, (2011) Development of sucrose-based nanoemulsions and optimisation through Gamma-cyclodextrin, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 79, 58-67.

[4] V. Klang, N. Matsko, C. Valenta, F. Hofer, Electron microscopy of nanoemulsions: an essential tool for characterisation and stability assesement, *Micron* 43, 85-103 (2012)



Wissenschaftliches Hauptprogramm, Teil 1:
Vortragsreihe „Dermopharmazeutische Technologie und Biopharmazie“

Hautpenetration von Carboxyfluorescein und Temporfin aus lipidreichen vesikulären Trägersystemen

Prof. Dr. Alfred Fahr
unter Mitarbeit von Xiangli Liu und Ming Chen,
Institut für Pharmazie, Pharmazeutische Technologie,
Friedrich-Schiller-Universität, Jena

Es existiert eine Vielzahl von Untersuchungen über hydrophile und lipophile Arzneistoffe, deren Hautpenetration durch verschiedenste lipidreiche vesikuläre Systeme verbessert werden soll.

Allerdings wurden wesentlich seltener Studien publiziert, die einen direkten Vergleich der Penetrationsverbesserung der verschiedenen lipidreichen vesikulären Systeme auf bestimmte hydrophile und lipophile Arzneistoffe erlauben würden.

Hier setzt unsere Untersuchung an, in der wir die Penetrationsverstärkungseffekte von konventionellen (Liposomen), sehr flexiblen (Invasomen) und stark ethanolhaltigen (Ethosomen) Trägersystemen am Beispiel des Carboxyfluorescein als sehr hydrophilem Modellarzneistoff und Temporfin als sehr lipophilem Arzneistoff untersuchten. Beide Substanzen weisen eine hohe Fluoreszenz auf, die zum Nachweis benutzt wurde. Für die Penetration wurde exzisierte Humanhaut als Hautmodell ausgewählt und die Penetration mittels der bekannten Franz-Zelle durchgeführt. Die Trägersysteme wurden unter anderem mittels Größenbestimmung, Zetapotential und ultramikroskopischer Darstellung charakterisiert.

Es zeigte sich vor allem für den hydrophilen Modellarzneistoff eine deutliche Penetrationsverbesserung mittels der lipidhaltigen Systeme, während die Penetrationsverbesserung des lipophilen Arzneistoffes deutlich geringer war. Unter den zahlreichen Parametern, die außerdem die Penetration bestimmen können, fanden wir auch die Applikationsart (finite vs. Infinite dose) von großem Einfluss auf die Penetration.

Ref.: M. Chen, X. Liu & A. Fahr: Skin penetration and deposition of carboxyfluorescein and temporfin from different lipid vesicular systems: In vitro study with finite and infinite dosage application; *Int. J. Pharm.*408, 223-234 (2011)



Wissenschaftliches Hauptprogramm, Teil 1:
Vortragsreihe „Dermopharmazeutische Technologie und Biopharmazie“

Multiple Emulsionen als Trägersysteme zum Schutz von dermal appliziertem DNAzym

*Dipl.-Ing. Dipl.-Ing. Thomas M. Schmidts,
Technische Hochschule Mittelhessen,
AG Biopharmazeutische Technologie, Gießen*

