

Vortragsszusammenfassungen

Wissenschaftliches Hauptprogramm
Teil 1



Vortragsreihe
Dermopharmazeutische Technologie,
Dermatopharmakologie und
Dermatotoxikologie

Terpenhaltige Liposomen zur kutanen Applikation des Photosensibilisators Temporfin

*Prof. Dr. Alfred Fahr,
Institut für Pharmazie, Lehrstuhl Pharmazeutische Technologie,
Friedrich-Schiller-Universität, Jena*

Temporfin (mTHPC) ist ein sehr lipophiler Photosensitizer der zweiten Generation, der große Vorteile in der Tumorthherapie zeigt, aber leider eine sehr geringe Hautpenetration aufweist. Eine erwünschte Hautpenetration – zum Beispiel für Hauttumore – kann nur mittels spezieller Trägersysteme erhöht werden. Deshalb wurden liposomale Trägersysteme (Invasomen) für mTHPC entwickelt, charakterisiert und in vitro wie auch in vivo getestet.

mTHPC-beladene Invasomen wurden aus nicht hydrogeniertem Sojabohnen-Lecithin, Ethanol und einer Terpenmischung hergestellt. Diese Invasomen hatten ein geringes negatives Zetapotential und einen genügend kleinen Durchmesser (150 nm), um durch das Stratum corneum diffundieren zu können. Unter dem Elektronenmikroskop fanden sich uni- und oligolamellare Strukturen sowohl kugelförmigen wie auch ovalen Aussehens. Mit zunehmender Menge an Terpenen nahm auch die Anzahl der deformierten Vehikel zu, was mit der erhöhten Flexibilität der Invasomen zu erklären ist.

Die In-vitro-Penetration von mTHPC wurde mittels Franz-Diffusionszellen an abdominalen Humanhaut bestimmt. Die in vitro gemessene Hautpenetration zeigte, dass Invasomen mit 1 % Terpenanteilen eine deutlich erhöhte Hautdeposition von mTHPC gegenüber Liposomen ohne Terpene oder einer ethanolischen Lösung zeigten. Werden die Terpene aus der Mischung einzeln auf ihre penetrationserhöhende Eigenschaft getestet, so zeichnet sich Cineol hier als bestwirkende Substanz aus.

Im Rahmen unserer Untersuchungen wurden auch liposomale Gele auf Penetrationsverstärkung für mTHPC getestet. Gele mit einer geringen Polymerkonzentration zeigten die beste Fähigkeit, mTHPC in das Stratum corneum und tiefere Hautschichten zu bringen. Zwar war diese Menge an mTHPC insgesamt geringer als die mit den Invasomen erreichbare, da hier ein anderer Mechanismus vorliegt, aber Gele können als Topika an anderen Stellen wirken, an denen Invasomen keine Wirkung zeigen.

Eine Pilotstudie zeigte die Effektivität der mTHPC-Invasomen in der photodynamischen Therapie von HT29-Tumoren in Mäusen nach topischer Applikation. Das Ziel dieses Experimentes war zu überprüfen, ob eine entsprechende liposomale Formulierung einen



gesetzten Tumor in der Größe nach photodynamischer Therapie reduzieren kann oder zumindest in der Lage ist, das Tumorwachstum gegenüber einer unbehandelten Kontrollgruppe zu reduzieren. Letzteres konnte auch auf dem 5 %-Niveau signifikant mit einer mTHPC-Invasomen-Formulierung gezeigt werden, die 1 % der schon beschriebenen Terpenmischung enthielt.



Humanhautmodelle zur Charakterisierung der Hautpenetration durch Fremdstoffe

*Prof. Dr. Monika Schäfer-Korting,
Pharmazeutisches Institut, Pharmakologie,
Freie Universität Berlin, Berlin*

Die Bestimmung der kutanen Resorption ist von großer Relevanz bei der Risikobewertung von Chemikalien. Neben der oralen und pulmonalen Exposition stellt Hautkontakt den dritten relevanten Expositionsweg dar. Die Umsetzung der europäischen Chemikaliengesetzgebung (REACH) wird daher in den nächsten Jahren den Testbedarf auch in dieser Hinsicht wesentlich steigen lassen. Soweit als möglich sollen alternative Testmethoden und nicht Versuche am lebenden Tier eingesetzt werden.

