

Abstracts

**Symposium der GD-Fachgruppe
Sicherheitsbewertung und Verkehrsfähigkeit:
*„Hautsensibilisierung und -irritation –
Regulatorische Anforderungen und
Teststrategien“***



**Gesellschaft für
Dermopharmazie**

Vorsitzende Teil 1:

Prof. Dr. Clemens Allgaier, Leipzig

Dr. Udo Bock, Trier

Vorsitzende, Teil 2:

Prof. Dr. Hans F. Merk, Aachen

Prof. Dr. Bernhardt Sachs, Bonn

Symposium der GD-Fachgruppe Sicherheitsbewertung und Verkehrsfähigkeit:
Hautsensibilisierung und -irritation – Regulatorische Anforderungen und
Teststrategien

Überblick über die Inhalte des Symposiums und die verschiedenen regulierten Bereiche

Prof. Dr. Clemens Allgaier
ACA-pharmaconcept GmbH, Leipzig

Hautirritation und -sensibilisierung sind wichtige Endpunkte bei der Bewertung der lokalen Verträglichkeit von chemischen Substanzen, Kosmetika und Arzneimitteln. Die regulatorischen Anforderungen unterscheiden sich dabei erheblich zwischen den einzelnen Produktgruppen.

Seit März 2013 ist es in der EU endgültig verboten, kosmetische Mittel in Verkehr zu bringen, deren Bestandteile an Tieren getestet wurden; dieses Vermarktungsverbot gilt auch für importierte Produkte. REACH schreibt für Chemikalien die Testung der Hautirritation bzw. -korrosion auf der Grundlage entsprechender In-vitro-Tests nach OECD 439 bzw. OECD 431 vor. Bis vor kurzem war für Chemikalien bei Prüfung auf Hautsensibilisierung noch ein In-vivo-Ansatz (Local Lymph Node-Assay, LLNA) erforderlich.

In den letzten Jahren wurden jedoch bedeutende Fortschritte im Hinblick auf die Kenntnisse der molekularen Mechanismen der Hautsensibilisierung erzielt. So gleicht die Sensibilisierung mechanistisch einer Immunantwort auf eine Infektion. Auf der Basis der neuen wissenschaftlichen Erkenntnisse wurden für die Prüfung auf Sensibilisierung durch Hautkontakt verschiedene, mittlerweile validierte In-vitro-Methoden, entwickelt, durch deren Kombination eine Abschätzung des sensibilisierenden Potentials eines Stoffes möglich ist, ohne dass In-vivo-Studien durchgeführt werden müssen. Die im Rahmen der Validierung durchgeführten Vergleiche zeigen dabei eine sehr hohe Korrelation zwischen den In-vitro- und In-vivo-Daten.

Mit der Verordnung (EU) 2016/1688 wurde der Anhang VII der REACH-Verordnung in der Weise geändert, dass bei der Untersuchung von Stoffen auf Hautsensibilisierung soweit als möglich auf Tierversuche verzichtet werden soll. Demgegenüber sind bei der Prüfung auf lokale Verträglichkeit von Arzneimitteln gemäß der Guideline on non-clinical local tolerance testing of medicinal products (EMA/CHMP/SWP/2145/2000 Rev. 1) derzeit noch Tierversuche erforderlich.

Da jedoch Unsicherheiten bei der Extrapolation von Tierdaten auf den Menschen bestehen, sind vor Zulassung eines Arzneimittels klinische Studien zur Prüfung auf Hautirritation und -sensibilisierung wie der Cumulative Irritant Patch-Test und der Human Repeated Insult Patch-Test von Bedeutung. Dennoch sind die Daten über die Sicherheit eines Arzneimittels zum Zeitpunkt der Zulassung begrenzt. Insbesondere seltener unerwünschte Arzneimittelwirkungen wurden unter Umständen nicht zuverlässig identifiziert, sodass das Nutzen-Risiko-Verhältnis eines Arzneimittels nach der Markteinführung kontinuierlich zu überwachen ist.



