

Abstracts

Wissenschaftliches Hauptprogramm, Teil 1:
„Hans Christian Korting-Gedächtnisvorlesung“
*„Vortragssitzung Dermopharmazeutische Chemie
und Technologie“*



Gesellschaft für
Dermopharmazie

Vorsitzende:

Prof. Dr. Rolf Daniels, Tübingen

Prof. Dr. Christel Müller-Goymann, Braunschweig

Wissenschaftliches Hauptprogramm, Teil 1: „Hans Christian Korting-Gedächtnisvorlesung“

Bedeutung von Sphingolipiden für die epidermale Barrierefunktion

Prof. Dr. Burkhard Kleuser

Institut für Ernährungswissenschaft

Universität Potsdam

Im Jahr 1884 konnte der deutsche Arzt J. L. Thudichum aus menschlichem Gehirn durch fraktionelle Kristallisation eine bis dahin nicht gekannte neue Lipidklasse isolieren. Allerdings bereitete ihm die Aufklärung der Struktur dieser neuartigen Lipide große Rätsel, so dass er sie in Anlehnung an die griechische Sphinx Sphingolipide nannte.

Eine besondere Bedeutung besitzen die Sphingolipide bei der Ausbildung der epidermalen Barriere. Hautzellen, vor allem Keratinozyten, produzieren große Mengen an Glucosylceramiden und Sphingomyelin, die ins Stratum granulosum und ins Stratum corneum sezerniert werden. Hier erfolgt eine Spaltung und weitere Metabolisierung der Sphingolipide zu verschiedenen Ceramid-Spezies. Diese tragen entscheidend zur Ausbildung der lamellaren Strukturen der Hautlipide bei. Gemeinsam mit Cholesterol-Derivaten und Fettsäuren bilden sie eine kristalline Matrix, die die Strukturproteine und Korneozyten der Haut umschließt. Die Bedeutung der Ceramide erkennt man daran, dass sie mehr als 50 % der Lipidfraktion ausmachen. Daher ist es auch nicht verwunderlich, dass Fehlfunktionen im Sphingolipid-Metabolismus mit einer gestörten Hautbarriere verbunden sein könnten.

Tatsächlich findet man bei Patienten mit atopischem Ekzem häufig einen verminderten Ceramid-Gehalt in der Haut. In der Folge kommt es zu einer Störung der Lipidbarriere und einem erhöhten transepidermalen Wasserverlust. Dabei ist es von Interesse, dass die Kettenlänge der N-acylierten Fettsäuren bei den Ceramiden der Haut eine weitaus größere Varianz aufweist als bei Ceramiden in anderen Geweben. Vor allem langkettige, mehrfach ungesättigte Fettsäuren (C26 oder länger) sind charakteristisch für die Ceramide der Haut. Dies scheint auch eine große Bedeutung für die Ausbildung der lamellaren Hautbarriere zu besitzen. Fehlt das Enzym für die Bildung dieser langkettigen Ceramide, die sogenannte Ceramid-Synthase 3, dann kommt es zu einer Störung der Hautbarriere.

Darüber hinaus hat sich in den letzten Jahren herauskristallisiert, dass Sphingolipide nicht nur essenzielle Strukturkomponenten darstellen. Vielmehr scheinen spezifische Sphingolipid-Derivate zentrale Signalmoleküle zu sein, die weniger die Eigenschaften der Hautbarriere als vielmehr die biologischen Funktionen von Keratinozyten und Immunzellen der Haut modulieren. Eine herausragende Stellung nimmt hier das Sphingolipid Sphingosin 1-Phosphat (S1P) ein. Obwohl S1P in vielen Zellen eine proliferationsfördernde Wirkung besitzt, kommt es in Keratinozyten nach Stimulation mit S1P zu einer Hemmung der Zellteilung. Dies ist nicht auf eine zytotoxische Wirkung zurückzuführen, sondern das Ergebnis des Eintritts der Zellen in die G₀-Phase des Zellzyklus. Es bleibt jedoch nicht nur bei einer Proliferationshemmung, auch wird der intrazelluläre



Kalzium-Gehalt durch S1P stark erhöht. Für Keratinozyten ist dies das wichtigste Signal für den Differenzierungsprozess, so dass nach S1P-Stimulation die Umwandlung von Keratinozyten zu Korneozyten eingeleitet wird.

