



Aus dem Institut für Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie, Molekulare
Diagnostik des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

Direktor:

Prof. Dr. med. Harald Renz

in Kooperation mit dem Institut für Bioverfahrenstechnik und Pharmazeutische
Technologie der Technischen Hochschule Mittelhessen

Geschäftsführende Direktoren:

Prof. Dr.-Ing. Peter Czermak und Prof. Dr. rer. nat. Frank Runkel

KUMULATIVE DISSERTATION

Entwicklung innovativer Trägersysteme zur gezielten dermalen Applikation eines
GATA-3-spezifischen DNAzyms als Therapeutikum der Atopischen Dermatitis

Zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von:

Dipl.-Ing. (FH) Dipl.-Ing. (FH) Thomas Michael Schmidts
aus Darmstadt

Marburg, 2013

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philips-Universität Marburg am:
18. April 2013

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. Matthias Rothmund
Referenten: Prof. Dr. Harald Renz / Prof. Dr. Frank Runkel
Korreferent: PD Dr. Wolfgang Pfützner

INHALTSVERZEICHNIS

| | |
|---|----|
| ENGLISH ABSTRACT..... | 1 |
| ZUSAMMENFASSUNG..... | 3 |
| EINLEITUNG | 5 |
| ERGEBNISSE | 11 |
| Entwicklung einer neuen Screening Methode zur Herstellung stabiler Mikroemulsionen | 11 |
| Required Hydrophilic-Lipophilic-Balance (rHLB) gestützte Entwicklung stabiler Submikronemulsionen..... | 12 |
| Einfluss von hydrophilen Emulgatoren und Additiven auf die physikochemischen Eigenschaften von multiplen Emulsionen und required HLB gestützte Entwicklung..... | 13 |
| Schutzfunktion von Trägersystemen vor Degradation des DNAzyms durch DNasen..... | 15 |
| Einfluss unterschiedlicher Trägersysteme auf die Penetration des Wirkstoffes DNAzym in die Haut und in epidermale Zellen..... | 16 |
| DISKUSSION | 18 |
| REFERENZEN | 25 |
| ERKLÄRUNG ÜBER ANTEIL AN PUBLIKATIONEN | 30 |
| AUSGEWÄHLTE PUBLIKATIONEN | 32 |
| WISSENSCHAFTLICHER LEBENSLAUF..... | 33 |
| PUBLIKATIONSLISTE | 85 |
| VERZEICHNIS DER AKADEMISCHEN LEHRER..... | 90 |
| DANKSAGUNG | 91 |
| EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG | 92 |

ENGLISH ABSTRACT

Atopic dermatitis (AD) is an inflammatory, chronically relapsing, non-contagious and pruritic skin disorder. AD affects 15–30% of children and 2–10% of adults in industrialized countries. AD is mediated by a strong Th₂-cell response accompanied by the expression of various cytokines.

The transcription factor GATA-3 which is mainly expressed in Th₂-cells plays a key role in the regulation of these inflammatory processes. Inhibiting the activity of GATA-3 may therefore be a novel strategy for the treatment of allergic diseases such as AD.

DNAzymes could be shown to be potent novel drugs for the treatment of inflammatory diseases such as atopic dermatitis. They represent a novel class of pharmaceuticals for causal therapies that are based on the interference with the specific pathway leading to the described inflammatory response. A DNAzyme-mediated cleavage of the GATA-3 specific mRNA aims for a suppression of the immune response leading to several known disorders like AD.

There are two main challenges regarding the dermal application of DNAzymes: the relatively large molecular weight and the sensitivity to DNases which can be found on the skin surface as a part of the natural skin flora.

A promising approach for the protection of DNAzymes is the development and application of suitable new carrier systems.

In order to avoid degradation of the drug, the hydrophilic compound may be incorporated into the inner aqueous phase of carrier systems, such as water-in-oil-in-water (multiple) emulsions. In the present study, multiple emulsions and various other emulsions, such as small-scaled submicronemulsions, microemulsions and water-in-oil-emulsions were compared.

Their physicochemical properties were determined and drug release as well as skin uptake studies using various skin conditions and experimental set-ups were conducted. Furthermore, cellular uptake was determined by flow cytometric analysis (FACS). DNAzyme uptake with finite dose set-up and application of the formulation under a gentle massage led to the superiority of the multiple emulsion over the submicronemulsion.

Most likely the applied shear and partial evaporation of the outer water phase lead to a disruption of the oily membrane of the W/O/W emulsion, followed by the time

dependent release of the DNAzyme and its successful penetration into the skin. In case of the submicronemulsion, the drug was reduced immediately by skin own DNases prior to penetration.

DNAzymes target cells of the viable epidermis. In order to prove the uptake, FACS experiments using viable epidermal cells were performed. The data clearly demonstrates that DNAzyme uptake by the skin is not limited to the stratum corneum. Importantly, compared to the submicronemulsion, the specific drug uptake was increased using the W/O/W emulsion which is in line with the data obtained from skin penetration studies.

The results could clearly show that antisense oligonucleotides protected in W/O/W emulsions represent a promising approach for a dermal therapy of atopic dermatitis.

ZUSAMMENFASSUNG

Da die akute Phase der Atopischen Dermatitis mit einer Überexpression von Th₂-Zellen einhergeht und der Transkriptionsfaktor GATA-3 hierfür einen entscheidenden Trigger darstellt, ist es naheliegend, durch ein selektives Ausschalten der mRNA die Expression dieses Transkriptionsfaktors zu unterbinden und somit die Erkrankung spezifisch und kausal zu therapieren.

Eine Möglichkeit zur spezifischen Katalyse von GATA-3 stellt das Antisense Oligonukleotid DNAzym hgd 40 dar.

Hauterkrankungen, wie die Atopische Dermatitis werden konventionell dermaltherapiert. Allerdings ergeben sich für die bis dato noch nicht in die dermale Therapie eingeführten Antisense Oligonukleotide aufgrund von Molekülgröße und Sensitivität zahlreiche Herausforderungen. Besonders gegenüber in und auf der Haut ubiquitär vorkommenden DNasen müssen diese Wirkstoffe vor Degradation geschützt werden. Gleichzeitig ist eine ausreichende Resorption in das Zielorgan Haut sicherzustellen. Folgerichtig wird in der vorliegenden Arbeit die Formulierungsfindung für den als Modellsubstanz ausgewählten Wirkstoff DNAzym hgd 40 behandelt. Hierbei war es besonders zu beachten, dass die natürliche Hautbarriere bei der Atopischen Dermatitis zwar geschwächt, gleichzeitig aber auch außerhalb eines Krankheitsschubs bei intakter Hautbarriere die Wirkstoffpenetration für einen präventiven Effekt gewährleisten sollte.

