

Abstracts

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



Gesellschaft für
Dermopharmazie

Vorsitzende der Vortragsitzung „Dermopharma-
zeutische Technologie und Dermatopharmakologie“:
Prof. Dr. Hans F. Merk, Aachen
Prof. Dr. Monika Schäfer-Korting, Berlin

Hans Christian Korting-Gedächtnisvorlesung

Bedeutung von Liposomen als Trägersysteme für wirkstoffhaltige Externa

Prof. Dr. Alfred Fahr

Institut für Pharmazie, Pharmazeutische Technologie

Friedrich-Schiller-Universität, Jena

Relativ spät nach Einführung der Liposomen durch Alec Bangham (1978) erschien die erste Publikation (1) über deren Verwendung als topische Arzneiform. Hier wurden multilamellare Liposomen aus Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC) und Cholesterin verwendet, um radioaktives Triamcinolon--acetonid an Kaninchen zu verabreichen. Es wurde eine Anreicherung in Epidermis und Dermis im Vergleich zu einer Salbe gefunden, wohingegen der Arzneistoff nur zu einem geringeren Maß im Urin auftrat. Dieses Ergebnis könnte erstaunen bei der Vielzahl von Studien in den letzten Jahrzehnten, die eine erhöhte Permeation von Arzneistoffen mittels Liposomen behaupten.

Aber hier scheint schon die große Zahl an (un-)bekannten Faktoren durch, die die Interaktion von Liposomen mit der Haut und damit die Penetration entscheidend mitbestimmen. In der erwähnten Studie wurden multilamellare Liposomen aus DPPC und Cholesterol verwendet. Diese Liposomen sind zu groß und zu rigide, um durch das Stratum corneum (SC) penetrieren zu können.

Die in neueren Studien verwendeten Liposomen sind meist wesentlich kleiner und bestehen meist aus einer Mischung aus fluiden Phospholipiden und oberflächenaktiven Substanzen wie z.B. Cholate, die die Phospholipidmembran des Liposoms sehr flexibel machen. In etlichen Studien konnte hiermit eine Permeationserhöhung unter nicht okklusiven Bedingungen demonstriert werden. Mit den ersten Untersuchungen wurde auch eine Wirk-Hypothese veröffentlicht (2): durch kleinste natürliche Pfade im SC werden die Liposomen durch einen osmotischen Gradienten von der Hautoberfläche bis in die Epidermis gezogen, da die Hautoberfläche wasserarm, die Epidermis dagegen stark wasserhaltig ist und die Phospholipide der Liposomen hygroskopisch sind. Es gibt verschiedene ver-ein-fachende Annahmen in dem Modell der Autoren, wonach bis zu 0,5 mg Phospholipid/cm² Haut und pro Stunde permeieren können.

In zahlreichen anderen Studien wird nach Analyse entsprechender Experimente dagegen vermutet, dass die Phospholipide und die oberflächenaktiven Substanzen mit den Lipiden des SC interagieren und auch die Lipidorganisation zwischen den Korneozyten stört und so die Penetration geeigneter Wirkstoffe durch das SC begünstigen. Einer der vielen anderen Faktoren ist auch der Weg durch die Hautanhangsgebilde, der von diesen Liposomen genutzt werden kann (3).

Korting et al. (4) untersuchten 1995 die Interaktion von Liposomen mit rekonstruierter Epidermis. Mittels Elektronenmikroskopie konnte festgestellt werden, dass sich nach Auftragen einer Liposomensuspension zahlreiche Lipidinseln im SC ausbilden. Dies könnte auch die Erklärung für die Anreicherung von Triamcinolonacetonid sein: in diesen Lipidinseln, die Größen von 1 µm



annehmen können, wird der Wirkstoff gebunden und kann so nicht weiter permeieren.