Im Jahr 2004 hat die OECD die Prüfrichtlinie 428 für die Testung an humaner und tierischer Haut *ex vivo* verabschiedet. Die dazugehörige Technische Richtlinie 28 gibt an, dass auch rekonstruierte Hautmodelle (zum Beispiel rekonstruierte humane Epidermis, RHE) eingesetzt werden können, sofern die Vergleichbarkeit der Ergebnisse nachgewiesen ist. Wissenschaftler aus Industrie, Universitäten sowie des Bundesinstituts für Risikobewertung haben sich dieser Aufgabe gestellt. Finanziell gefördert vom BMBF wurde ein Testprotokoll entwickelt, in die Partnerlabore transferiert, prävalidiert und schließlich erfolgten validierte Tests mit den RHEs EpiDerm (Mattek, Ashland, MA), EPISKIN und Skinethic (L'OREAL, Paris/Nizza, Frankreich) unter Applikation wässriger Lösungen von neun Testsubstanzen, die sich in ihren physikalisch-chemischen Eigenschaften deutlich unterscheiden. Die Ergebnisse sind in mehreren Publikationen der Öffentlichkeit zugänglich, ferner sind die zugehörigen Standardarbeitsanweisungen auf der Homepage der Gesellschaft für Dermopharmazie hinterlegt.

Darüber hinaus fanden Untersuchungen statt mit nicht wässrigen Zubereitungen verschiedener Substanzen sowie mit rekonstruierter Vollhaut und Epidermis, rekonstruiert aus Keratinozyten von Patienten mit Hauterkrankungen beziehungsweise nach Ausschaltung krankheitsbezogener Gene. Die vielversprechenden Ergebnisse lassen hoffen, dass in der Zukunft auch die erhöhte Empfindlichkeit von hautkranken Patienten bei der Risikoanalyse Berücksichtigung finden könnte.

Dem BMBF wird für finanzielle Unterstützung (Förderkennzeichen: 0312881, 0312882, 0312883, 0312884, 0312885, 0312886) ausdrücklich gedankt.



In-silico-Modelle zur Abschätzung der Hautpenetration

Dr. Michael Heisig

*unter Mitarbeit von Arne Nägel und Prof. Dr. Gabriel Wittum,
Goethe-Zentrum für Wissenschaftliches Rechnen,
Johann-Wolfgang-Goethe-Universität, Frankfurt/Main*

In-silico-Modelle zur Simulation von Strömungs- und Transportvorgängen spielen in den Natur- und Ingenieurwissenschaften eine zunehmend wichtige Rolle. In vielen Anwendungsbereichen können Computersimulationen zeit- und kostenintensive Experimente ersetzen.

Bei den derzeit in der Dermopharmazie eingesetzten In-silico-Modellen zur Abschätzung der Hautpenetration unterscheidet man die Kompartimentmodelle und die Diffusionsmodelle. Ein Nachteil der heutzutage noch meist verwendeten Kompartimentmodelle ist, dass keine Aussagen über die zeitliche und räumliche Änderung der Konzentration in einem Kompartiment möglich sind. Die Geometrie, im Falle des Stratum corneum (SC) zum Beispiel die Länge und Höhe der Corneozyten sowie die Dicke des Lipidkanals, wird im Kompartimentmodell nicht berücksichtigt. Zudem können die experimentell bestimmten Eingangsgrößen nicht direkt im Modell eingesetzt werden, sondern die Modellparameter sind durch Parameterschätzung zu bestimmen. Bei den Diffusionsmodellen, die den Arzneistofftransport in Raum und Zeit nach den Fick'schen Diffusionsgesetzen beschreiben, können die experimentell bestimmten Parameter direkt zur Berechnung von zum Beispiel zeitabhängigen Konzentrations-Schichttiefenprofilen verwendet werden.

Ein erstes zweidimensionales In-silico-Diffusionsmodell zur instationären Berechnung des Transports in und durch das Stratum corneum (SC) wurde vor über 10 Jahren entwickelt [1]. Die zweidimensionale Modellmembran besteht aus einem zweiphasigen SC. Dem SC liegt die „Ziegelstein-Mörtel“-Geometrie zugrunde, was bedeutet, dass die Corneocyten vollständig in die Lipidphase eingebettet sind. Alle Phasen werden mit homogenen Verteilungs- und Diffusionskoeffizienten modelliert. Die Durchlässigkeit der Corneocyten kann in der Simulation von impermeabel bis völlig permeabel variiert werden. Das Verfahren ist so implementiert, dass für den Donor eine infinite Dosierung und für den Akzeptor Sink-Bedingungen angenommen werden. Der Transport durch das SC wird durch die Fick'schen Gesetze beschrieben. Alle Simulationen werden mit unserem Simulationswerkzeug UG durchgeführt. Für verschiedene zweidimensionale SC-Geometrien und unterschiedliche Diffusions- und Verteilungskoeffizienten wurden Permeabilitäten und Lag-Zeiten sowie zeitabhängige Konzentrations-Schichttiefenprofile bestimmt. Zudem wurde berechnet, welche Arzneistoffmenge zeitabhängig durch das SC diffundiert. Aus den erhaltenen Daten kann die



Hautpenetration abgeschätzt werden.