Atopische Dermatitis ist eine chronisch-entzündliche Erkrankung der Haut, charakterisiert durch trockene, juckende und schuppige Ekzeme. Mit der Erkrankung geht eine gestörte Barrierefunktion der Haut einher, woraus wiederum als Folge häufig eine mikrobielle Überbesiedelung resultiert. Die Prävalenz der Erkrankung liegt in Industriestaaten bei 5 – 20 % der Kinder und 1 – 3 % der Erwachsenen. Bislang sind nur symptomatische Therapieansätze wie eine anti-entzündliche Therapie mittels Corticosteroiden oder Immunsuppressiva (Tacrolimus, Pimecrolimus) verfügbar. Die akute Phase der atopischen Dermatitis geht mit einer Überexpression von Th2-Zellen und einer daraus resultierenden Ausschüttung von Interleukinen (zum Beispiel: IL-4, IL-5, IL-13) einher. Ein entscheidender Trigger für die Expression und Differenzierung von Th2-Zellen stellt der Transkriptionsfaktor GATA-3 dar. Durch ein gezieltes Schneiden der mRNA des Transkriptionsfaktors GATA-3 kann die Expression dieses Triggers ausgeschaltet werden und die Erkrankung kausal „an der Wurzel“ therapiert werden. DNAzyme als eine Klasse von Antisense-Molekülen sind in der Lage, die mRNA von GATA-3 katalytisch zu spalten und somit die Expression des Proteins zu unterbinden. DNAzyme sind empfindlich gegenüber im und auf dem Körper ubiquitär vorkommenden DNasen. Gerade auf der Haut exprimieren zahlreiche Mikroorganismen als Abwehrstrategie große Mengen an DNasen. Um die DNAzyme vor diesen zu schützen, können Modifikationen über die gesamte Sequenz verteilt oder endständig platziert werden. Zur Stabilisierung werden zum Beispiel anstelle des Phosphatrückgrades Phosphothioate verwendet. Nachteil dieser Methode ist, dass diese Modifikationen zu einer eingeschränkten Aktivität des Moleküls führen. Eine Methylierung wiederum führt zu einer unerwünschten Erhöhung der Aktivität. Um das im Rahmen unseres Projektes untersuchte DNAzym (DNAzym hgd 40) vor Abbau durch Exonukleasen zu schützen, wurde am 3'-Ende ein inverses Thymidin eingebaut. Das so entstandene artifizielle 5'-Ende impliziert einen Schutz vor Abbau durch Exonukleasen. Ohne das Molekül weiter chemisch zu modifizieren, bieten sich galenische Schutzstrategien an.

Als Anforderungen an die galenische Entwicklung für den Wirkstoff DNAzym wurden definiert: Verwendung von zugelassenen Hilfsstoffen, Herstellung mit konventionellen Technologien, Schutzfunktion vor DNasen, gute Penetration in die Epidermis, hohe Lagerstabilität der Galenik und des Wirkstoffes sowie pflegende Eigenschaften. Multiple Emulsionen wurden als Kandidat mit der größten Schnittmenge an Eigenschaften favorisiert. Zum Vergleich wurden des Weiteren eine Mikroemulsion, eine Submikronemulsion und konventionelle Wasser-in-Öl-Emulsionen in die Versuchsreihe aufgenommen. Multiple Emulsionen sind Wasser-in-Öl-in-Wasser-Emulsionen,