Neben den Liposomen haben sich auch die sogenannten Ethosomen etabliert. Diese bestehen aus Phospholipiden und einer überraschend hohen Ethanolkonzentration (bis zu 50 %). Mit der Kenntnis, dass Ethanol selbst ein guter Penetrationsverstärker ist, lässt sich ein möglicher Mechanismus einfach herleiten: das Ethanol der auf die Haut aufgetragenen Ethosomen dringt in das SC ein, lockert dabei die Lipidstruktur auf, Ethosomen können nun in die aufgelockerte Lipidschicht etwas eindringen, die Phospholipide der Ethosomen fusionieren mit den Lipidstrukturen, setzen Ethanol frei, das nun die tieferen Lipidstrukturen auflockert – und so weiter.

Ganz ohne Phospholipide kommen Niosomen aus. Niosomen bestehen meistens aus nicht ionischen Tensiden mit einer Alkylkette, aber auch andere Substanzen wie Fettalkohole werden verwendet. Auch hier wird die penetrierende Wirkung durch die Interaktion mit den interzellulären Lipiden des SC erklärt. Eine Vielzahl von Studien existiert, die Permeationsförderung von Niosomen für verschiedene Wirkstoffe (hauptsächlich NSAIDs) mit den anderen beschriebenen Trägersystemen zu vergleichen. Die vielen Resultate erlauben noch keine gesicherten Korrelationen.

Neben der durch viele Experimente gesicherten Evidenz, dass alle beschriebenen vesikulären Systeme mit den Lipiden des SC interagieren (zusammengefasst z.B. in Ashtikar et al.⁵), blieb im letzten Jahr–zehnt die Frage offen, ob tatsächlich vesikuläre Systeme im Ganzen durch das SC penetrieren. Auch hier wurden verschiedenste Methoden eingesetzt, die aber nur indirekte Schlüsse zuließen. Erst kürzlich konnte mit recht aufwendigen Verfahren nachgewiesen werden, dass zwar tatsächlich Liposomen in Gänze durch das SC penetrieren können. Die nachgewiesene Anzahl der Liposomen, die diesen Weg geschafft haben, ist aber sehr klein (ca. 0.0003 % der eingesetzten Liposomen).

Dies bedeutet, dass die Penetrationsvermittlung der vesikulären Systeme für Wirkstoffe sich hauptsächlich durch die Auflockerung der Lipidstruktur im SC erklären lässt. Die oft beobachtete höhere Permeationsförderung durch die Kombination Liposomen mit Penetrationsförderer gegenüber Penetrationsförderer alleine könnte durch die strukturbildende Fusion der Phospholipide mit den Lipiden des SC vermutet werden, die die aufgelockerte Struktur stabilisiert oder gar hydrophile Kanäle bildet, durch die Wirkstoffe besser oder länger permeieren lässt (und dann auch Platz für einige Liposomen lässt, die den Weg durch das SC unbeschadet überstehen). Auch bei diesen Trägersystemen gilt wie bei allen anderen Externa, dass Wirkstoff und Hilfsstoff eine funktionale Einheit bilden und somit neue Rezepturen immer ein Wagnis darstellen und noch kein Orakel existiert, das die richtige Kombination vorhersagen kann. Die vielen durchgeführten Studien geben aber recht zuverlässige Hinweise, zu welchen Liposomen der Entwickler für medizinisch wirksame oder kosmetische Formulierungen greifen sollte.

Kommen wir aber noch einmal auf die geringe Anzahl Liposomen zurück, die nach unseren Untersuchungen (0,0003 %) den Weg in die Epidermis schaffen. Korting et al. haben nachgewiesen, dass Keratino–zyten sehr gut Liposomen aufnehmen können⁶. Wir konnten nur ca. 130 Liposomen auf 100 μm^2 in den untersten SC-Schichten nachweisen, aber so sind es doch ca. 50 Liposomen pro Keratinozyt in der mediären Epidermis. Dies könnte bei hochpotenten



Arzneistoffen durchaus zur Wirkung führen.

Sicher ist jedoch, dass in den meisten kosmetischen liposomalen Präparaten diese Fragestellung nicht auftritt. Hier sind eher die Wirkung auf das SC, wie die Hydratisierung und das Hauterscheinungsbild, vorrangig. Dagegen werden für die medizinische Anwendung je nach Bedarf Liposomen verwendet, die zumindest den Arzneistoff besser permeieren lassen.

