

Vortragsszusammenfassungen

Symposium der GD-Fachgruppen
Dermatopharmakologie und -toxikologie



Neue Untersuchungsmethoden zur
Bewertung dermalen Effekte
von Arzneimitteln

Einsatz rekombinanter Cytochrome P450 für eine prädiktive Arzneimittel-Entwicklung

*Prof. Dr. Johannes Doehmer,
Technische Universität, München*

Der Einsatz neuartiger experimenteller Verfahren gibt die Möglichkeit, den Prozess der Arzneimittel-Entwicklung zu beschleunigen und gleichzeitig experimentelle Ergebnisse zu generieren, die im Gegensatz zu Ergebnissen aus tierexperimentellen Befunden für die Anwendung beim Menschen prädiktiver sind.

Als ein Beispiel für einen neuartigen Ansatz in der Arzneimittel-Entwicklung wird der Einsatz rekombinanter Cytochrome P450 präsentiert, mit denen sich Fragestellungen bezüglich des Metabolismus eines Arzneimittel-Kandidaten und den damit verbundenen pharmakologischen und toxikologischen Konsequenzen in besonders prädiktiver Weise für den Menschen lösen lassen.

Cytochrome P450 sind die Schlüsselenzyme im Arzneimittel-Stoffwechsel und sind weitgehend entscheidend für die pharmakologische und/oder toxikologische Wirksamkeit von Arzneimitteln.

Mittels gentechnologischer und zellbiologischer Verfahren wurden die Arzneimittel-relevanten Cytochrome P450 des Menschen kloniert und einzeln in kultivierbaren Zellen des Chinesischen Hamsters (V79) wieder stabil exprimiert. Da V79-Zellen selber keine Cytochrome P450 exprimieren, sind die gentechnologisch veränderten Zellen für die Expression eines klonierten Cytochroms P450 definiert. An diesen Zellen lässt sich eine Vielzahl von Fragestellungen bezüglich der Metabolisierung eines Arzneimittels klären, wie metabolische Stabilität oder Umsatzgeschwindigkeit, welche Metabolite entstehen, und erkennen, ob Wechselwirkungs-Probleme mit anderen Arzneimitteln zu erwarten sind.

Am Beispiel der Cytochrom P450 2D6-exprimierenden V79-Zelllinie werden diese Möglichkeiten für das Bufuralol und Tamoxifen dargestellt. Cytochrom P450 2D6 macht zwar nur 1 % aller in der Leber exprimierten Cytochrome P450 aus. Allerdings ist dieses Cytochrom P450 mit 30 % Wahrscheinlichkeit für den Metabolismus von Arzneimitteln verantwortlich. Darüber hinaus ist das Cytochrom P450 2D6 bedingt durch genetische Unterschiede außerordentlich variabel, so dass es zu enormen individuellen Unterschieden im Metabolismus kommen kann. Bislang sind mehr als 40 genetische Unterschiede bekannt („Polymorphismus“). Die meisten dieser genetischen Unterschiede führen zu einem vollständigen enzymatischen Ausfall („schwache Metabolisierer“). Fünf dieser Unterschiede resultieren in einem aktiven Cytochrom P450, allerdings mit unterschiedlichen Aktivitäten. Diese fünf voneinander



abweichenden Cytochrome P450 2D6 wurden kloniert und einzeln in V79 Zellen exprimiert. Mit diesen Zellkulturen lässt sich somit - wie am Beispiel von Bufuralol und Tamoxifen gezeigt - der Varianten-abhängige Metabolismus aufklären. Diese Ergebnisse kombiniert mit einer genetischen Diagnostik erlauben für jeden einzelnen Patienten vorherzusagen, wie schnell ein bestimmtes Arzneimittel metabolisiert wird („Personalisierte Medizin“). Entsprechend lässt sich die Auswahl des Arzneimittels und die Dosierung individuell anpassen und somit die Arzneimittel-Wirksamkeit und Arzneimittel-Sicherheit erhöhen.



Toxikologische Bewertung von dermalen nanopartikulären Systemen

*Prof. Dr. med. Horst Spielmann,
Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR), Berlin*

Nanotechnologie beschreibt die Untersuchung, Anwendung und Herstellung von Strukturen, molekularen Materialien und Systemen mit einer Größe unterhalb von 100 Nanometern (nm). Allein aus der Nanoskaligkeit der Systemkomponenten resultieren dabei neue Eigenschaften zur Verbesserung bestehender oder Entwicklung neuer Produkte und Anwendungen. Partikel mit einem Durchmesser von 10 nm besitzen gegenüber Partikeln mit einem Durchmesser von 1 µm bei gleicher Masse eine ca. 300 mal größere Oberfläche, und ihre Anzahl ist 100-fach größer. Eine Ursache für die (im Vergleich zu größeren Partikeln) neuen Eigenschaften von Nanopartikeln (NP) sind der erhöhte Anteil von Oberflächenatomen an der Gesamtzahl von Atomen des Partikels und quantenmechanische Effekte.