Multiple Emulsionen wurden als Kandidat mit der größten Schnittmenge an Eigenschaften, wie Wirkstoffschutz und Wirkstoffpenetration bei gleichzeitig pflegenden Eigenschaften, favorisiert. Multiple Emulsionen sind Wasser-in-Öl-in-Wasser Emulsionen, in deren innerer Wasserphase Wirkstoffe eingeschlossen werden können. Zum Vergleich wurden weitere Emulsionstypen, wie Mikroemulsion, Submikronemulsion und konventionelle Wasser-in-Öl-Emulsionen in die Versuchsreihe aufgenommen. Es konnte gezeigt werden, dass alle untersuchten Emulsionstypen hinsichtlich ihrer physikochemischen Parameter, wie pH-Wert, Tropfengröße und Viskosität über den untersuchten Zeitraum stabil sind.

Ein besonderes Augenmerk richtete sich auf die Schutzfunktion der Galeniken gegenüber der Degradation des Wirkstoffs DNAzym hgd 40. Die hierzu notwendigen extraktions- und analytischen Verfahren konnten im Rahmen dieser Arbeit etabliert werden. Bei Inkubationsversuchen mit hautidentischen DNasen wurde gezeigt, dass

multiple Emulsionen innerhalb des untersuchten Zeitraums über 50% des in der inneren Phase eingearbeiteten Wirkstoffs effektiv vor Abbau schützen. Die beschriebenen Trägersysteme Mikroemulsion und Submikronemulsion zeigten keine Schutzfunktion und einen nahezu vollständigen Abbau des Wirkstoffs.

Zur Untersuchung der Kinetik wurden Freisetzungsversuche an Cellulosemembranen durchgeführt. Die Systeme Mikroemulsion und Submikronemulsion, in denen der Wirkstoff in der äußeren Phase vorliegt, zeigten eine im Vergleich zu der multiplen Emulsion und der W/O-Emulsion eine stärkere Freisetzung. Auch bei den infinite-dose (500 μL auf 1,76 cm^2 Hautfläche) Penetrationsversuchen an Schweineohrenhaut zeigten die Systeme Mikroemulsion und Submikronemulsion zunächst eine im Vergleich zur multiplen Emulsion höhere Hautpenetration. Betrachtet man nun aber die Ergebnisse der realistischeren finite-dose Applikationsversuche (20 μL über 24 Stunden auf 1,76 cm^2 Hautfläche, leicht einmassiert), so zeigte nun die multiple Emulsion, im Gegensatz zur Submikronemulsion, eine dreifach höhere Penetration des Wirkstoffs DNAzym in die Haut. Unter realistischen Applikationsbedingungen vermag somit die multiple Emulsion einerseits den Wirkstoff auf der Haut vor zu schnellem Verdau zu schützen und andererseits, durch partielles Ausbluten der inneren Wirkstoffphase, induziert durch die Applikationsscherkräfte und partielle Verdunstung, mit der Haut in Wechselwirkung zu treten und den Wirkstoff an die Haut abzugeben.

Aus der Submikronemulsion penetriert der Wirkstoff dagegen nicht in größeren Mengen in die Haut, da bei Hautkontakt umgehend einem Abbau durch DNasen erfolgt. Diese Ergebnisse bestätigten sich ebenfalls durch FACS (Fluorescence activated cell sorting) Analysen der Hautlysate der finite-dose Versuche. Hier zeigte die multiple Emulsion, im Vergleich zu der Submikronemulsion, eine etwa 4-fach höhere Aufnahme des Wirkstoffs in epidermale Zellen.

Ein weiterer Grund bei der Auswahl des finalen Trägersystems ist die Betrachtung der Wirkstoffwiederfindung innerhalb der Galeniken. Hier lag nach 3 Monaten die Konzentration von DNAzym hgd 40 lediglich bei der multiplen Emulsion innerhalb der erlaubten Spezifikation von 100% \pm 5%.

Die positiven Ergebnisse dieser Arbeit lassen eine kausale, dermale Therapie der Atopischen Dermatitis mit Antisense Oligonukleotiden, geschützt in multiplen Emulsionen, in greifbare Nähe rücken.

EINLEITUNG

Innovative Therapieansätze zur Behandlung von Hauterkrankungen, wie etwa der Atopischen Dermatitis, stehen seit einiger Zeit im Fokus der pharmazeutischen Entwicklung. Aus der Synergie kausaler Therapieansätze und potenter topischer Drug-Targeting-Systeme ergibt sich die Möglichkeit, Krankheiten ursächlich zu behandeln und neuartige, empfindliche Wirkstoffe in die dermale Therapie einzuführen. Weiterhin wird durch eine innovative Galenik die Möglichkeit eröffnet, solche Wirkstoffe vor vorzeitiger Degradation zu schützen und gezielt in den Wirkort Haut zu transportieren. Durch Erschließen einer topischen Therapie können folglich Nebenwirkungen systemischer Gaben reduziert werden. Der Einsatz innovativer Drug-Targeting-Systeme eröffnet die Möglichkeit, durch zielgerichtete Applikation bereits mit niedriger dosiertem Wirkstoff einen adäquaten Effekt zu verursachen.

Die vorliegende Arbeit schlägt eine Brücke zwischen zwei Forschungsbereichen, einerseits der Entwicklung neuartiger Wirkstoffe und andererseits der Erforschung neuartiger Trägersysteme. Gerade in der traditionellen pharmazeutischen Forschung kommt es bis dato zu selten zu Verknüpfungen innerhalb beider Tätigkeitsfelder mit der möglichen Konsequenz, dass Stabilitätsprobleme oder unzureichende Bioverfügbarkeit erst innerhalb der klinischen Studien erkannt werden. Die frühzeitige Abstimmung zwischen Wirkstoffforschung und galenischer Entwicklung kann Fehlerquellen rechtzeitig identifizieren und eröffnet interessante Möglichkeiten hinsichtlich der Reduzierung von Wirkstoffmengen und Nebenwirkungen sowie der Erhöhung von Wirkstoffstabilitäten.

Atopische Dermatitis

Atopische Dermatitis ist eine chronisch-entzündliche, ekzematöse Hauterkrankung. Die Prävalenz der Erkrankung liegt in Industriestaaten bei 15-30% der Kinder und 2-10% der Erwachsenen. Die Häufigkeit der Erkrankung stieg in industrialisierten, urbanen Ländern in den letzten 3 Dekaden um das zwei- bis dreifache (Bieber 2010; Williams 2000).

Mit der Erkrankung geht eine gestörte Barrierefunktion der Haut einher, gekennzeichnet durch einen erhöhten transepidermalen Wasserverlust und erniedrigte Hautfeuchte (Sugarman 2008). Als Folge resultiert häufig eine mikrobielle

Überbesiedelung der Haut. Für die gestörte Barrierefunktion sind Abweichungen in der Zusammensetzung der Lipide und Proteine des Stratum Corneums, wie etwa ein durch Genmutation induzierter Abbau von Filaggrin, ursächlich (Howell, Kim et al. 2007).