Symposium der GD-Fachgruppe Sicherheitsbewertung und Verkehrsfähigkeit:
Hautsensibilisierung und -irritation – Regulatorische Anforderungen und
Teststrategien

Mechanismen der allergischen Kontaktdermatitis

*Prof. Dr. rer. nat. Stefan F. Martin
Klinik für Dermatologie und Venerologie
Universitätsklinikum Freiburg*

Viele niedermolekulare Chemikalien können irritative (ICD) oder allergische Kontaktdermatitis, entzündliche Hauterkrankungen, verursachen. Kontaktallergene sind proteinreaktiv. Sie binden entweder kovalent an spezifische Aminosäuren oder bilden Komplexe wie im Fall von Metallionen. Dies führt zur Aktivierung des angeborenen Immunsystems und zur Generierung von T-Zellepitopen. Die Aktivierung kontaktallergenspezifischer T-Zellen beschließt die Sensibilisierungsphase. Wiederholter Allergenkontakt kann dann zur Rekrutierung und Effektorfunktion der T-Zellen in der entzündeten Haut und damit zur Kontaktallergie führen.

Verschiedene Mechanismen der Hautsensibilisierung durch Kontaktallergene wurden in den letzten Jahren aufgeklärt. Diese zeigen, dass die Immunantwort auf Kontaktallergene der Immunantwort auf eine Infektion ähnelt. Das detaillierte Verständnis der Mechanismen der Aktivierung des angeborenen Immunsystems auf molekularer und zellulärer Basis wird genutzt, um In-vitro-Tests zur Kontaktallergenidentifizierung zu entwickeln und die Diagnose und Behandlung dieser entzündlichen Hauterkrankung zu verbessern.



Symposium der GD-Fachgruppe Sicherheitsbewertung und Verkehrsfähigkeit:
Hautsensibilisierung und -irritation – Regulatorische Anforderungen und
Teststrategien

In-vitro-Strategien zur Einschätzung der Hautsensibilisierung und -irritation durch chemische Stoffe

Dr. Naveed Honarvar (1)

unter Mitarbeit von Susanne Noreen Kolle (1), Daniel Urbisch (2), Robert Landsiedel (1)

(1) BASF SEy, Ludwigshafen,

(2) BASF SE, Product Safety, Ludwigshafen

Im Rahmen der europäischen Rechtsvorschrift zur Registrierung, Bewertung, Zulassung und Beschränkung chemischer Stoffe (REACH) muss u.a. das Potential der Hautirritation und -sensibilisierung von Substanzen adressiert werden. Für beide Endpunkte gibt es eine Reihe In-vitro-Testmethoden, die mittlerweile als OECD-Richtlinie vorliegen.

In-vitro-Untersuchungen mit Hautäquivalenten, wie unter den OECD-Richtlinien Nr. 431 und 439 beschrieben, werden in Kombination eingesetzt, um das irritative bzw. das korrosive Potential von Substanzen zu untersuchen. Validierungsstudien zeigen eine hohe Korrelation zwischen In-vitro- und In-vivo-Ergebnissen.

Die Vorgänge, die zu einer Hautsensibilisierung führen, werden in einem „Adverse Outcome Pathway“ (AOP) beschrieben. Im Rahmen des AOP gibt es sog. Schlüsselereignisse („Key events“), die für die Initiation der Immunreaktion unablässig sind. Obwohl bis dato kein geeignetes In-vitro-Testsystem existiert, das das gesamte AOP der Hautsensibilisierung in vitro simuliert, gibt es Möglichkeiten, einzelne „keyevents“ in vitro zu testen: (i) Das „Direct Peptide Reactivity Assay“ (OECD 442C) analysiert die Proteinbindungseigenschaften der Testsubstanz. (ii) Die Aktivierung der dendritischen Zellen in der Haut wird in dem h-CLAT Assay (OECD 442E) simuliert. (iii) Eine Interaktion von sensibilisierenden Substanzen mit Keratinozyten führt zu deren Aktivierung, welche im KeratinosensTM/LuSens-Assay (OECD 442D) quantifiziert werden kann.