NP können im Vergleich zu größeren Partikeln veränderte physikalische Eigenschaften besitzen, wie zum Beispiel Leitfähigkeit, Farbe, Transparenz, Dichte etc. Sie können andere chemische und physikalisch-chemische Eigenschaften aufweisen, wie zum Beispiel Reaktionsfähigkeit, katalytische Eigenschaften, Löslichkeit, Struktur. Sie können zur Änderung der biologischen Eigenschaften führen, wie zum Beispiel Membrangängigkeit, Diffusionseigenschaften und Aufnahme über die Lungen. Diese Faktoren könnten im Vergleich zu größeren Partikeln desselben Materials dazu führen, dass NP ein stärkeres Gefährdungspotential besitzen.

Das größte Gefährdungspotential weist erwartungsgemäß die Aufnahme von NP über die Lunge auf, da sie besonders tief in die Atemwege gelangen können. Weniger kritisch ist die Aufnahme mit der Nahrung anzusehen, obwohl bekannt ist, dass Nahrungsergänzungstoffe, wie zum Beispiel Vitamine, heute als NP in Nahrungsmitteln eingesetzt werden.

Vor der möglichen Gefährdung durch NP bei Applikation auf die Haut, wenn sie als Bestandteile von Kosmetika und anderen Dermatika eingesetzt werden, hat kürzlich das SCCP, Scientific Committee on Consumer Products, der EU Kommission gewarnt und zusätzliche sicherheitstoxikologische Prüfungen verlangt. Das SCCP unterscheidet in seinem Gutachten zwei Gruppen von NP, einmal lösliche beziehungsweise abbaubare NP, wie sie zum Beispiel in kosmetischen Formulierungen als Liposomen, Nanokapseln, Nanoemulsionen und Oleosomen eingesetzt werden, und zum anderen unlösliche NP, wie zum Beispiel TiO₂, das als UV-Filterstoff in Sonnenschutzmitteln verwendet wird.

Aus Sicht des SCCP ist für die löslichen NP die konventionelle Risikobewertung wahrscheinlich ausreichend, während für unlösliche NP zusätzlich Partikelgröße und Oberfläche bei der Risikobewertung zu berücksichtigen sind. Da nach systemischer Aufnahme von unlöslichen NP eine Anreicherung in vielen Organsystemen möglich erscheint und toxische Effekte zu



erwarten sind, fordert das SCCP vor allem zusätzlich Studien zu ihrer Aufnahme über die gesunde und verletzte Haut und ausführlich toxikologische Studien, unter anderem, um zu ermitteln, ob unlösliche NP in der Schwangerschaft über die Plazenta den Embryo erreichen können.

Insbesondere schlägt das SCCP wegen der umfangreichen Verwendung von unlöslichen NP als UV-Filterstoffe in Sonnenschutzmitteln vor, dass diese vordringlich einer ausführlichen toxikologische Bewertung unterzogen werden sollten.



Vorhersage der Hautpenetration durch Freisetzungsexperimente – Wunsch oder Wirklichkeit?

*Dr. Ulrich Schäfer,
Biopharmazie und Pharm. Technologie,
Universität des Saarlandes, Saarbrücken*