Diese Wirkung wird auch bei der Behandlung der Psoriasis mit Calcitriol beziehungsweise Calcipotriol ausgenutzt. Hier konnte gezeigt werden, dass das aktive Vitamin D₃-Analogon seinen antiproliferativen und differenzierungsfördernden Effekt über die Bildung von S1P vermittelt. Neben den Keratinozyten befindet sich auch eine Vielzahl immunkompetenter Zellen in der Haut. Eine zentrale Rolle nehmen hierbei die antigenpräsentierenden Zellen ein. Das Sphingolipid S1P greift zentral in die Homöostase der dendritischen Zellen ein, indem es mehrere Funktionen von der Antigenaufnahme bis hin zur T-Zell-Interaktion moduliert. In Gegenwart von S1P ist die endozytotische Kapazität der dendritischen Zellen vermindert.

Die topische Applikation von S1P im Mausmodell vermindert die Fähigkeit der Antigenaufnahme durch epidermale dendritische Zellen um mehr als 40 %. Antigenaufnahme, Migration und Interaktion der dendritischen Zellen mit T-Lymphozyten sind essenzielle Schritte auch bei der Pathogenese des atopischen Ekzems. Eine Dysregulation des Sphingolipid-Metabolismus könnte daher eine wichtige Rolle spielen. Viele Genmutationen sind beim atopischen Ekzem beschrieben, die einen Einfluss auf die epidermale Barriere ausüben. Prominentestes Beispiel sind Mutationen im Filaggrin-Gen: Das resultierende Protein ist als strukturgebende Komponente für die Hautbarriere essenziell. Aber auch die Lipidzusammensetzung ist beim atopischen Ekzem verändert, so dass sich keine lamellar angeordneten Lipidstrukturen ausbilden können. Vor allem Ceramide sind qualitativ und quantitativ verändert.

Der Grund für den veränderten Ceramid-Gehalt scheint darin zu liegen, dass bei Patienten mit atopischem Ekzem die Ceramid-Vorstufen anders abgebaut werden als in der gesunden Haut. Diese gestörte Barrierefunktion ist mit einem erleichterten Eindringen von Allergenen verknüpft und folglich auch mit einem erhöhten Kontakt zu den dendritischen Zellen. Darüber hinaus scheint auch der S1P-Gehalt für die Homöostase der Haut eine große Bedeutung zu besitzen. Denn beim atopischen Ekzem mehren sich Hinweise, dass die S1P-Konzentrationen vermindert sind. Verringerte S1P-Konzentrationen sind dann mit einer erhöhten Endozytosekapazität der dendritischen Zellen verknüpft. Zudem wäre die Proliferation der Keratinozyten erhöht und deren Differenzierung gestört. In Hautbiopsien lässt sich tatsächlich eine erhöhte Expression der S1P-Lyase, die das Lipid irreversibel spaltet, nachweisen.

Nicht nur der Verlauf der atopischen Dermatitis, sondern auch das allergische Kontaktekzem wird durch S1P beeinflusst. In einem murinen Kontaktallergiemodell wurde die topische Applikation von S1P untersucht. Als Hapten wurde Toluol-2,4-diisocyanat (TDI) verwendet. Die immunmodulatorische Wirkung von S1P wurde sowohl in der Sensibilisierungs- als auch in der Challenge-Phase untersucht. In der Sensibilisierungsphase verminderte S1P das Gewicht und die Zellzahl der regionären Lymphknoten (Lnn. auriculares). Tatsächlich war die Anzahl der aus der Haut in die Lymphknoten eingewanderten dendritischen Zellen nach S1P-Applikation vermindert. Auch das Zytokinmuster in den regionalen Lymphknoten wurde durch die topische Behandlung mit S1P beeinflusst. Die Lymphknoten zellen zeigten eine signifikant geringere Sekretion der Zytokine IL-6 und Interferon-gamma.

In Übereinstimmung mit der verminderten Anzahl der dendritischen Zellen im Lymphknoten zeigte



die immunhistochemische Untersuchung ein Verbleiben der antigenpräsentierenden Zellen in der Epidermis. Auch in der Auslösephase der Kontaktdermatitis hatte S1P eine antiinflammatorische Wirkung. Die topische S1P-Applikation führte zu einer reduzierten Akkumulation von T-Zellen in der Haut. Dabei scheinen folgende Effekte für das veränderte Immunverhalten verantwortlich zu sein: Zum einen zeigen immunhistochemische Untersuchungen, dass die Antigenaufnahme durch die dendritischen Zellen vermindert ist. Zum anderen ist das Migrationsverhalten dieser antigenpräsentierenden Zellen verändert, sodass sie vermehrt in der Haut bleiben und im Lymphknoten nicht für eine Interaktion mit den T-Zellen zur Verfügung stehen.