in deren innerer Wasserphase Wirkstoffe eingeschlossen werden können. Aufgrund der zwei Grenzflächen, welche durch unterschiedliche Emulgatoren abgeschirmt werden müssen und des zweistufigen Herstellungsverfahrens ist die Entwicklung stabiler Multipler Emulsionen aufwendig. Zunächst wurden mit den entwickelten Formulierungen Stabilitätsuntersuchungen und Wirkstoffwiederfindung ICH-konform durchgeführt. Alle Formulierungen können hinsichtlich ihrer physikochemischen Parameter wie pH-Wert, Tropfengröße und Viskosität über den untersuchten Zeitraum als stabil angesehen werden. Betrachtet man allerdings die Wirkstoffwiederfindung, so liegt nach 3 Monaten die Konzentration von DNAzym nur noch bei der Multiplen Emulsion innerhalb der erlaubten Spezifikation von 100 % +/- 5 % (ICH-Guideline). Bei Inkubationsversuchen mit hautidentischen DNasen konnte gezeigt werden, dass Multiple Emulsionen innerhalb des untersuchten Zeitraums über 50 % des eingearbeiteten Wirkstoffs effektiv vor einem DNase Abbau schützen – im Gegensatz zu den Trägersystemen ohne Schutzfunktion. Bei Mikroemulsion und Submikronemulsion wurden 100 % des Wirkstoffs abgebaut. Zur Untersuchung der Pharmakokinetik wurden Freisetzungsversuche an Cellulosemembranen, Finite-dose- und Infinite-dose-Penetrationsversuche mittels Franzzellen und Schweineohrenhaut, angelehnt an die entsprechende GD-Richtlinie, durchgeführt. Die Systeme Mikroemulsion und Submikronemulsion überzeugten mit einer im Vergleich zu der Multiplen Emulsion und der W/O-Emulsion stärkeren Freisetzung und höheren Hautpenetration innerhalb der Infinite-dose-Versuche (500 µL auf 1,76 cm² Hautfläche) nach 24 Stunden. Die Emulsionen verbleiben bei diesem Versuchsaufbau auf der Haut intakt und setzen den Wirkstoff nicht frei. Gerade Multiple Emulsionen müssen für die Freisetzung der inneren Wasserphase und somit des Wirkstoffs mit der Zeit durch Verdunstung oder durch Scherkräfte brechen. Dieses Phänomen bestätigte sich innerhalb der Finite-dose-Versuche (20 µL über 24 Stunden auf 1,76 cm² Hautfläche, leicht einmassiert): Hier zeigte die Multiple Emulsion im Gegensatz zur Submikronemulsion eine dreifach höhere Penetration des Wirkstoffs DNAzyme in die Haut. Unter realistischen Applikationsbedingungen vermag die Multiple Emulsion über eine gewisse Zeit den Wirkstoff zwar zu schützen, gleichzeitig gibt sie ihn aber durch partielles „Ausbluten“ der inneren Wirkstofflösung an die Haut ab. Bei der Submikronemulsion scheint der Wirkstoff dagegen nicht in größeren Mengen zu penetrieren, da er vorab durch die hauteigenen DNasen abgebaut wird. Des Weiteren zeigten FACS-Analysen der Hautlysate der Finite-dose-Versuche eine etwa 4-fach höhere Aufnahme des Wirkstoffs in epidermale Zellen durch die multiple Emulsion im Vergleich zu der Submicronemulsion.

Die durchweg positiven Ergebnisse unserer Versuche sowie parallele Untersuchungen des gleichen GATA-3 spezifischen DNAzyms zur Therapie des Asthma Bronchiale (derzeit in klinischer Phase-1-Studie, Sterna Biologicals) lassen eine kausale, dermale Therapie der Atopischen Dermatitis mit Antisense Oligonukleotiden, geschützt in multiplen Emulsionen, in greifbare Nähe rücken.

Ausgewählte Literatur zum Thema:

T. Schmidts, D. Dobler, S. von den Hoff, H. Garn, F. Runkel. Protective Effect of Drug Delivery Systems against the Enzymatic Degradation of Dermal Applied DNAzyme. International Journal of Pharmaceutics. 2011 May 30; 410 (1-2):75-82

T. Schmidts, D. Dobler, P. Schlupp, C. Nissing, H. Garn, F. Runkel. Development of multiple W/O/W emulsions as dermal carrier system for oligonucleotides: Effect of additives on emulsion stability.



International Journal of Pharmaceutics 398 (2010) 107–113

T. Schmidts, D. Dobler, C. Nissing, F. Runkel. Influence of hydrophilic surfactants on the properties of multiple W/O/W emulsions. Journal of Colloid and Interface Science 338 (2009) 184–192

P. J. Barnes. Role of GATA-3 in Allergic Diseases. Current Molecular Medicine 2008, 8, 330-334

J. Kurreck. Antisense technologies - Improvement through novel chemical modifications. Eur. J. Biochem. 2003, 270, 1628–164