Eine von BASF vorgestellte Teststrategie beinhaltet die Durchführung aller o.a. Testsysteme in Kombination und eine anschließende Bewertung mittels des „2 out of 3 weight of evidence approach“. In einer umfassenden Studie konnte gezeigt werden, dass die „2 out of 3 weight of evidence approach“ eine bessere Vergleichbarkeit zu humanen Daten aufweist als die herkömmliche In-vivo-Alternative (Local Lymph Node Assay, LLNA). Des Weiteren konnten Analysen zeigen, dass diese Teststrategie auch metabolische und nicht metabolische Transformationen der Testsubstanzen berücksichtigt.

Die dargestellte In-vitro-Strategie kann die Stärke einer Sensibilisierung nicht bewerten. Neue Protokolle unter Berücksichtigung der Reaktionskinetik zeigen jedoch vielversprechende Ergebnisse, womit die Potenz einer Sensibilisierung in vitro gemessen werden kann.



Die aktuelle Version der Datenanforderung der ECHA bezüglich Hautirritation bzw.-sensibilisierung schreibt die In-vitro/in-chemico-Testung vor. Eine Testung in vivo wird erst dann nötig, wenn der Einsatz von In-vitro-Alternativen nicht anwendbar ist.

Referenzen

Kolle, Susanne N., et al. «Applicability of in vitro tests for skin irritation and corrosion to regulatory classification schemes: substantiating test strategies with data from routine studies.» Regulatory Toxicology and Pharmacology 64.3 (2012): 402-414.

Ramirez, Tzutzy, et al. «LuSens: a keratinocyte based ARE reporter gene assay for use in integrated testing strategies for skin sensitization hazard identification.» Toxicology in Vitro 28.8 (2014): 1482-1497.

Bauch, Caroline, et al. «Putting the parts together: combining in vitro methods to test for skin sensitizing potentials.» Regulatory toxicology and pharmacology 63.3 (2012): 489-504.

Urbisch, Daniel, et al. «Assessing skin sensitization hazard in mice and men using non-animal test methods.» Regulatory Toxicology and Pharmacology 71.2 (2015): 337-351.

Urbisch, Daniel, et al. «Assessment of Pre-and Pro-haptens Using Nonanimal Test Methods for Skin Sensitization.» Chemical research in toxicology 29.5 (2016): 901-913.

Sauer, Ursula G., et al. «Local tolerance testing under REACH: Accepted non-animal methods are not on equal footing with animal tests.» Alternatives to laboratory animals: ATLA 44.3 (2016): 281.



Symposium der GD-Fachgruppe Sicherheitsbewertung und Verkehrsfähigkeit:
Hautsensibilisierung und -irritation – Regulatorische Anforderungen und
Teststrategien

Zukünftige Entwicklungen der In-vitro- Ansätze zur Einschätzung der Hautsensibilisierung und -irritation

Priv.-Doz. Dr. Matthias Peiser

Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR), Berlin

Im Konzept der „Adverse Outcome Pathways“ (AOPs) der OECD werden über die Arbeitsgruppe EAGMST AOPs für verschiedene toxikologische Endpunkte entwickelt. Dabei wird ein AOP als eine sequenzielle Kette kausal zusammenhängender Ereignisse auf verschiedenen Stufen biologischer Organisation verstanden. AOPs sind ein Tool für die mögliche zukünftige Bewertung von Chemikalien und Arzneimitteln. AOPs werden als Toxikologische Pathways ausgehend von einem Molecular Initiating Event (MIE) über ein bis mehrere Key Events (KE) bis hin zum adversen Effekt auf die menschliche Gesundheit (Adverse Outcome) definiert. Der erste akzeptierte AOP ist der „Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitization initiated by covalent Binding to Proteins“ (OECD 2012). In diesem Signalweg ist die Kovalente Bindung an Hautproteine ein MIE, Aktivierung von Keratinozyten, Aktivierung von dendritischen Zellen, Aktivierung von T-Zellen konsekutive Key Events, die schließlich zum Adversen Effekt Hautsensibilisierung führen.