Freisetzungsexperimente von halbfesten, dermal anzuwendenden Zubereitungen werden seit langer Zeit durchgeführt und haben ihren Niederschlag in den einschlägigen Pharmakopöen, aber auch verschiedenen Guidance, wie zum Beispiel SUPAC-SS der FDA [1], gefunden. Das Gleiche gilt auch für transdermale therapeutische Systeme. Folgende Anforderungen an die Durchführung von Freisetzungsversuchen sind zu erfüllen: i) Trennung von Donor- und Akzeptorkompartiment, so dass keine Vermischung und Änderung der Zubereitung erfolgt, ii) die Trennmembran darf nicht Geschwindigkeit bestimmend sein, iii) der Akzeptor muss gewährleisten, dass Sink-Bedingungen während der gesamten Versuchszeit eingehalten werden, iv) der Donor wird aus Gründen der kinetischen Auswertung in einer infiniten Dosis eingesetzt, v) bei finiter Dosis, die im Allgemeinen mit den Pharmakopöen nicht konform geht, sind spezielle Auswertungen vorzunehmen. Im Allgemeinen erfolgt die Freisetzung aus halbfesten Zubereitungen gemäß einer Matrixkontrolle, so dass die Auswertung nach der Quadratwurzelgleichung erfolgen kann, die von Higuchi sowohl für Lösungssalben als auch für Suspensionssalben aufgestellt wurde. Als Charakterisierungsparameter werden die Lag-Zeit und die Freigabekonstante, die die maximal mögliche Freisetzung beinhaltet, benutzt. Nach SUPAC-SS ist ein statistischer Vergleich zweier Zubereitungen möglich. In einem gewissen Gegensatz zu diesen Freisetzungsmessungen stehen In-vitro-Messungen mit exzidierte Haut oder auch, in neuerer Zeit, mit Epidermis- oder Hautäquivalenten. Bei diesen Versuchen ist die Zubereitung in direktem Kontakt mit dem Resorptionsorgan, und somit können Interaktionen zwischen Zubereitung und Target mit erfasst werden. Dadurch erhält man ein realitätsnahes Modell, was durch In-vitro-in-vivo-Korrelationen nachgewiesen werden konnte.

Immer wieder wurde versucht, Freisetzungsmessungen zur Optimierung dermalen halbfester Zubereitungen einzusetzen. Allerdings zeigt ein Literaturüberblick, dass zwischen Freigabeuntersuchungen und Penetrationsstudien an Haut kein Zusammenhang gefunden werden konnte. So konnten Wagner et al. [2] zeigen, dass zwischen der Arzneistoffmenge im Stratum corneum und der Freisetzungskonstanten kein Zusammenhang besteht. Ebenfalls ergab sich für die Hauptkomponente von Teebaumöl, Terpinen-4-ol, zwischen Freigabe- und Hautpenetrationsdaten [3] kein Zusammenhang. Selbst für transdermale Therapeutische Systeme sind kaum Zusammenhänge zwischen Freisetzung und Absorption beschrieben. Die Ursachen sind im Mechanismus der Hautresorption begründet. Hilfsstoffe der Zubereitungen können in verschiedenster Weise mit der Haut interagieren, zum Beispiel über pull- oder push-Effekte, und somit zu ganz anderen Ergebnissen führen. Noch komplizierter wird es, wenn



metabolische Effekte dazukommen. Daher ist aus heutiger Sicht zu sagen: Die Vorhersage der Hautpenetration durch Freisetzungsexperimente ist nach wie vor ein Wunsch und noch nicht Wirklichkeit geworden. Vielleicht besteht aber durch Einsatz hautähnlicher Membranen die Möglichkeit, die Hautresorption durch einfache ‚Freisetzungsversuche‘ besser vorhersagen zu können. Erste Ansatzmöglichkeiten sind hierbei mit Hautlipiden getränkte Filter und biotechnologisch hergestellte Hautsubstitute.

[1] Guidance for Industry. Nonsterile semosolid dosage forms: Scale-up and postapproval changes: Chemistry, manufacturing, and controls; In vitro release testing and in vivo bioequivalence documentation. FDA (CDER), 1997

[2] Wagner H, Kostka K-H, Adelhardt W, Schaefer UF: Effects of various vehicles on the penetration of flufenamic acid into human skin, E. J. of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, Vol. 58, 121-129, 2004

[3] Reichling J, Landvatter U, Wagner H, Kostka K-H, Schaefer UF: In vitro studies on release and human skin permeation of Australian tea tree oil (TTO) from topical formulations, E. J Pharm Biopharm Vol. 64, 222-228, 2006



Einsatz von optischen Untersuchungsmethoden in der Dermatopharmakologie

*Prof. Dr. Dr.-Ing. Jürgen Lademann
unter Mitarbeit von L. E. Meyer und M. Darvin,
Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie
Charité Universitätsmedizin, Berlin*

Die Darstellung der Hautoberfläche für den Nachweis und zur Unterscheidung von Hautveränderungen ist Voraussetzung für Diagnose und Therapiekontrolle in der Dermatologie und Kosmetik. In den letzten Jahren hat sich eine rasante Entwicklung auf dem Gebiet der optischen Untersuchungsmethoden im medizinischen Bereich und speziell in der Dermatologie vollzogen. Sie unterstützen den Dermatologen bei der visuellen Begutachtung der Haut und geben Einblicke auch in tiefere Gewebeschichten. Der Einsatz von optischen In-vivo-Untersuchungsmethoden erfolgt mit dem Ziel, pathologische Zustände zu erkennen und während des Therapieprozesses zu verfolgen.