V. Muguet, M. Seiller, G. Barratt, O. Ozer, J.P. Marty, J.L. Grossiord. Formulation of shear rate sensitive multiple emulsions. Journal of Controlled Release 70 (2001) 37–49 J. Pharm.408, 223-234 (2011)



Wissenschaftliches Hauptprogramm, Teil 1:
Vortragsreihe „Dermopharmazeutische Chemie und Dermatopharmakologie“

Neue Thymidin- und Purinderivate zur Hemmung der humanen Polymerase alpha bei Hauttumoren

*Prof. Dr. Dr. Hans-Dieter Höltje,
Berlin*

Vor Kurzem haben wir ein mithilfe von Molecular Modeling-Techniken und Molecular Dynamics Simulationen entwickeltes 3-dimensionales räumliches Modell der humanen Polymerase alpha (pol α) vorgeschlagen. Dieses 3D-Modell wurde nun für Docking Experimente und Dynamiksimulationen von neuartigen durch rationales Design gewonnenen Liganden der humanen DNA pol α eingesetzt. Ein lipophiler Freiraum innerhalb der Bindungstasche sollte durch größere hydrophobe Seitenketten der Basenbausteine möglichst optimal ausgefüllt werden, um dadurch Liganden mit höherer Affinität zu gewinnen. Die Simulationsergebnisse bestätigten diese Vermutung. Weiterhin wurde gefunden, dass Acyclovir-ähnliche azyklische Analoge der Ribosepartialstruktur, die eine größere Flexibilität und damit auch bessere konformative Anpassungsfähigkeit an die räumlichen Gegebenheiten des aktiven Zentrums der Polymerase besitzen, höhere Bindungsaffinitäten zeigen sollten. Insgesamt haben wir acht Analoga des 2-Butylanilino-dATP, das als sehr selektiver nukleosidischer Inhibitor von Säuger-Polymerase α bekannt ist, untersucht. Biologische Testungen einiger der vorgeschlagenen Strukturen haben die theoretischen Ergebnisse bestätigt.



Wissenschaftliches Hauptprogramm, Teil 1:
Vortragsreihe „Dermopharmazeutische Chemie und Dermatopharmakologie“

Wirkmechanismen von Sphingosin-1-phosphat aus heutiger Sicht

*Prof. Dr. Burkhard Kleuser,
Institut für Ernährungswissenschaft,
Universität Potsdam, Nuthetal OT Bergholz-Rehbrücke*

Sphingolipide wurden lange Zeit lediglich als strukturelle Komponenten der Epidermis betrachtet, die für die Hautbarriere essentiell sind. Erst in den letzten Jahren hat sich herauskristallisiert, dass ein spezifisches Sphingolipid, nämlich Sphingosin-1-phosphat (S1P), ein biologisch aktiver Mediator ist, der eine Vielzahl zellulärer Funktionen in Hautzellen moduliert.

So konnte gezeigt werden, dass S1P nicht nur die Proliferation von Keratinozyten inhibiert, sondern auch deren Differenzierung fördert. Darüber hinaus besitzt S1P auch zentrale Bedeutung bei der Regulation von Langerhans-Zellen der Haut. Das Sphingolipid ist in der Lage, die Endozytose und die Migration von Langerhans-Zellen zu hemmen. Die Wirkungen sowohl auf Keratinozyten als auch auf Immunzellen der Haut deuten darauf hin, dass S1P ideale Eigenschaften zur Behandlung von hyperproliferativen, entzündlichen Hauterkrankungen besitzt. Tatsächlich zeigen Versuche an Tiermodellen der Psoriasis vulgaris und des atopischen Ekzems, dass eine topische Applikation zu einer deutlichen Verbesserung des Krankheitsbildes führt. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass eine gestörte S1P-Homöostase in Hautläsionen von Hunden mit atopischen Ekzem existiert.