Die Ursachen der Atopischen Dermatitis sind bislang nicht vollständig geklärt. Experten sehen im komplexen Krankheitsgeschehen und seinem sehr individuellen Verlauf ein Zusammenspiel aus genetischen Faktoren, welche die epidermale Barriere und das Immunsystem beeinflussen sowie Umwelteinflüssen, wie Stress, Infektionen, Allergene und mangelnde Hygiene (Bieber 2010; Johansson, Hourihane et al. 2001; Leung und Soter 2001; Leung und Bieber 2003).

Die Erkrankung Atopische Dermatitis geht mit einer biphasischen Entzündung einher. Die akute Phase der atopischen Dermatitis ist gekennzeichnet von einer Überexpression von Th₂-Zellen und einer daraus resultierenden Ausschüttung zahlreicher Interleukine, wie z.B.: IL-4, IL-5, IL-13, sowie der Bildung von IgE – Antikörpern, die gegen ubiquitär vorkommende Umweltantigene gerichtet sind. Im chronischen Verlauf verlagert sich die Erkrankung dann zu einer Th₁-vermittelten Immunantwort (Breuer, Werfel et al. 2002; Hanifin, Cooper et al. 2004).

Bislang sind neben einer Basispflege mit Urea-haltigen Emulsionen, einer Kontrolle der bakteriellen Besiedlung mit Chlorhexidin oder Triclosan nur symptomatische Therapieansätze, wie eine antientzündliche Therapie mittels Glucocorticoiden oder Calcineurininhibitoren, verfügbar (Bieber 2010).

Glucocorticoide sind in der Lage, durch Bindung an zytosolische Glucocorticoid-Rezeptoren, in die Regulation von entzündungsfördernden (z.B. Phospholipase A2) und entzündungshemmenden (z.B. Lipocortin-1) Proteinen einzugreifen und so die Synthese von Zytokinen und die Induktion der Cyclooxygenase-2 (COX-2) zu unterdrücken (Barnes 1998). Die regelmäßige Anwendung von Corticosteroiden führt allerdings zu unerwünschten Nebenwirkungen, wie Wundheilungsstörungen, Hautatrophien, Steroidakne oder erhöhter Infektionsgefahr (Hengge, Ruzicka et al. 2006). Auch neuere Ansätze, wie etwa Calcineurininhibitoren, stellen eine rein symptomatische Behandlungsstrategie dar. Die Wirkstoffe hemmen die calciumabhängige Phosphatase Calcineurin und damit die T-Zell-Aktivierung und Proliferation sowie die Synthese von entzündungsfördernden Zytokinen. Zu den häufigsten unerwünschten Wirkungen gehören lokale Hautreizungen und Hautbrennen (Hanifin, Cooper et al. 2004; Nghiem, Pearson et al. 2002).

DNAzyme zur Therapie der Atopischen Dermatitis

Die Antisense Strategie stellt ein molekularbiologisches Verfahren dar, um die Aktivität eines bestimmten Gens auf mRNA-Ebene spezifisch zu inhibieren. Die Antisense-Moleküle binden an ihre Ziel-mRNA und inaktivieren sie über verschiedene Mechanismen. Somit ist keine Proteintranslation möglich und die Synthese des entsprechenden Genprodukts wird unterdrückt (Cairns, King et al. 2003; Kurreck 2003; Silverman 2005).

Eine Klasse der Antisense Moleküle stellen die DNAzyme dar. Sie sind in der Lage, die mRNA von Transkriptionsfaktoren katalytisch zu spalten und somit die Expression des Proteins zu unterbinden.

Ein neuartiges GATA-3 spezifisches Antisense Molekül stellt das DNAzym hgd 40 dar. Es handelt sich hierbei um ein katalytisch aktives DNA-Oligonukleotid, welches zur Therapie entzündlicher Erkrankungen beim Menschen eingesetzt werden soll.

Erste Versuche zur Therapie von Asthma Bronchiale mit einem Maus spezifischen DNAzyme zeigten, dass selektiv die mRNA des Transkriptionsfaktors GATA-3 gespalten wird und somit eine Translation von GATA-3 unterbunden werden kann (Sel, Wegmann et al. 2008).

Die Pathogenese der Atopischen Dermatitis legt nahe, dass durch ein selektives Ausschalten der mRNA des Transkriptionsfaktors GATA-3 mit Hilfe von DNAzymen, die Expression dieses Faktors unterbunden wird und die Erkrankung spezifisch und kausal therapiert werden kann. GATA-3 ist somit ein viel versprechendes therapeutisches Target zur Therapie allergischer Erkrankungen (Barnes 2008).

Geeignete dermale Trägersysteme für DNAzym hgd 40

Gerade Hauterkrankungen, wie die Atopische Dermatitis, sind konventionell zwar einer dermalen Therapie zugänglich, jedoch ergeben sich für neuartige Wirkstoffe etwa aus der Gruppe der Antisense Moleküle aufgrund von Molekülgröße und Sensitivität zahlreiche Herausforderungen.

Für eine erfolgreiche Therapie muss ein Wirkstoff vor Degradation geschützt werden und gleichzeitig eine ausreichende Resorption in das Zielorgan bewerkstelligt werden. DNAzyme sind sensitiv gegenüber im und auf dem Körper ubiquitär vorkommenden DNasen. Insbesondere auf der Haut exprimieren zahlreiche

Mikroorganismen als Abwehrstrategie große Mengen an DNasen (Langlois, Harmon et al. 1989; Laskowski 1959). Um DNAzym vor Degradation zu schützen, kann das Molekül modifiziert werden, was in der Regel aber Einfluss auf die Wirkung hat (Miller und Ts'o 1987). Als plausiblere Möglichkeit, ohne das Molekül weiter chemisch zu verändern, bieten sich galenische Schutzstrategien an, bei denen der Wirkstoff zum Beispiel in einer innen liegenden Phase vor äußeren Einflüssen geschützt werden kann.

Hierzu zählen neben konventionellen Wasser-in-Öl Emulsionen die multiplen Wasser-in-Öl-in-Wasser Emulsionen. Sie nehmen eine Sonderstellung im Bereich der halbfesten Arzneiformen ein. Bei multiplen Emulsionen handelt es sich um Emulsionen, in denen die Tropfen der dispersen Phase selbst kleine Tropfen enthalten, also eine „Emulsion in der Emulsion“ (Muschiolik und Bunjes 2007). Es werden zwei Typen multipler Emulsionen unterschieden: Wasser-in-Öl-in-Wasser Emulsion (W1/O/W2), bei der die Ölphase eine Trennfunktion übernimmt, durch die der auszutauschende Stoff permeiert und die Öl-in-Wasser-in-Öl Emulsion (O1/W/O2), bei der die beiden Ölphasen durch eine Wasserphase getrennt sind. So lassen sich hydrophobe und hydrophile Wirkstoffe in die inneren Phasen der multiplen Emulsion einarbeiten und vor schädigenden Einflüssen während der Lagerung oder Anwendung schützen. Weiterhin bieten multiple Emulsionen die Möglichkeit, zwei inkompatible Wirkstoffe und/oder Hilfsstoffe in eine Formulierung zu integrieren und unerwünschte Wechselwirkungen zu reduzieren sowie eine kontrollierte Wirkstofffreigabe zu induzieren (Kim, Kim et al. 1995; Muschiolik 2007).