Schon allein in dieser kurzen Zusammenfassung der Gedächtnisvorlesung kann erahnt werden, wie wegweisend die liposomen-orientierten Arbeiten von H. C. Korting für dieses Gebiet sind. Ihm ist diese Vorlesung in Dankbarkeit gewidmet.

Literatur

1. Mezei M, Gulasekhar V. Liposomes—a selective drug delivery system for the topical route of administration I. Lotion dosage form. *Life Sci* 1980;26(18):1473-77.
2. Cevc G, Blume G. Lipid vesicles penetrate into intact skin owing to the transdermal osmotic gradients and hydration force. *Biochim Biophys Acta* 1992 February 2;1104(1):226-32.
3. Verma DD, Verma S, McElwee KJ, Freyschmidt-Paul P, Hoffman R, Fahr A. Treatment of alopecia areata in the DEBR model using Cyclosporin A lipid vesicles. *Eur J Dermatol* 2004;14(5):332-8.
4. Korting HC, Stolz W, Schmid MH, Maierhofer G. Interaction of liposomes with human epidermis reconstructed in vitro. *Br J Dermatol* 1995 Apr;132(4):571-9.
5. Ashtikar M, Nagarsekar K, Fahr A. Transdermal delivery from liposomal formulations—Evolution of the technology over the last three decades. *Journal of Controlled Release* 2016;242:126-40.
6. Korting HC, Schmid MH, Hartinger A, Maierhofer G, Stolz W, Braun-Falco O. Evidence for the phagocytosis of intact oligolamellar liposomes by human keratinocytes in vitro and consecutive intracellular disintegration. *J Microencapsul* 1993 Apr-Jun;10(2):223-8.



Wissenschaftliches Hauptprogramm (Teil 1): Dermopharmazeutische Technologie und Dermatopharmakologie

Neue Forschungsergebnisse zu den Möglichkeiten der transkutanen Immunisierung

Priv.-Doz. Dr. Julia Engert

Lehrstuhl für Pharmazeutische Technologie

Ludwig-Maximilians-Universität, München

Impfungen sind eine der erfolgreichsten Interventionen, um die Ausbreitung von Infektionskrankheiten zu verhindern. Obwohl Millionen von Impfstoffdosen jedes Jahr verabreicht werden, besteht ein Bedarf, die Stabilität von Impfstoffen und deren Art der Verabreichung zu verbessern. Heutzutage handelt es sich bei der Mehrzahl der Impfstoffe um flüssige Zubereitungen, die eine Verabreichung mit Nadel und Spritze erforderlich machen. Abgesehen von den negativen Auswirkungen auf die Akzeptanz durch den Patienten (Schmerz, Nadelphobien), können auch Stabilitätsprobleme in Bezug auf den flüssigen Impfstoff auftreten, die eine Kühlkette für Lagerung und Transport unvermeidlich machen.

Bei der Suche nach neuen, nadelfreien Impfstrategien ist die epidermale Pulverimmunisierung (EPI) ein vielversprechender Ansatz [1]. Bei der EPI werden trockene Impfstoffpartikel auf hohe Geschwindigkeit beschleunigt und in die Haut eingebracht, wodurch die Verwendung von Nadeln und Spritzen vermieden wird [2, 3]. Idealerweise erfolgt die Deposition der Partikel in der Epidermis, in der Blutgefäße und Nervenendigungen fehlen, wodurch die Verabreichung schmerzfrei ist und somit die Patienten-Compliance verbessert wird.