Diese Untersuchungen legen den Schluss nahe, dass lokal verabreichtes S1P eine neuartige Option in der Behandlung entzündlicher Hauterkrankungen darstellen kann. Tatsächlich existieren bereits erste S1P-Analoga, die für eine topische Applikation bei Psoriasis und Atopischer Dermatitis in einer klinischen Studie der Phase 2 getestet werden.

Hans Christian Korting hat maßgeblich zu den Erkenntnissen von spezifischen Sphingolipiden in der Haut beigetragen. Ihm ist die Vorlesung in dankbarer Erinnerung gewidmet.



Wissenschaftliches Hauptprogramm, Teil 1: Vortragssitzung
„Dermopharmazeutische Chemie und Technologie“

NMR-spectroscopic assessment of interactions between contact sensitizers and proteins of the skin

*Prof. Dr. Jean-Pierre Lepoittevin
Laboratoire de Dermatochimie, Institut de Chimie
Université de Strasbourg*

The skin, as a barrier, is daily exposed to chemicals, drugs, cosmetics, etc. It is also a metabolically competent organ involved in activation/detoxification of chemicals and a major actor of the immune system. Therefore, skin exposure to chemicals can lead to adverse toxic reactions like allergic contact dermatitis (ACD).

It is now well recognized that the first key step for induction of an ACD is the chemical interaction between the allergen or hapten and nucleophilic residues on epidermal proteins. In some cases chemicals have no obvious protein reactivity but will become reactive through a metabolic transformation/activation and will be regarded as prohapten.

For many years such interactions/activations have been studied using simple models such as amino acids or peptides in solution. If these experiments allowed gaining valuable knowledge on the chemical reactivity of skin sensitizers, they are very far from conditions present in a complex and organized 3D living epidermis.

In the recent years we have been developing the use of the High Resolution at Magic Angle Spinning (HRMAS) Nuclear Magnetic Resonance (NMR) technique to follow the behavior (reactivity/metabolism) of chemicals in 3D-Reconstructed Human Epidermis (RHE). This NMR technique, first developed to study soft solids, has been shown to be very well adapted to the in situ observation of the epidermis.

In addition to the observation of the epidermis metabolome, we have been showing that it was possible, using carbon-13 substituted molecules, to follow the reaction of haptens with nucleophilic residues and therefore characterize structures of the formed adducts as well as the nature of amino acids modified. This approach can be extended to the metabolic activation/transformations of prohapten with the ability to follow in situ how chemicals are modified and how they subsequently react with nucleophiles.

HRMAS NMR/RHE association allows investigating, in a living epidermis, chemical activations and interactions taking place between chemicals and amino acids. This technique can be a valuable tool to study the activation and behavior of prohapten and opens perspectives for the molecular understanding of ACD.



Wissenschaftliches Hauptprogramm, Teil 1: Vortragssitzung
„Dermopharmazeutische Chemie und Technologie“

Entwicklung von Methoden zur Substantivitätsprüfung von Dermatika

Dr. Dominique Lunter

*Pharmazeutische Technologie, Eberhard-Karls-Universität
Tübingen*

Hauterkrankungen werden üblicherweise mit Hilfe von topisch applizierten halbfesten Zubereitungen behandelt. Oftmals sind mehrere Applikationen pro Tag notwendig, da bis zu 90 % der Formulierung durch Kontakt mit der Umgebung von der Haut abgetragen werden. Damit wird auch der Wirkstoff von der Haut entfernt, steht daher nicht mehr zur Aufnahme in die Haut zur Verfügung und kann somit seine Wirkung dort nicht im gewünschten Maße ausüben. Eine geringe Substantivität der Formulierung kann somit den Therapieerfolg negativ beeinflussen.

Aus diesem Grund ist es sinnvoll, Formulierungen mit erhöhter Substantivität zu entwickeln, welche eine längere Zeit auf der Haut verbleiben und hier als Wirkstoffdepot fungieren. So kann der Wirkstoff über einen längeren Zeitraum zur Verfügung gestellt werden, und in der Folge kann eine ausreichende Menge des Wirkstoffs in die Haut aufgenommen werden, um eine effektive Therapie zu ermöglichen.