Über die Open Source Plattform AOP Wiki sind diese Key Events mit OECD-akzeptierten In-vitro-Methoden wie dem Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA, Test No. 442C), der ARE-Nrf2 Luciferase Test Method (KeratiSens, Test No. 442D) und dem Human Cell Line Activation Test (h-CLAT, Test No. 442E) verlinkt. Allein für den Key Event Aktivierung von T-Zellen fehlt bis heute ein OECD-akzeptiertes Testsystem. In der Forschung werden zurzeit einige vielversprechende Ansätze für T-Zellsysteme, in denen z.B. Biomarker (Zytokine, Oberflächenmoleküle) bei blockierten koinhibitorischen Molekülen gemessen werden, entwickelt.

Auch für den Endpunkt Hautirritation können akzeptierte OECD-Testmethoden wie z.B. die Reconstructed Human Epidermis Test Method (Test No. 439) und auch neuentwickelte Testmethoden mit der AOP Wiki Plattform direkt verbunden werden.



Symposium der GD-Fachgruppe Sicherheitsbewertung und Verkehrsfähigkeit:
Hautsensibilisierung und -irritation – Regulatorische Anforderungen und
Teststrategien

Präklinische Anforderungen bei der Prüfung von Arzneimitteln auf Hautirritation und -sensibilisierung

Dr. Ute Hoppe

Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte (BfArM), Bonn

Den regulatorischen Rahmen für Humanarzneimittel setzt die Richtlinie 2001/83/EG, deren Anhang I die analytischen, toxikologisch-pharmakologischen und ärztlichen oder klinischen Vorschriften über Versuche mit Arzneimitteln enthält.

Topische Dermatika sind komplexe Formulierungen aus aktivem Wirkstoff und Trägersystem (Vehikel); sowohl die klinische Wirksamkeit wie auch die Verträglichkeit von Topika werden durch die Galenik maßgeblich beeinflusst. Aus diesem Grunde ist bei den Untersuchungen der lokalen Verträglichkeit von topischen Arzneimitteln im Rahmen der präklinischen Prüfung auch stets die Gesamtformulierung (Wirkstoff + Hilfsstoffe) in der finalen klinischen Zusammensetzung zu prüfen.

Das Prüfprogramm der Verträglichkeitsprüfung für Topika ist in einer europäischen Guideline veröffentlicht [1]. Die Guideline beinhaltet Regelungen zur Prüfung für folgende Arzneimittel, respektive Applikationswege: Augentropfen, Kutane applizierte Dermatika, Transdermale System (Pflaster) und Parenteralia. Die Verträglichkeitsprüfung beinhaltet drei Aspekte, nämlich Irritatives Potential, Sensibilisierendes Potential und Phototoxizität. Vor dem Hintergrund des 3R-Prinzips (Replacement/ Reduction/Refinement) wird in der Guideline an verschiedenen Stellen darauf hingewiesen, nach Möglichkeit validierte In-vitro-Untersuchungen zu verwenden und notwendige In-vivo-Untersuchungen bevorzugt in allgemeine Toxizitätsstudien zu integrieren, um die Zahl der Tierversuche zu minimieren.

Derzeit werden allerdings im Arzneimittelbereich zur Prüfung des sensibilisierenden Potentials eines topischen Dermatikums gemäß der nicht klinischen Toleranz Guideline [1]- in Ermangelung einer allgemein akzeptierten in vitro integrierten Teststrategie -weiterhin ausschließlich bekannte In-vivo-Tests am Meerschweinchen (GPMT, BT; OECD TG 406) bzw. in der Maus (LLNA; OECD TG 429) gefordert.