Zur Erzielung einer lokalen, beziehungsweise systemischen Wirkung, muss der Arzneistoff in die Haut penetrieren, bzw. durch die Haut permeieren. Die Haut besteht aus aufeinander liegenden Schichten unterschiedlicher Gewebearten und stellt eine effektive Barriere gegenüber negativen Umwelteinflüssen aber auch Wirkstoffen dar. Die äußere Schicht, das Stratum Corneum, ist mit einer Stärke von nur etwa 20-50 µm die eigentliche Limitationsbarriere der Haut (Weaver, Vaughan et al. 1999). Die Zellen der Epidermis bilden sich aus einer einfachen Schicht aus Basalzellen aus. Keratinozyten, welche durch diese Basalschicht gebildet werden, wandern aufwärts, verlieren ihren Zellkern und produzieren Hautproteine, wie etwa Keratine und Lipide. Die verhornten Keratinozyten sind umgeben von interzellulären Lipiden und Proteinen und stellen eine rigide Barriere dar. Der Aufbau des Stratum Corneums kann mit Hilfe des so genannten „Ziegelstein“ Modells verdeutlicht

werden. Dabei stellen die Ziegelsteine die Kerneozyten und der Mörtel die interzellulären Lipide dar (Foldvari 2000).

Ein Transport in und durch die Haut kann auf unterschiedlichen Wegen erfolgen. Neben transglandulärer und transfolikulärer Penetration, welche allerdings nur eine untergeordnete Rolle spielen, da der Anteil der Porenfläche an der Gesamtoberfläche der Haut nur etwa zwischen 0,1 und 1% beträgt, kann die Permeation und Penetration von Wirkstoffen transepidermal interzellulär oder transzellulär erfolgen (Hadgraft 2001). Welcher dieser Wege für den jeweiligen Wirkstoff in Frage kommt, hängt aber unter anderem von dessen physikalisch-chemischen Eigenschaften und denen des Trägersystems ab. Insbesondere das Molekulargewicht des Wirkstoffs (10,6 kDa) stellt einen limitierenden Faktor für die Penetration in die Haut dar. Die Penetration von Wirkstoffen mit einem Molekulargewicht größer 800-1000 Da ist deutlich limitiert, besser penetrieren Stoffe mit einem kleineren Molekulargewicht (Knoch A. 1985). Eine Anreicherung und Penetration von Wirkstoffen mit eher ungünstigeren Voraussetzungen kann also aus klassischen Formulierungen, die ausschließlich dem Diffusionsprinzip unterliegen, als problematisch angesehen werden (Lüllmann und Mohr 1999). Eine effiziente Strategie zur Erhöhung der Penetration von Wirkstoffen in die Haut ist die Manipulation der limitierenden Hautbarriere, dem Stratum Corneum. Um einen erhöhten Wirkstofftransport zu erzielen, kann eine Alternierung der Lipide des Stratum Corneums erfolgen. Die wichtigsten Mechanismen sind: Extraktion von Lipiden aus dem Stratum Corneums, Veränderung des Verteilungskoeffizienten Vehikel/Haut, Störung der Struktur der Lipid-Doppelschichten, Verdrängung von gebundenem Wasser, Lockerung der Keratinstruktur der Hornzellen (Daniels und Knie 2007). Dies kann entweder durch chemische Lösungsvermittler, so genannte Penetrationsverstärker, oder durch die Eigenschaften spezieller Trägersysteme, so genannter „Drug Carrier“, bzw. deren Wechselwirkung mit Haut und Wirkstoff erfolgen (Foldvari 2000; Williams 1999).

Aufgrund von herausragenden Transporteigenschaften zur Applikation von Wirkstoffen, sind innovative Optionen wie Mikroemulsionen und Submikronemulsionen von besonderem Interesse. Diese galenischen Formen sind in kosmetischen Produkten teilweise realisiert, spielen allerdings als Dermatika bislang noch eine untergeordnete Rolle (Daniels und Knie 2007; Patravale und Mandawgade 2008).

Submikronemulsionen unterscheiden sich von konventionellen Emulsionen lediglich durch die Tropfengröße der inneren Phase (etwa 100 – 600 nm Durchmesser). Die geringe Tropfengröße führt zu einem günstigen Verhältnis von Oberfläche zu Volumen. Dies resultiert in einer großen Kontaktfläche zwischen Galenik und Haut, über die Wirkstoffe oder Hilfsstoffe besser mit der Haut wechselwirken und aufgenommen werden können (Bouchemal, Briançon et al. 2004).

Eine Sonderstellung bei den Emulsionen nehmen die Mikroemulsionen ein; sie sind thermodynamisch stabil und beeinflussen die Penetration von Wirkstoffen insbesondere durch kleine Tropfengrößen, hohe Wirkstoffbeladungskapazität und Alternierung der Stratum Corneum Lipide durch die eingesetzten Emulgatoren (Ashton, Walters, et al. 1992; Delgado-Charro, Iglesias-Vilas et al. 1997).

ERGEBNISSE

Im Folgenden sind die Ergebnisse, die im Rahmen der Promotion veröffentlicht wurden, zusammenfassend dargestellt. Die Abfolge ist inhaltlich und nicht chronologisch sortiert. Literaturstellen sind den entsprechenden Publikationen zu entnehmen.

Entwicklung einer neuen Screening Methode zur Herstellung stabiler Mikroemulsionen

In der an dieser Stelle vorgestellten Arbeit „*Development of an alternative, time and cost saving method of creating pseudoternary phase diagrams using the example of a microemulsion*“ von Schmidts et al. (Schmidts, Nocker et al. 2009) wird eine neue Methode zur schnellen und effizienten Entwicklung von Mikroemulsionen vorgestellt. Aufgrund des potentiellen Irritationspotentials der verwendeten Surfactants, sind stabile Emulsionen mit niedrigem Emulgatorgehalt für die Anwendung auf der Haut von besonderem Interesse. Mit Hilfe von ternären Phasendiagrammen können bestimmte Phasenzustände oder Phasenlagen von Mehrkomponenten-Systemen dargestellt werden und somit Bereiche mit geringem Emulgatorgehalt detektiert werden. Im Falle von Mikroemulsionen spricht man von pseudoternären Phasendiagrammen, da Mikroemulsionen aus den vier Komponenten Ölphase, Wasserphase, Surfactant und Cosurfactant bestehen. Phasendiagramme beschreiben in diesem speziellen Fall in Abhängigkeit der Konzentrationen der vier Bestandteile heterogene, instabile und homogen-transparente, stabile Mischungsverhältnisse. Bis dato erfolgt die Entwicklung solcher pseudoternären Phasendiagramme mittels sehr zeit- und mengenaufwändigen Löslichkeits- und Titrationsmethoden im Becherglas. Die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Methode basiert auf der Herstellung von hunderten Emulsionen im Kleinstmaßstab in Mikrotiterplatten (96 Well Platten). In den einzelnen Wells der Mikrotiterplatten werden die vier Komponenten in Verdünnungsreihen vorgelegt. So entstehen Multikomponenten-Mischungen die den gesamten Konzentrationsbereich der Inhaltsstoffe abdecken. Pro Mikrotiterplatte werden 96 Kleinstemulsionen mit geringen Konzentrationsabstufungen der Inhaltsstoffe generiert. Mit weniger als 5 Mikrotiterplatten kann innerhalb kürzester Zeit ein vollständiges Phasendiagramm erstellt werden. Nach kurzer Inkubation auf einer Rüttelplatte erfolgt die Detektion der