Für die Entwicklung solcher Zubereitungen werden Methoden benötigt, um die Substantivität zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurden mehrere Ex-vivo-Untersuchungsmethoden entwickelt, welche die Substantivität der Formulierungen charakterisieren und den Einfluss der (fehlenden) Substantivität auf die Arzneistoffaufnahme in die Haut überprüfen lassen. Die Methoden simulieren Haut-zu-Haut beziehungsweise Textil-zu-Haut-Kontakt und ermöglichen die Bestimmung der dadurch von der Haut abgetragenen Formulierungsmenge, der auf der Haut verbleibenden Formulierung und der in die Haut aufgenommenen Arzneistoffmenge. Ebenso kann der Einfluss der Formulierung, des Kontaktmaterials und der Kontakthäufigkeit auf die Substantivität dargestellt werden.

Während der Entwicklung der Methoden wurden drei unterschiedliche Formulierungstypen zur Validierung eingesetzt: eine amphiphile halb feste Creme, eine Öl-in-Öl-Emulsion und eine filmbildende Formulierung. Es konnte gezeigt werden, dass die Methoden in der Lage sind, deutliche Unterschiede in der Substantivität der Formulierungen zu detektieren.

Ebenso zeigte sich, dass das Kontaktmaterial (Haut oder Textil) einen Einfluss auf die ermittelte Substantivität ausüben. Es konnte ein deutlicher Zusammenhang zwischen fehlender Substantivität und in die Haut aufgenommener Arzneistoffmenge dargestellt werden. Dabei spielt interessanterweise auch die Kontakthäufigkeit eine entscheidende Rolle, da es mit zunehmenden Kontakten zunächst zu einer Abnahme der aufgenommenen Arzneistoffmenge kommt, bei weiterer Erhöhung der Kontakthäufigkeit hingegen wieder zu einer Zunahme.



Somit können die entwickelten Methoden einen Beitrag zum besseren Verständnis der Einflussparameter der Substantivität leisten, und die Entwicklung von Zubereitungen mit erhöhter Substantivität kann zielgerichtet durchgeführt werden. Auf lange Sicht kann so die Effektivität der Behandlung von Hauterkrankungen erhöht werden.



Wissenschaftliches Hauptprogramm, Teil 1: Vortragssitzung
„Dermopharmazeutische Chemie und Technologie“

Evaluierung antimykotisch wirksamer Formulierungen an einem infizierten Haut- und Nagelmodell

*Prof. Dr. Christel Müller-Goymann
unter Mitarbeit von S. Lusiana und A. Täuber
Institut für Pharmazeutische Technologie
Technische Universität Carolo-Wilhelmina
Braunschweig*

Pilzerkrankungen der Haut und der Nagelplatte betreffen weite Teile der Bevölkerung und werden am häufigsten durch Dermatophyten der Gattung *Trichophyton* verursacht. So tragen 5 bis 12 % der Europäer Dermatophyten in den Nägeln, wobei die Häufigkeit mit dem Alter steigt. Insbesondere Patienten mit Diabetes mellitus, Durchblutungsstörungen und Immundefekten (Seneszenz des Immunsystems) sind für Pilzerkrankungen anfällig. Zehennägel sind häufiger betroffen als Fingernägel. Eine Nagelpilzerkrankung folgt nicht selten einer unzureichend therapierten Interdigitalmykose durch Autoinfektion. Hautmykosen insbesondere zwischen den Zehen werden durch ein feucht-warmes Milieu begünstigt.

Eine Vielzahl verschiedener Arzneistoffe wird zur topischen Behandlung von Haut- und Nagelmykosen eingesetzt. In einem klassischen Agar-Diffusionstest kann die Evaluierung von antimykotisch wirkenden Arzneistoffen vorgenommen werden. Dazu wird eine Arzneistofflösung in eine Ausstanzung des mit einem Erreger infizierten Nährbodens gegeben und nach Inkubation der resultierende Hemmhof gemessen. Eine Information, inwieweit der Arzneistoff in einem infizierten Hautstück oder in einer infizierten Nagelplatte aus einer Formulierung verfügbar wird, ist auf diese Weise nicht möglich.

Ein mit *Trichophyton rubrum* infiziertes Modell der Nagelplatte wurde von Lusiana et al vorgestellt (1). Mit dem gleichen Erreger infizierte humane Stratum corneum (SC)-Stücke, die zur mechanischen Stabilisierung auf einem Polycarbonat-Membranfilter positioniert sind, eignen sich ebenfalls zur Evaluierung antimykotisch wirkender Formulierungen (2).