In dieser Arbeit präsentieren wir die Ergebnisse einer In-vivo-Studie in Ferkeln unter Verwendung eines getrockneten Influenza-Modell-Impfstoffs, der mit einem neuartigen pyrotechnisch-betriebenen Applikator appliziert wurde. Der flüssige Influenza-Impfstoff (Pandemrix®) wurde zunächst aufkonzentriert und dann mittels Gefriertrocknung in ein trockenes Pulver überführt. Das Pulver wurde durch den Einsatz öligler Adjuvantien auf einer Membran des Applikators angeheftet. Der pyrotechnische Applikator beschleunigte die Partikel auf Überschallgeschwindigkeit, welche mittels Hochgeschwindigkeitskameras bestimmt wurde [4]. In einer In-vivo-Studie wurden Ferkel zweimal mit dem neuen pyrotechnischen Applikator oder der klassischen intramuskulären Injektion immunisiert. Blutproben der Tiere wurden zu verschiedenen Zeitpunkten gesammelt und die Antikörpertiter mittels ELISA bestimmt [5].

Die Ergebnisse unserer Studie zeigen, dass die Beschleunigung eines getrockneten Impfstoffpulvers auf Überschallgeschwindigkeit mit dem pyrotechnischen Applikator möglich ist. Die Geschwindigkeit ist ausreichend, um das Stratum corneum der Ferkelhaut zu durchbrechen. Die Verabreichung des trockenen Impfstoffpulvers führte zu messbaren Anti-H1N1-Antikörpertitern in vivo [6].



Diese Arbeit wurde durch das Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF), Deutschland, gefördert (Förderkennzeichen FKZ 13N11315 - 13N11319).

Referenzen

1. Mitragotri, S., Immunization without needles. *Nat Rev Immunol*, 2005. 5(12): p. 905-916.
2. Chen, D., Y.-F. Maa, and J.R. Haynes, Needle-free epidermal powder immunization. *Expert Review of Vaccines*, 2002. 1(3): p. 265-276.
3. Chen, D. and L.G. Payne, Targeting epidermal Langerhans cells by epidermal powder immunization. *Cell Res*, 2002. 12(2): p. 97-104.
4. Lell, P., et al. Needleless injection device having a gel and a membrane. WO2016062825 (A1)
5. Anamur, C., Novel formulation approaches for ballistic intradermal vaccination, in Ph.D. thesis, Department of Pharmacy. 2015, Ludwig-Maximilians-University Munich.
6. Engert, J., et al., In vivo study in piglets using a novel pyrotechnically driven applicator for epidermal powder immunization. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2017(submitted).



Wissenschaftliches Hauptprogramm (Teil 1): Dermopharmazeutische Technologie und Dermatopharmakologie

Neue pharmakologische Erkenntnisse zum antientzündlichen Potenzial von Sphingosin-1-phosphat

Priv.-Doz. Dr. Julia Engert

Lehrstuhl für Pharmazeutische Technologie

Ludwig-Maximilians-Universität, München

Lange Zeit als bloße Strukturkomponente der Lipiddoppelmembran bekannt, wurde das Lysosphingolipid Sphingosin-1-phosphat (S1P) in den letzten Jahrzehnten als wichtiger Lipidmediator identifiziert, der ähnliche Wirkungen wie Wachstumsfaktoren aufweist. Über fünf G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (S1P1 - S1P5) vermittelt S1P vielfältige zelluläre Effekte wie Inflammation, Angiogenese, Zellmotilität, Calcium-Freisetzung, Zytoprotektion und Umstrukturierung des Zytoskeletts. In der Haut werden Zellproliferation und Zellmigration von Keratinozyten und Fibroblasten durch S1P reguliert. S1P-Analoga wurden zudem als Arzneistoffkandidaten für die Behandlung von hyperproliferativen, entzündlichen Hauterkrankungen identifiziert.

Neben der zentralen Beeinflussung der Steuerung der Lymphozytenzirkulation zwischen Blut und Lymphsystem zeigen neuere In-vitro-Untersuchungen direkte immunmodulatorische Wirkungen von S1P auf dendritische Zellen. Dendritische Zellen und Langerhans-Zellen sind entscheidend für die Entstehung und Aufrechterhaltung entzündlicher Hauterkrankungen wie des atopischen Ekzems, der Psoriasis oder allergischen Kontaktdermatitis. In vitro differenzierte humane Langerhans-Zellen exprimieren vor allem S1P1 und S1P2. In aktivierten Zellen vermittelt S1P antientzündliche Wirkungen durch Beeinflussung der Zellmigration und Zytokinproduktion. Die endozytotische Kapazität von unreifen humanen Langerhans-Zellen wird durch S1P nicht beeinflusst.