homogenen Mikroemulsionsbereiche rein visuell oder mit Hilfe von Tropfengrößenmessungen innerhalb der einzelnen Wells. Eine visuelle Auswertung ist möglich, da thermodynamisch stabile Mikroemulsionen aufgrund Ihrer Isotropie transparent erscheinen und sich sehr deutlich von den milchigen, heterogenen Bereichen normaler Emulsionen unterscheiden lassen. Des Weiteren können die Platten eingelagert werden und umfangreiche Langzeit- und Stabilitätsuntersuchungen erfolgen. Mittels der hier vorgestellten Methode konnten stabile Mikroemulsionen mit hautverträglichen Inhaltsstoffen und einer Emulgatorkonzentration von nur 12% entwickelt werden. Diese Mikroemulsion wurde im Rahmen dieser Arbeit als potentiell Trägersystem für den Wirkstoff DNAzym verwendet.

Required Hydrophilic-Lipophilic-Balance (rHLB) gestützte Entwicklung stabiler Submikronemulsionen

Die Veröffentlichung „*Required HLB Determination of Some Pharmaceutical Oils in Submicron Emulsions*“ von Schmidts et al. (Schmidts, Schlupp et al. 2012) beschreibt die Bestimmung von rHLB-Werten von pharmazeutischen Ölen und Ölmischungen zur Entwicklung langzeitstabiler Submikronemulsionen. Die Tropfengrößen von Submikronemulsionen liegen mit 150-500 nm nur wenige Nanometer oberhalb der Tropfengrößen von Mikroemulsionen. Im Gegensatz zu Mikroemulsionen, die zwar thermodynamisch stabil und ohne Energieeintrag herzustellen sind, aber große Mengen an Emulgatoren benötigen, sind Submikronemulsionen nur kinetisch stabil, kommen aber bei entsprechend aufwendiger und umfangreicher Entwicklung mit wesentlich weniger als der für stabile Mikroemulsionen erforderlichen Emulgatormenge bei vergleichbar guten Penetrationseigenschaften für Wirkstoffe aus. Die Entwicklung von Emulsionen erfolgt generell empirisch und ist oftmals, gerade für niedrigviskose Systeme mit kleinen Tropfengrößen, sehr zeit- und ressourcenintensiv. Durch die frühzeitige Einbindung physikochemischer Eigenschaften der verwendeten Inhaltsstoffe in die Entwicklung, kann die Anzahl von Experimenten reduziert werden. Zwei wichtige Parameter sind der HLB (Hydrophilic-Lipophilic-Balance) Wert der eingesetzten Emulgatoren und der required HLB (required Hydrophilic-Lipophilic-Balance) Wert für die verwendeten Öle. Der HLB Wert ist ein Maß für die Löslichkeit und die Einsatzmöglichkeiten von Emulgatoren und beschreibt den hydrophilen und lipophilen Anteil von nichtionischen

Tensiden. Der required HLB Wert beschreibt den optimalen HLB Wert eines Öls oder einer Ölphase zur Erstellung stabiler Emulsionen. Hierzu werden Emulgatormischungen über einen breiten HLB Bereich erstellt und mit der gewünschten Ölphase emulgiert. Trägt man die generierten Tropfengrößen über den HLB Wert der Emulgatormischung auf, so liegt der optimale required HLB Wert der Ölphase am Tiefpunkt des Kurvenverlaufs. Im Rahmen dieser Arbeit wurde erstmals die required HLB-gestützte Entwicklung auf Submikronemulsionen übertragen. Es konnte gezeigt werden, dass für einzelne Öle und Ölmischungen mit unterschiedlichen Emulgatormischungen stabile Submikronemulsionen mit Hilfe dieser Methodik entwickelt werden konnten. Bereits geringe Abweichungen vom optimalen required HLB Wert führten zu einer sichtbaren Phasenseparation innerhalb weniger Stunden. Des weiteren konnte gezeigt werden, dass über die chemische Klasse der eingesetzten Emulgatoren bei gleichem required HLB Wert die Tropfengröße vergrößert bzw. verkleinert werden konnte, ohne das System zu destabilisieren. Neben der Entwicklung von stabilen Submikronemulsionen auf Basis eines Öls, wurde die required HLB-gestützte Entwicklung auf eine Ölmischung erweitert und Langzeitstabilitätsdaten erhoben. Die im Hinblick auf die Ergebnisse stabilste Submikronemulsion, bestehend aus den Emulgatoren Oleth-3 und Oleth-10 und den Ölen Coco-Caprylate/Caprata, Cetearyl Isononanoate und Ethyloleate, wurde für die weiteren Untersuchungen mit dem Wirkstoff DNAzym ausgewählt.

Einfluss von hydrophilen Emulgatoren und Additiven auf die physikochemischen Eigenschaften von multiplen Emulsionen und required HLB gestützte Entwicklung

Die gesamte Entwicklungsarbeit der multiplen Emulsionen wurde in folgenden Publikationen zusammengefasst „*Influence of hydrophilic surfactants on the properties of multiple W/O/W emulsions*“ von Schmidts et al. (Schmidts, Dobler et al. 2009), „*Multiple W/O/W emulsions – Using the required HLB for emulsifier evaluation*“ von Schmidts et al. (Schmidts, Dobler et al. 2010) und „*Development of multiple W/O/W emulsions as dermal carrier system for oligonucleotides: Effect of additives on emulsion stability*“ von Schmidts et al. (Schmidts, Dobler et al. 2010). Multiple Emulsionen bestehen aus Wassertropfen, dispergiert in größeren Öltropfen, welche wiederum in einer kontinuierlichen, äußeren Wasserphase dispergiert werden. Aufgrund dieser unterschiedlichen Kompartimente können Wirk- und Additive effizient voneinander abgeschirmt und vor äußerlichen Einflüssen geschützt