Optische Methoden ermöglichen eine Charakterisierung der physiologischen Hautparameter sowie die Verteilung und Penetration von topisch applizierten Substanzen. Sie sind Grundlage für die Entwicklung und Optimierung von Arzneimitteln und kosmetischen Produkten.

Die Fluoreszenz-Laser-Scan-Mikroskopie (LSM) findet eine breite Anwendung bei Untersuchungen zur Penetration und Verteilung von topisch applizierten Substanzen, welche fluoreszieren oder mit einem Farbstoff markiert sind. Darüber hinaus ist diese Methode sehr gut geeignet, um die Hautmorphologie darzustellen. Obwohl gegenwärtig die Laser-Scan-Mikroskopie hauptsächlich in der Forschung eingesetzt wird, handelt es sich hierbei um eine vielversprechende Methode zur Diagnose und zur Kontrolle des Therapieverlaufes in der Dermatologie.

Der Einsatz der Laser-Scan-Mikroskopie im Reflektionsmodus erfordert nicht den Einsatz von fluoreszierenden Substanzen. Diese Methode ist sehr gut geeignet, um nicht invasiv zelluläre Veränderungen zu diagnostizieren.

Nachdem es gelungen ist, die Auflösung der optischen Kohärenztomographie (OCT) stark zu verbessern, ist dieses Verfahren auch für die Dermatologie und kosmetische Forschung interessant. In Analogie zu histologischen Schnitten erzeugt die optische Kohärenztomographie auf nicht invasivem Weg vertikale Abbildungen von der Haut. Morphologische Veränderungen können mit dieser Methode sehr gut sichtbar gemacht werden. Im vorliegenden Beitrag werden diese verschiedenen optischen Untersuchungsmethoden dargestellt und bezüglich ihrer Einsatzmöglichkeiten in der Dermatopharmakologie bewertet.



Einsatz der Multiphotonen-Spektroskopie zur Untersuchung der Penetration von kosmetischen Mitteln

*Prof. Dr. Karsten König,
Jenlab GmbH, Jena*

Klinische Multiphotonen-Tomographie und Zweiphotonen-Endoskopie liefern den Klinikern und Forschern nicht invasive hochauflösende optische In-vivo-Biopsien. Diese basieren auf der Zweiphotonen-Autofluoreszenz, der Generation der Zweiten Harmonischen (SHG) und dem Fluoreszenzlebensdauer-Imaging.

Wir berichten vom Tomographen Dermalinspect? und Applikationen im Bereich der Frühsterkennung von Melanomen, der Hautalterung, dem Nanopartikel-Imaging, dem Tissue-Engineering und dem In-situ-Screening pharmazeutischer und kosmetischer Wirkstoffe. Bislang wurden mehr als 500 Patienten und Probanden in Europa, Asien und Australien mit diesen neuartigen Werkzeugen der molekularen Bildgebung untersucht.

K. König, I. Riemann: High-resolution multiphoton tomography of human skin with subcellular spatial resolution and picosecond time resolution. *Journal Biomedical Optics* 8 (3), 432-439, 2003

T. Richter, C. Peuckert, M. Sattler, K. König, I. Riemann, U. Hintze, K.P. Wittern, R. Wiesendanger, R. Wepf: Dead but highly dynamic – the stratum corneum is divided into three hydration zones. *Skin Pharmacol Physiol.* 17, 246-257, 2004

K. König, K. Schenke-Layland, I. Riemann, U.A. Stock: Multiphoton autofluorescence imaging of intratissue elastic fibers. *Biomaterials* 26, 495-500, 2005

K. König, A. Ehlers, F. Stracke, I. Riemann: In vivo drug screening in human skin using femtosecond laser multiphoton microscopy. *Skin Pharmacol Physiol* 19, 78-88, 2006

M.J. Köhler, K. König, P. Elsner, R. Bückle, M. Kaatz: In vivo assessment of human skin aging by multiphoton laser scanning tomography. *Optics Letters.* 31, 2879-81, 2006

A. Ehlers, I. Riemann, M. Stark, K. König: Multiphoton fluorescence lifetime imaging of human hair. *Microscopy Research and Technique.* 70,154-161, 2007

K. König, A. Ehlers, I. Riemann, S. Schenkl, R. Bückle, M. Kaatz: Clinical two-photon microendoscopy. *Microscopy Research and Technique* 70, 398-402, 2007

K. König. Clinical Multiphoton Tomography. *J. Biophotonics* 1, 13-23, 2008

MJ. Köhler et al.: Morphological skin aging criteria by multiphoton laser scanning tomography: Noninvasive in vivo scoring of the dermal fiber network. In press.

