

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)