werden. Gleichzeitig sind diese Systeme aufgrund der zwei Grenzflächen, die es abzuschirmen gilt, hochgradig sensitiv und neigen zu Instabilität wie Phasenseparation, Ausbluten der innen eingearbeiteten Wirkstoffe und Elektrolyte, Koaleszenz der inneren Wassertropfen oder gar Verlust der Multiplizität. Bis dato sind aufgrund dieser Problematik keine pharmazeutischen Präparate auf dem Markt. Im Rahmen der Arbeit sollen erstmals langzeitstabile multiple Emulsionen entwickelt werden. Hierzu musste zunächst der Fokus auf die Effekte der hydrophilen Emulgatoren gelegt werden, die die äußere Grenzfläche stabilisieren, da deren Einfluss auf die Stabilität bis dato unzureichend untersucht wurde. Im Rahmen dieser Arbeit wurden multiple Emulsionen gleicher Rezeptur der Primäremulsion (Paraffinöl als Ölphase, Sorbitanmonooleate als lipophiler Emulgator) mit unterschiedlichen hydrophilen Emulgatoren (z.B. Polysorbate, Poloxamer, Cetareth, Laureth, Steareth, Sucrose Palmitate, PEG-Stearate) hergestellt und auf deren Einfluss auf die Langzeitstabilität hinsichtlich Tropfengröße und Leitfähigkeit als Indikator für den Elektrolytaustritt aus der inneren Phase hin untersucht. Es konnte im Rahmen der Arbeit gezeigt werden, dass nicht nur der HLB-Wert des eingesetzten hydrophilen Emulgators, sondern auch seine chemische Klasse die Stabilität maßgeblich beeinflusst. Mittels polyethoxylierten Ethern von Fettalkoholen (C = 16-18) mit HLB Werten im Bereich von 15,3 bis 16,2 konnten die stabilsten multiplen Emulsionen hergestellt werden. Multiple Emulsionen mit diesen Emulgatoren zeigten einen geringen Anstieg der Leitfähigkeit und Tropfengröße sowie eine vernachlässigbare Reduktion der Viskosität. Neben Emulgatoren sind osmotisch aktive Stoffe (Osmolyte) entscheidend für die Entwicklung stabiler multipler Emulsionen. Additive können die Stabilität von multiplen Emulsionen positiv beeinflussen, indem sie den osmotischen Gradienten hin zur inneren Phase aufrecht halten, dem Laplace Druck entgegenwirken und somit ein Ausbluten der inneren Wasserphase sowie darin gelöster Wirkstoffe oder das Schwellen der inneren Wasserphase verhindern. Als Stabilisatoren wurden untersucht: NaCl, MgSO₄, Glukose, Glyzin, Hydroxyethylcellulose und Natrium Carboxymethylcellulose. Die untersuchten Osmolyte resultierten in einer erhöhten Langzeitstabilität der Emulsionen. Gleichzeitig führte eine Erhöhung der Osmolytkonzentration zu kleineren Tropfengrößen und einer signifikanten Erhöhung der Viskosität. Die genannten Verdicker auf Cellulosebasis erhöhten ebenfalls die Stabilität der untersuchten Trägersysteme. Die stabilste Rezeptur konnte mit MgSO₄ generiert werden. Da

Magnesium ein wichtiger Co-Faktor für den Wirkstoff DNAzym darstellt, wurde im Folgenden $MgSO_4$ dauerhaft in die Galenik integriert. Im Rahmen dieser Veröffentlichung wurde erstmalig der Wirkstoff DNAzym in eine multiple Emulsion eingeschlossen, um einen möglichen Einfluss des Wirkstoffes auf die Stabilität multipler Emulsionen zu untersuchen. Es konnte gezeigt werden, dass der Wirkstoff in die innere Phase der Emulsion eingebaut werden kann und die Stabilität nicht negativ beeinflusst. Neben den Untersuchungen zu Additiven wurde erstmals das required HLB Wert gestützte Emulgator-Screening auf die Entwicklung multipler Emulsionen übertragen. Zunächst wurde eine geeignete primäre Wasser-in-Öl Emulsion entwickelt, für die dann der required HLB Wert zur Auswahl geeigneter hydrophiler Emulgatoren ermittelt wurde. Des Weiteren wurden Emulgatormischungen von Emulgatoren der Klassen Polyethoxylierte Ester und Polyethoxylierte Ether über einen breiten HLB Wert erstellt und hinsichtlich der resultierenden Emulsionsparameter Viskosität, Tropfengröße, Leitfähigkeit und Aufräumung verglichen. Die kleinsten Tropfengrößen, geringste Veränderung der Leitfähigkeit und Aufräumung konnte für multiple Emulsionen mit Paraffinöl als Öl der inneren Primäremulsion bei einem required HLB Wert von 15,0-15,5 ermittelt werden. Des Weiteren konnte auch im Rahmen dieser Publikation der starke Einfluss der Emulgatorchemie auf die Stabilität multipler Emulsionen beschrieben werden. So zeigten hydrophile Emulgatoren mit Ether-Gruppen einen stabilisierenden Effekt und Emulgatoren mit Ester-Gruppen einen destabilisierenden Effekt auf die Eigenschaften der Emulsionen.

Schutzfunktion von Trägersystemen vor Degradation des DNAzyms durch DNAsen

Im Rahmen der Untersuchungen der Publikation „*Protective effect of drug delivery systems against the enzymatic degradation of dermally applied DNAzyme*“ von Schmidts et al. (Schmidts, Dobler et al. 2011) wurden die bis dato entwickelten Trägersysteme multiple Emulsion, Submikronemulsion, Mikroemulsion und Wasser-in-Öl Emulsion auf Ihre Schutzfunktion hinsichtlich des Abbaus von DNAzym durch DNAsen verglichen. DNAzyme sind sensitiv gegenüber dem Abbau durch DNAsen, die ubiquitär in und auf der Haut vorkommen. Durch Schutzstrategien, wie etwa dem Einschluss in multiple Emulsionen, kann der Wirkstoff auf der Haut zeitweise abgeschirmt werden, während die Galenik die Lipide des Stratum Corneums

alterniert, bis dann im Anschluss der Wirkstoff in die Haut penetrieren kann. Es wurde der Abbau des Wirkstoffes DNAzym durch natives Hautlysate und reine DNase I Lösung ermittelt. Die Ergebnisse zeigen mit 5,2 U und 14,8 U eine DNase-Aktivität saurer und neutraler Haut-DNasen für den DNAzym Abbau. Zur Untersuchung der Schutzfunktion wurden die unterschiedlichen Trägersysteme mit DNase-Lösung inkubiert und der DNAzym Abbau via HPLC-Analyse quantifiziert. Hier zeigten die Systeme Submikronemulsion und Mikroemulsion ebenso wie wässrige Lösung einen vollständigen Abbau des Wirkstoffes innerhalb der Formulierung. Die Systeme multiple Emulsion und Wasser-in-Öl Emulsion zeigten eine Wiederfindung des Wirkstoffs von über 60%, respektive 97%. Wurde der Wirkstoff anstelle der inneren Phase zu der äußeren Phase der multiplen Emulsion zugegeben, so wurde der Wirkstoff DNAzym zu 100% angebaut. Dies spricht für eine gute Einschlusseffizienz des Wirkstoffes. Dennoch wurden weitere Untersuchungen mit allen Emulsionssystemen durchgeführt, da ein Schutz allein möglicherweise für eine Penetration des Wirkstoffs in einer therapeutischen Dosis nicht ausreichen könnte und andere Systeme, obgleich weniger Schutz, aufgrund ihrer penetrationsfördernden Eigenschaften bei den ex-vivo und in-vivo Untersuchungen besser abschneiden könnten.