Das Konzept der Kombination verschiedener In-vitro-Tests auf der Basis von definierten molekularen „Key Events“ zum Nachweis der Hautsensibilisierung, an dem zurzeit in anderen Regelungsbereichen (u.a. Chemikalien, Kosmetika) gearbeitet wird, könnte nach Validierung sicher auch im Arzneimittelbereich eingesetzt werden und würde zur weiteren Reduktion von Tierversuchen führen.



Literatur

[1]Guideline on non-clinical local tolerance testing of medicinal products(EMA/CHMP/SWP/2145/2000 Rev. 1)



Symposium der GD-Fachgruppe Sicherheitsbewertung und Verkehrsfähigkeit:
Hautsensibilisierung und -irritation – Regulatorische Anforderungen und
Teststrategien

Klinische Ansätze zur Prüfung auf Hautirritation und -sensibilisierung bei Arzneimitteln

*Prof. Dr. med. Bernhardt Sachs
Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR), Berlin*

Bei kutan applizierten Dermatika sind klinische Studien zur Prüfung auf Hautirritation und -sensibilisierung am Menschen vor der Zulassung des Arzneimittels deshalb von Bedeutung, da Unsicherheiten bei der Extrapolierung von Tierdaten auf den Menschen bestehen (Belum 2012) und das Auftreten unerwünschter Arzneimittelwirkungen, wiez.B. Kontaktekzemen, soweit wie möglich vermieden werden soll.

Genaue epidemiologische Daten über die Häufigkeit des irritativen Kontaktekzems zu erhalten, ist schwierig, da in Studien oft nicht zwischen allergischer und irritativer Kontaktdermatitis unterschieden wird (Löffler 2000). Die Häufigkeit des allergischen Kontaktekzems (unabhängig von dem Auslöser) wird in der Literatur orientierend mit der Häufigkeit des Diabetes mellitus verglichen (Brasch 2014). Der pathophysiologische Unterschied zwischen dem irritativen und dem allergischen Kontaktekzem besteht darin, dass einer Irritation keine spezifische Immunreaktion zugrunde liegt, während eine allergische Reaktion eine spezifische immunologische Reaktion darstellt. Diese Unterscheidung ist insofern von Bedeutung, da sich bestimmte Testverfahren an diesen Prinzipien orientieren.

In der Literatur sind eine Vielzahl unterschiedlicher Testverfahren zur Prüfung auf Hautirritation und -sensibilisierung am Menschen beschrieben, von denen viele auch im Zusammenhang mit der Testung von Kosmetika genannt werden. Die Testverfahren lassen sich prinzipiell in Bezug auf die Intention differenzieren, also z. B. dem Nachweis der Verträglichkeit (fehlende Irritation) versus dem Nachweis der fehlenden Sensibilisierung. Die Testungen zum Nachweis der Verträglichkeit lassen sich wiederum in Bezug auf ihr Testdesign in offene (z.B. der Repeated Open Application Test) und okklusive Testungen (z. B. okklusiver Patch-Test) unterscheiden. Weiterhin kann nach der Applikationshäufigkeit bzw. -dauer differenziert werden (z.B. single versus cumulative application). In regulatorischen Guidance-Dokumenten zur Arzneimittelzulassung finden sich Hinweise in Bezug auf das Design anzuwendender Testverfahren, so dass darauf basierend im Weiteren auf zwei Testverfahren fokussiert wird, den Cumulative Irritant Patch Test und den Human Repeated Insult Patch Test.