Im Gegensatz zur antientzündlichen Wirkung in Immunzellen fördert S1P bei hohen Konzentrationen Entzündungsreaktionen in Keratinozyten und Fibroblasten. Ein „cross-talk“ zwischen S1P- und Toll-like-Rezeptor-Signalwegen verstärkt dabei konzentrationsabhängig die Freisetzung proinflammatorischer Chemokine und Zytokine.



Wissenschaftliches Hauptprogramm (Teil 1): Dermopharmazeutische Technologie und Dermatopharmakologie

Farbstoff-Lösungen für die dermatologische Lokaltherapie – Update aus pharmazeutischer Sicht

Dr. Holger Reimann

Neues Rezeptur-Formularium (NRF)

Pharmazeutisches Laboratorium

Eschborn

Beginnend mit der Methylenblau-Synthese 1877 werden Farbstoffe in der topischen Behandlung seit nunmehr 140 Jahren angewendet. Über 100 Jahre lang nahmen sie einen festen Platz als Antiinfektiva ein. Zum Teil wurden bis zu zehn unterschiedliche Farbstoffe in antibakteriell, antimykotisch und zum Teil austrocknend wirkenden Zubereitungen angewendet. Die Substanzen aus den chemischen Stoffklassen der Triphenylmethan-, Xanthen-, Phenazin-, Phenothiazin-, Acridin-, Azo- und Chinolinfarbstoffe zeigen eine starke Bindung an Zellbestandteile und sind intensiv gefärbt.

Zum Bedeutungsverlust der meisten Substanzen als Arzneistoffe haben zunächst der unklare Beleg der tatsächlichen Wirksamkeit und die fehlende pharmazeutische Standardisierung beigetragen. Nur wenige Farbstoffe, wie das Ethacridinlactat, das Chinolinolsulfat und das Clioquinol, wurden mit Einführung des Arzneimittelgesetzes registriert und „überlebten“ in den 1990er-Jahren die mit dem Nachweis von Wirksamkeit und Unbedenklichkeit verbundene Nachzulassung als Fertigarzneimittel. Überwiegend wurden aber auch diese Substanzen und Farbstoffe rezepturmäßig verschrieben und in Apotheken hergestellt. Keine der Substanzen wurde zur externen Anwendung der Verschreibungspflicht unterstellt.

Steigende Reinheitsforderungen der Arzneibücher führten in den letzten 20 Jahren dazu, dass einige Substanzen nicht mehr in der erforderlichen pharmazeutischen Qualität hergestellt werden konnten (Brillantgrün, Fuchsin N), während andere nicht mehr als Rezeptursubstanzen für Apotheken angeboten werden (Methylthioniniumchlorid, Methylrosaniliniumchlorid). Auch die strengere toxikologische Bewertung der Substanz selbst (Brillantgrün) oder wesentlicher Komponenten (Parafuchsin in dem Triphenylmethanfarbstoffgemisch „Fuchsin“) führten zum „Aus“ für früher für unverzichtbar gehaltene Verbindungen.

Forciert wurde dies durch die mit der Novelle der Apothekenbetriebsordnung 2012 hergestellte verbesserte Nachverfolgbarkeit und Risikobeurteilung bei Rezepturverordnungen. Bezeichnend ist die Wandlung der als „Castellani-Lösung“ bekannt gewordenen „Carbol-Fuchsin-Lösung“ zur schließlich rational zu beurteilenden wässrigen Lösung des Parafuchsin-freien Fuchsin N im Jahre 2014 bis zum vorläufigen Schlusspunkt, der Streichung der Zubereitung in der zeitgemäßen Formelsammlung NRF 2016. Der Wirkstoff kann nicht mehr zu einem vernünftigen Preis hergestellt werden.