Einfluss unterschiedlicher Trägersysteme auf die Penetration des Wirkstoffes DNAzym in die Haut und in epidermale Zellen

Die Publikation „*Development of drug delivery systems for the dermal application of therapeutic DNAzymes*“ von Schmidts et al. (Schmidts, Marquardt et al, 2012) komplettiert die bisherigen galenischen Untersuchungen durch pharmakokinetische ex-vivo Untersuchungen an porciner Haut. Zunächst wurden mit den entwickelten Formulierungen Stabilitätsuntersuchungen und Wirkstoffwiederfindung ICH-konform durchgeführt. Alle Formulierungen haben sich hinsichtlich ihrer physikochemischen Parameter, wie pH-Wert, Tropfengröße und Viskosität, über den untersuchten Zeitraum als stabil erwiesen. Betrachtet man allerdings die Wirkstoffwiederfindung, so liegt nach 3 Monaten die Konzentration des DNAzyms nur noch bei der multiplen Emulsion innerhalb der erlaubten Spezifikation $100\% \pm 5\%$. Zur Abschätzung der Kinetik wurden Freisetzungsversuche an Cellulosemembranen sowie Penetrationsversuche (finite dose und infinite dose) mittels Franzzellen und Schweineohrenhaut durchgeführt. Die Systeme Mikroemulsion und

Submikronemulsion überzeugten zunächst mit einer im Vergleich zu der multiplen Emulsion und der W/O-Emulsion höheren Freisetzung und höheren Hautpenetration innerhalb der infinite-dose Versuche (500 µL auf 1,76 cm² Hautfläche) nach 24 Stunden. Die infinite-dose Versuche stellen den ersten Schritt zur Einschätzung der Penetration von Wirkstoffen dar, sind allerdings nicht für jeden Emulsionstyp geeignet. Aufgrund der großen Menge an aufgetragener Emulsion verbleiben insbesondere multiple Emulsionen vermutlich bei diesem Versuchsaufbau, welcher nicht einer realistischen Applikation durch den Patienten entspricht, auf der Haut intakt und setzen somit den Wirkstoff nur in geringen Mengen frei. Gerade aber multiple Emulsionen müssen für die Freisetzung der inneren Wasserphase und somit des Wirkstoffs mit der Zeit durch Verdunstung oder durch Scherkräfte brechen. Dies Phänomen bestätigte sich innerhalb der finite-dose Versuche, welche eine realistische Applikation nachstellen (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 somit 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. Im Rahmen der Arbeit wurden unterschiedliche Hautkonstitutionen für die Penetrationsuntersuchungen herangezogen: intakte, geschädigte, frische und gefrorene Haut. Grundsätzlich konnte kein direkter Einfluss der Vorbehandlung auf die Penetration des Wirkstoffs DNAzym gezeigt werden. Lediglich die Submikronemulsion zeigte eine leicht erhöhte Penetration für den Wirkstoff bei Abwesenheit des Stratum Corneums (geschädigte Barriere), da die Galenik in diesem Fall vermutlich dieses nicht als Speicher für den Wirkstoff nutzen konnte. 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 Submikronemulsion.

DISKUSSION

In den letzten 20 Jahren hat die Haut für Arzneimittelapplikationen einen enormen Aufschwung erfahren. Die dermale Applikation von Wirkstoffen bietet, gerade bei Hauterkrankungen, gewisse Vorteile gegenüber systemisch applizierten Wirkstoffen, wie etwa das Umgehen des First Pass Effektes, der Verzicht auf schmerzhafte Injektionen, die Applikation direkt am Wirkort sowie die Möglichkeit der verzögerten Wirkstoffabgabe (Kanikkannan und Singh 2002).

Den positiven Effekten einer dermalen Therapie steht die Problematik des Wirkstofftransports an den Wirkort in ausreichender Konzentration entgegen. Das Stratum Corneum der Haut stellt eine rigide Barriere für die Wirkstoffpenetration dar. Die Problematik des Transports von Wirkstoffen in therapeutisch wirksamen Dosen wird deutlich, vergleicht man die Permeabilitätskonstanten von relativ kleinen Wassermolekülen von etwa $5 \mu\text{m h}^{-1}$ mit großen Molekülen, wie etwa Hydrocortison ($0,03 \mu\text{m h}^{-1}$) oder größeren Molekülen mit mehreren hydrophilen Gruppen, wie etwa Sorbit ($0,01 \mu\text{m h}^{-1}$) (Heymann 2003).

Die zukünftige Formulierung muss mit pharmazeutischem Equipment hergestellt werden können und upscale fähig sein. Die Hilfsstoffe müssen den Anforderungen einer Arzneimittelzubereitung entsprechen und in den einschlägigen Regelwerken wie etwa der Europäischen Pharmakopöe gelistet sein.

Für eine erfolgreiche dermale Therapie ist es essentiell, bereits während der präklinischen Entwicklung eines Dermatikums das Wechselspiel zwischen dem Applikationsort Haut, dem eingesetzten Trägersystem und dem Wirkstoff zu berücksichtigen. Betrachtet man zunächst DNazym hgd 40, so sind die besonderen Herausforderungen einerseits das große Molekulargewicht, die Sensitivität gegenüber Formulierungsbestandteilen, wie z.B. Alkohol und andererseits DNAsen, welche ubiquitär auf der Haut vorkommen. Für eine effektive Therapie der Atopischen Dermatitis mit Hilfe des DNazyms hgd 40 ist es erforderlich, den Wirkstoff in das Entzündungsinfiltrat und die Epidermis zu transportieren, da aktuelle Veröffentlichungen die Expression des Targets GATA-3 nicht nur in T-Zellen, sondern auch in Eosinophilen, Basophilen, Mastzellen und Epithelzellen nachweisen konnten (Hirasawa, Shimizu et al. 2002).

Der Transport und die damit verbundene limitierte Bioverfügbarkeit von DNA-Molekülen, wie auch das hgd 40 mit einer Größe von etwa 10.6 kDa, stellen aufgrund

einer Vielzahl von Problemen eine große Herausforderung dar (Akhtar, Hughes et al. 2000). So ist ein Transport etwa durch die rigide Barrierefunktion des Stratum Corneums erschwert (Elias 1988; Cork 1997). Des Weiteren ist die Aufnahme in die Zelle von Oligonukleotiden aufgrund ihrer chemischen Struktur und Größe oftmals sehr gering (Bally, Harvie et al. 1999).