Sowohl zur Infektion von isoliertem humanen Stratum corneum als auch zur Infektion von bovinen Hufschleibchen oder Keratinfilm aus Humanhaar als Modelle der humanen Nagelplatte muss *Trichophyton rubrum* zunächst aktiviert werden. Dazu eignet sich ein Malz-Aktivkohle-Agar (MCM). Die aktivierte Kultur wird auf einem Kartoffel-Glucose-Agar (PGA) ausgestrichen, dieser mit SC-Membranfilter-Scheiben beziehungsweise Hufschleibchen oder Keratinfilm belegt und für 7 Tage bei 30 °C inkubiert. Nach erfolgter Infektion werden die Haut- beziehungsweise Nagelmodelle auf einen frischen Sabouraud-Dextrose-Agar (SDA) transferiert, mit den zu testenden Formulierungen in Kunststoffringen bestückt und weitere 6 Tage bei 30 °C inkubiert.



Wird der Arzneistoff aus der Formulierung freigesetzt und diffundiert in das infizierte Haut- oder Nagelmodell, wird *Trichophyton rubrum* abgetötet, das heißt am äußeren Rand des Modells ist kein Keimwachstum zu beobachten (Score 0). Ist die Verfügbarkeit des Arzneistoff unzureichend, wächst der nicht abgetötete Pilz am Rand des Modells weiter – je nach anteiligem Umfang bis zu 100 % (Score>0-10).

- (1) Lusiana, S Reichl, CC Müller-Goymann, Eur J PharmBiopharm 2013;84(3):599-605
- (2) A Täuber, CC Müller-Goymann, Int J Pharm2015;494(1):304-11



Wissenschaftliches Hauptprogramm, Teil 1: Vortragssitzung
„Dermopharmazeutische Chemie und Technologie“

Pharmazeutische Charakterisierung einer 5-Aminolävulinsäure-haltigen Nanoemulsion für die photodynamische Therapie

Prof. Dr. Hermann Lübbert
Biofrontera AG
Leverkusen

Biofrontera hat die Kombination von 5-Aminolävulinsäure (5-ALA) mit der Nanoemulsion BF-200 entwickelt und für dieses Gel unter dem Namen Ameluz® eine zentralisierte EU-Zulassung für die photodynamische Therapie milder und moderater aktinischer Keratosen auf dem Gesicht und der Kopfhaut erhalten. Das Produkt wurde in vier Phase III-Studien getestet, wobei die Überlegenheit gegenüber seinem engsten Konkurrenzprodukt nachgewiesen wurde. Diese Überlegenheit hat die EMA im Ameluz®SmPC offiziell anerkannt.

Während der pharmazeutischen Entwicklung zeigten sich die Vorteile der Nanoemulsionsformulierung besonders bei zwei Aspekten:

1. Obwohl 5-ALA sich im wässrigen Milieu der Nanoemulsion befindet, ist die Formulierung über lange Zeit stabil und kann bis zu drei Jahre gelagert werden.
2. Die Penetrationseigenschaften von 5-ALA in die Haut wurden erheblich verbessert. Dies ermöglichte die überlegenen klinischen Studienergebnisse, obwohl in der Formulierung nur 50 % der in Konkurrenzprodukten oder typischen Rezepturen enthaltenen Wirkstoffmenge eingesetzt wird.

Die höhere Stabilität beruht vermutlich auf einer nicht kovalenten Anlagerung an die Außenseite der Nanovesikel, wodurch die Dimerisierung von 5-ALA verhindert wird. Um hier die maximale Kapazität zu erreichen, wurde eine Nanoemulsion mit extrem kleiner Vesikelgröße und dadurch maximaler Oberfläche entwickelt. Die bessere Penetration entsteht nach heutiger Kenntnis durch ein Verschmelzen der lipidhaltigen Nanovesikel mit den Membranen des Stratum corneums, wodurch in letzterem die Beweglichkeit der Membranlipide verändert und die Membran durchlässiger für wasserlösliche Moleküle wird.

Die verbesserte Penetration wurde gegenüber dem direkten Konkurrenzprodukt, aber auch gegenüber Apothekenrezepturen nachgewiesen. Solche Rezepturen sind im europäischen Ausland aufgrund einer EU-Resolution weitgehend verboten. Dagegen werden sie in Deutschland immer noch in großer Zahl eingesetzt, obwohl sie in Rezepturformularen ausdrücklich wegen fehlender pharmazeutischer Stabilität und Charakterisierung nicht aufgenommen wurden und daher nach Auffassung der Berufsverbände von Ärzten und Apothekern auch nicht hergestellt werden sollten.