Als letzter kationischer Triarylmethanfarbstoff kann nach einer NRF-Rezepturvorschrift noch Methylrosaniliniumchlorid verordnet werden. Hergestellt werden muss es allerdings aus einer bereits vorgefertigten 0,5-prozentigen Lösung, die in der Apotheke auf meist 0,1-prozentige Konzentration verdünnt wird. In der Hautbehandlung bei Staphylokokkenbesiedlung oder Infektion sowie in der Wundbehandlung stehen als nebenwirkungsarme Lokalantiseptika Polihexanid und Octenidindihydrochlorid zur Verfügung und sind wegen fehlender Hemmung der Wundheilung zu bevorzugen. Eine gewisse Berechtigung könnte Methylrosaniliniumchlorid wegen seiner austrocknenden Wirkung bei Gehörgangsmykosen haben, aber auch hier gibt es, beispielsweise mit Ciclopirox, potentere Alternativen.

Eosin, ein anionische Xanthenfarbstoff hat nur eine sehr schwache antimikrobielle Wirkung, wird aber wegen geringer unerwünschter Wirkungen und eines gewissen adstringierenden Effekts gelegentlich zum Schutz empfindlicher Hautpartien als Rezepturarzneimittel angewendet. Hier „konkurrieren“ diese mit industriell als Medizinprodukte hergestellten Präparaten. Neben der toxikologisch-therapeutischen Nutzen-Risiko-Beurteilung kehrt sich bei den Farbstoffen auch ihre Besonderheit mit der – zum Teil irreversiblen – Verfärbung von Kleidung, Bettwäsche und Gegenständen zum Nachteil.

Die Phenothiazinfarbstoffe, Methylthioniniumchlorid und Toloniumchlorid werden in Randbereichen oder außerhalb der Dermatologie in bestimmten Nischen als Therapeutika oder Diagnostika angewendet, wie dem Collins-Test und der Chromopertubation in der Gynäkologie, der Fisteldiagnostik, der photodynamischen Therapie in der Mundhöhle, und – wie andere Adsorptivfarbstoffe – zur Anfärbung von Metaplasien bei der Chemoendoskopie. Sie stehen als Medizinprodukte zur Verfügung. Wurden früher kationische Triarylmethanfarbstoffe als „Hauttinte“ zur Markierung für die chirurgische Schnittführung oder für die Strahlenbehandlung verwendet, so werden dafür nur noch in seltenen Fällen Kombinationen aus Silbernitrat und dem Lebensmittelfarbstoff Patentblau V rezeptiert.



Wissenschaftliches Hauptprogramm (Teil 1): Dermopharmazeutische Technologie und Dermatopharmakologie

Objektivierbarkeit von Akneläsionen zur Wirksamkeitsanalyse neuer Aknetherapeutika

*Prof. Dr. med. Prof. Dr. h.c. Christos Zouboulis
Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie
Städtisches Klinikum Dessau*

unter Mitarbeit von Markus Becker

Eine präzise und zuverlässige Beurteilung der Akne-Schwere ist unbestritten die wichtigste klinische Methode in der täglichen Praxis, wenn es um die Klassifikation der Erkrankung und die Auswahl der optimalen Behandlung geht.

Seit den frühen 1960er-Jahren wurden in der Literatur verschiedene Schwere-Beurteilungssysteme beschrieben. Die beiden häufig verwendeten Begriffe sind die globale Beurteilung und die Beurteilung nach der Läsionszählung. Beide Systeme wurden betreffend ihrer Objektivität und Reproduzierbarkeit kontrovers diskutiert; jedoch besitzen beide einen erheblichen Grad von Subjektivität.

Zu den Methoden, die eine objektive Beurteilung der Schwere der Akne fördern, gehören Fotografie, Fluoreszenz-Fotografie, polarisierte Lichtfotografie, Kinematographie, Video-Mikroskopie und multispektrale Bildgebung. Solche Techniken haben Einschränkungen, wie hohe Kosten, komplexe und anspruchsvolle Vorrichtungen, und sind manchmal zeitintensiv. Eine Kombination der alten Verfahren und der neu entwickelten Technologien können die Probleme der inter- und intraindividuellen Subjektivität reduzieren.