Deshalb war es von großem Interesse, die molekularen Mechanismen von S1P in Hautzellen näher zu charakterisieren. Es ist bekannt, dass S1P einen Großteil seiner Effekte über die Aktivierung spezifischer G-Protein gekoppelter Rezeptoren vermittelt. Es existieren 5 verschiedene S1P-Rezeptoren, die als S1P1 - S1P5 bezeichnet werden. In Hautzellen konnte gezeigt werden, dass vor allem die Rezeptoren S1P1- und S1P2 eine zentrale Rolle entfalten. Die Stimulierung des S1P1-Rezeptors ist mit einer Hemmung der Migration von Langerhans-Zellen verknüpft, während die Aktivierung des S1P2-Rezeptors dazu beiträgt, die Proliferation der Keratinozyten zu hemmen und die Endozytose-Kapazität der Langerhans-Zellen zu reduzieren.



Wissenschaftliches Hauptprogramm, Teil 1:
Vortragsreihe „Dermopharmazeutische Chemie und Dermatopharmakologie“

Photodynamische Inaktivierung multiresistenter Bakterien im Kontext oberflächlicher Infektionen

*Priv.-Doz. Dr. Tim Maisch,
Klinik und Poliklinik für Dermatologie,
Universität Regensburg, Regensburg*

Die erfolgreiche Abtötung von multiresistenten Bakterien („Superbugs“) ist eine der wichtigsten klinischen Herausforderungen im 21. Jahrhundert. Bereits Ende 1950 waren 50 % aller *Staphylococcus aureus*-Stämme resistent gegenüber Penicillin. Diese Situation der Resistenzentwicklung wird umso kritischer, da nur vier neue chemische Klassen von Antibiotika innerhalb der letzten 40 Jahre eingefügt worden sind. Neben der Entwicklung von Antibiotika sind neue innovative Entwicklungen nötig, wie zum Beispiel die photodynamische Inaktivierung von Bakterien (PIB), um zukünftig effektive Behandlungsmöglichkeiten gegenüber bakteriellen Infektionen zu besitzen. PIB basiert auf dem Mechanismus, dass sich ein Farbstoffmolekül (Photosensibilisator) überwiegend an/in Bakterien anlagert und nicht im umliegenden gesunden Gewebe. Diese Photosensibilisatoren werden dann durch sichtbares Licht aktiviert, um reaktive Sauerstoffspezies (ROS) zu erzeugen. Diese ROS oxidieren dann unmittelbar während der Belichtung die Mikroorganismen, um diese abzutöten. Da die Bereitstellung von Licht im Gewebe fast immer ein lokaler Prozess ist, kommen als Behandlungsmöglichkeiten von PIB vor allem lokale Infektionen in Frage, im Gegensatz zu systemischen Infektionen. Die Einsatzmöglichkeiten von PIB bezüglich einer möglichen Anwendung in der Dermatologie sind bei lokalisierten Haut- und Wundinfektionen zur Reduktion einer nosokomialen Besiedelung von multiresistenten Bakterien anzusehen. Die Vorteile von PIB bei einer lokalisierten Infektion im Vergleich zu einer Antibiotikatherapie sind folgende:

- Eliminierung eines breiten Spektrums an Erregern
- therapeutische Fenster möglich, ohne Nebenwirkungen
- keine Resistenzentwicklung
- schnell und wiederholbar einsetzbar

Eine wichtige Beobachtung konnte bei positiv geladenen Photosensibilisatoren gemacht werden. Diese Photosensibilisatoren werden von humanen Zellen viel langsamer aufgenommen, während die Anlagerung und Aufnahme in Bakterien viel schneller verläuft (wenige Minuten).

Der entscheidende Vorteil einer lokalen Applikation eines Photosensibilisators mit nachfolgender Bestrahlung eines infizierten Areals liegt darin, dass unabhängig von der Resistenz eines Bakteriums eine sofortige direkte Inaktivierung stattfindet, ähnlich wie bei einem Desinfektionsmittel.