In Zusammenarbeit mit dem Institut für Biopharmazie und Pharmazeutische Technologie (S. Hansen, Prof. Dr. C.-M. Lehr, Dr. U. Schäfer) und dem Zentrum für Bioinformatik (Dr. D. Neumann) der Universität des Saarlandes wurde dieses Modell zu einem auf Experimenten basierten Diffusionsmodell weiterentwickelt. Mit diesem Hautmodell können die im Experiment gemessenen, zeitlich abhängigen Konzentrations-Schichttiefenprofile in der Haut am Computer simuliert werden. Die zweidimensionale Modell-membran wurde hierzu um ein zusätzliches homogenes Kompartiment für die lebende Epidermis/Dermis erweitert. Die relevanten Parameter werden experimentell bestimmt und fließen direkt in die Simulation ein. Dazu gehören die Verteilungskoeffizienten zwischen Lipiden und Donor (Klip/don), Corneocyten und Lipiden (Kcor/lip), und lebenden tieferen Hautschichten und Lipiden (KDSL/lip), und die Diffusionskoeffizienten in den Lipiden und lebenden tieferen Hautschichten (Dlip und DDSL). Als Modellsubstanzen dienen Koffein und Flufenaminsäure. Ein Vergleich der Konzentrations-Schichttiefenprofile im SC aus Experiment und Simulation zeigt eine gute Übereinstimmung. Bei der Hautpenetration beider Modellsubstanzen spielen die Corneocyten eine entscheidende Rolle [2], [3].

Aufbauend auf diesen zweidimensionalen Modellen wurden zwei weitere dreidimensionale Modelle entwickelt. Das erste SC-Modell ist ein aus Quadern aufgebautes Cuboid-Modell und ist eine Weiterentwicklung des klassischen „Ziegelstein-Mörtel“-Modells [4]. Das zweite SC-Modell ist realistischer, aber deutlich komplexer. In diesem Modell werden die Corneozyten als Tetrakaidekaeder modelliert [5]. Dieses Tetrakaidekaeder-Modell wurde von Naegel et al [6] mit dem Cuboid-Modell und dem zweidimensionalen „Ziegelstein-Mörtel“-Modell in Bezug auf die Barriereeeigenschaft verglichen, und es wurden für verschiedene Zellgeometrien die Permeabilitäten der Membran berechnet. Der Einfluss von unterschiedlichen Diffusions- und Verteilungskoeffizienten sowie der Zellmorphologie auf die Barriereeeigenschaft wurde gezeigt. Für eine konstante Menge an Gewebe ist das Tetrakaidekaeder-Modell zweimal weniger permeabel als das Cuboid-Modell. Für alle Modelle wurden Ausdrücke zur Beschreibung der Permeabilität und Lag-Zeit in geschlossener Form abgeleitet.

Das hier präsentierte Verfahren ist anwendbar auf alle Membranen, welche aus Zellverbänden bestehen.

Das Modell wird derzeit erweitert, sodass auch die Adsorption von Substanzen an die Corneozyten und die Co-Permeation (zum Beispiel Arzneistoff und Penetrationenhancer/-reducer) in der Haut simuliert werden können. Mit dem weiterentwickelten Simulationswerkzeug ist die Berechnung von zeitabhängigen Konzentrations-Schichttiefenprofilen nicht nur bei infiniten Dosierung, sondern auch bei finiter Dosierung möglich.

Literatur

[1] Heisig M, Lieckfeldt R, Wittum G, Mazurkevich G, Lee G: Non steady-state descriptions of drug permeation through stratum corneum. I: the biphasic, brick and mortar model. Pharm. Res. 13 (1996) 421-426



- [2] Hansen S, Henning A, Naegel A, Heisig M, Wittum G, Neumann D, Kostka KH, Zbytovska J, Lehr C-M, Schaefer UF: In-silico model of skin penetration based on experimentally determined input parameters. Part 1: Experimental determination of partition and diffusion coefficients. Eur. J. Pharm. Biopharm. 68 (2008) 352-367
- [3] Naegel A, Hansen S, Neumann D, Lehr C-M, Schaefer UF, Wittum G, Heisig M: In-silico model of skin penetration based on experimentally determined input parameters. Part 2: Mathematical modeling of in-vitro diffusion experiments. Determination of critical input parameters. Eur. J. Pharm. Biopharm. 68 (2008) 368-379
- [4] Wagner C.:Dreidimensionale digitale Rekonstruktion des humanen Stratum corneum der Haut in Kombination mit Simulation substantieller Diffusion durch das Stratum corneum. Dissertation, Tierärztliche Hochschule Hannover, 2008.
- [5] Feuchter D, Heisig M, Wittum G: A geometry model for the simulation of drug diffusion through the stratum corneum. Comput. Visual. Sci. 9 (2006) 117-130
- [6] Naegel A, Heisig M, Wittum G: A comparison of two- and three-dimensional models for the simulation of the permeability of human stratum corneum. Eur. J. Pharm. Biopharm. (2009) doi:10.1016/j.ejpb.2008.11.009