Das Grundprinzip des Cumulative Irritant Patch Test besteht in einer okklusiven Aufbringung der Testkammern mit dem Testarzneimittel auf dem Rücken von gesunden Probanden, gefolgt von einer Ablesung anhand eines Scores und Neuansbringung der Testkammern am Folgetag. Dieses Prinzip wird über drei Wochen fortgeführt, wobei an den Wochenenden keine Ablesung erfolgt. In



der Literatur sind verschiedene Variationen dieses Testprinzips beschrieben.

Die Intention des Human Repeated Insult Patch Test ist nicht die Auslösung einer Sensibilisierung, sondern der Nachweis einer fehlenden Auslösung einer Sensibilisierung. Das Grundprinzip entspricht dem Cumulative Irritant Patch Test, nur dass nach den drei Applikationswochen eine 2-wöchige Ruhephase folgt, auf die dann eine 2-tägige Challenge-Phase folgt. Der Human Repeated Insult Patch Test wird in der Literatur allerdings als ethisch schwierig beschrieben, da bleibende Sensibilisierungen dokumentiert wurden. Auch wird seine wissenschaftliche Aussagekraft als beschränkt dargestellt, da der Nachweis der Auslösung einer Sensibilisierung mit der Anzahl der eingeschlossenen Probanden oft statistisch nicht sicher oder nur eingeschränkt erbracht werden kann und möglicherweise „empfindliche“ Patienten nicht unter den Probanden sind. Daher wird in der Literatur ein sehr restriktiver Einsatz dieses Testes gefordert.

Literatur

Belum VR et al. Identification of skin irritants and allergens by in vivo and in vitro methods. In: T. Rustemeyer, P. Elsner, S.M. John & H.I. Maibach (eds); *Kanerva's Occupational Dermatology*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2012.

Brasch J et al. Leitlinie Kontaktekzem. *Allergo J Int* 2014;23:126.

Löffler H et al. Die irritative Kontaktdermatitis. *Hautarzt* 2000;51:203-18.



Symposium der GD-Fachgruppe Sicherheitsbewertung und Verkehrsfähigkeit:
Hautsensibilisierung und -irritation – Regulatorische Anforderungen und
Teststrategien

Hautirritationen und -sensibilisierungen auf Arzneimittel – Erfahrungen nach der Zulassung

Dr. med. Wilma Fischer-Barth

Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR), Berlin

Die Daten über die Sicherheit eines Arzneimittels sind zum Zeitpunkt der Zulassung begrenzt. Insbesondere seltene unerwünschte Arzneimittelwirkungen können aufgrund des ausgewählten Patientenkollektivs und der begrenzten Patientenzahl in den Zulassungsstudien nicht zuverlässig identifiziert werden. Mit der Markteinführung beginnt üblicherweise die Anwendung des Arzneimittels an einem größeren unselektierten Patientenkollektiv. Es ist Aufgabe der Pharmakovigilanz, das Nutzen-Risiko-Verhältnis eines Arzneimittels nach der Markteinführung kontinuierlich zu überwachen.

Daten zum Risikoprofil eines Arzneimittels können nach der Zulassung aus interventionellen und nicht interventionellen Studien anhand von Spontanberichten zu unerwünschten Arzneimittelwirkungen sowie aus der Literatur gewonnen werden. Insbesondere dann, wenn nach der Zulassung keine Studien zu einem Arzneimittel mehr durchgeführt werden, stützt sich die Beurteilung der Arzneimittelsicherheit auf Spontanberichte.

Die Auswertung der entsprechenden Daten kann auch nach bereits langjähriger Anwendung eines Arzneimittels zu Änderungen der Produktinformationen oder im Einzelfall sogar zum Ruhen oder Versagen der Zulassung führen. So erfolgte auf Grundlage entsprechender Berichte über schwere kontaktallergische Reaktionen im Jahr 2010 auf europäischer Ebene der Widerruf der Zulassung für den Wirkstoff Bufexamac, der seit den 70er-Jahren in der dermatologischen Lokaltherapie angewendet wurde.