Die galenische Entwicklung erfolgte prototypisch für DNAzym hgd 40. Die Entwicklung kann allerdings auch für die Applikation und ein gezieltes Targeting für weitere empfindliche Wirkstoffe von Interesse sein.

Es galt also, den Wirkstoff vor Degradation zu schützen und die Limitationsbarriere der Haut, das Stratum Corneum, mit Hilfe innovativer Trägersysteme zu überwinden. Hierbei war zu beachten, dass die natürliche Hautbarriere bei einer Atopischen Dermatitis zwar geschwächt ist, die Therapie allerdings auch nach Abklingen der Symptome und Regeneration der oberen Hautschichten ein erneutes Auftreten der Krankheit unterbinden sollte. Daher muss auch bei intakter Hautbarriere die Wirkstoffpenetration für einen präventiven Effekt ausreichend hoch sein. Gerade mikroskalierte Trägersysteme können einerseits durch ihre physikochemischen Parameter, wie Tropfengröße oder geringe Viskosität (Delgado-Charro, Iglesias-Vilas et al. 1997; Kanikkannan und Singh 2002; Bouchemal, Briancon et al. 2004; Djekic und Primorac 2008), einen positiven Effekt auf die Penetration von Wirkstoffen ausüben; andererseits ist die Auswahl der Inhaltsstoffe entscheidend, da diese maßgeblich mit den Lipiden des Stratum Corneums interagieren und die Penetration verstärken können.

Der Einsatz von Penetrationsverstärkern muss überlegt sein, da eine Alternierung der kristallinen Struktur der interzellularen Lipidschicht des Stratum Corneums mit einem Eingriff in die Barrierefunktion der Haut einhergeht. Gerade chemische Penetrationsverstärker können ein irritatives Potential besitzen (Kanikkannan und Singh 2002). Literaturbekannte Penetrationsverstärker sind zum Beispiel organische Lösungsmittel, wie Alkohole (Bommannan, Potts et al. 1990), Polyole (Bendas 1995), Sulfoxide (etwa DMSO, (Barry 1987)) oder Fettsäuren, wie Ölsäure (Aungst 1989), Linolsäure, Linolensäure (Santoyo und Ygartua 2000) sowie essentielle Öle und Terpene (Williams 1999), wie Cineol, Menthol, oder Surfactants (nonionisch, kationisch, anionisch), wie Polysorbate, Natrium Lauryl Sulfat (Ashton, Walters et al. 1992) oder Phospholipide (Foldvari 2000). In den letzten Jahren erfolgte auch der Einsatz von Stoffen, die eigens zum Zweck der Penetrationssteigerung entwickelt

wurden, so etwa Azone (Hadgraft, Peck et al. 1996) und Transcutol (Mura, Faucci et al. 2000). Die wichtigsten Mechanismen zur Beeinflussung des Wirkstofftransports sind: Extraktion von Lipiden aus dem Stratum Corneums, Veränderung des Verteilungskoeffizienten Vehikel/Haut, Störung der Struktur der Lipid-Doppelschichten, Verdrängung von gebundenem Wasser, Lockerung der Keratinstruktur der Hornzellen (Daniels und Knie 2007).

Kein Trägersystem erfüllt per se alle erwähnten Eigenschaften, wie Wirkstoffschutz, Verstärkung der Penetration sowie Compliance für den Anwender und Basispflege der betroffenen Hautareale. Daher wurden im Rahmen der Arbeit zwei Klassen von Trägersystemen parallel während der galenischen Entwicklung in Betracht gezogen. Zum einen die mikroskalierten Trägersysteme Submikronemulsion und Mikroemulsionen mit verstärktem Penetrationspotential und zum anderen multiple Emulsionen und W/O-Emulsionen mit Schutzfunktion für das DNAzym hgd 40 durch Einschluss in die innere Phase.

Aufgrund von herausragenden Transporteigenschaften zur Applikation von Wirkstoffen (Patravale und Mandawgade 2008) sind Mikroemulsionen und Submikronemulsionen von besonderem Interesse. Diese galenischen Formen sind in kosmetischen Produkten teilweise realisiert, spielen allerdings in pharmazeutischen Präparaten bislang eine untergeordnete Rolle (Daniels und Knie 2007). Diese Systeme bewerkstelligen den im Vergleich zu konventionellen Trägersystemen erhöhten Transport von Wirkstoffen durch die Art und Menge der eingesetzten Emulgatoren und Hilfsstoffe sowie der geringen Tropfengröße und Viskosität. Die Entwicklung einer Mikroemulsion mit geringem Irritationspotential und niedrigem Emulgatorgehalt wurde mit Hilfe der Emulgatoren Labrasol® und Plurol oleique® sowie Propylenglycol als Lösungsvermittler bewerkstelligt. Im Falle der Submikronemulsionen wurden die penetrationsfördernden Eigenschaften einerseits durch die durch Oleth-3 und Oleth-10 erreichten geringen Tropfengrößen (Friedmann, Schwarz et al. 1995) und andererseits durch das in die Ölphase integrierte Oleyl Oleate erreicht. Oleyl Oleate ist ein Ester der Ölsäure, welche aufgrund ihrer sterischen Eigenschaften in der Lage ist, die rigide Lipidbarriere des Stratum Corneums aufzulockern (Kanikkannan und Singh 2002; Ongpipattanakul, Burnette et al. 1991). Beiden Systemen gemein ist der einfache apparative Aufwand der Herstellung mittels Rotor-Stator Homogenisatoren.

Des Weiteren lag der Fokus auf Trägersystemen, bei denen der Wirkstoff geschützt in der inneren Phase einer Emulsion vorliegt. Hier lag neben einer Wasser-in-Öl-Emulsion der Fokus auf Wasser-in-Öl-in-Wasser Emulsionen. Diese multiplen Emulsionen wurden als Kandidaten mit der größten Schnittmenge an Eigenschaften favorisiert. Sie enthalten zwar im Vergleich zu Submikronemulsion und Mikroemulsion geringere Mengen an penetrationsfördernden Inhaltsstoffen, dennoch kann bei Emulsionen eine Penetrationssteigerung von Wirkstoffen neben der Hydratation der Haut, etwa durch Okklusionseffekte der eingesetzten Hilfsstoffe oder durch die Wasserphase erfolgen (Foldvari 2000). Ein längerer Kontakt mit Wasser kann zu einer bis zu 10-fachen Penetration von Wirkstoffen durch Hydratation des Stratum Corneum erfolgen (Potts und Francoeur 1991; Hadgraft 2001). Die Wassereinlagerung lockert die kompakte Struktur der Hornschicht auf und macht sie permeabler. Der Wassergehalt kann entweder durch Abgabe aus dem Vehikel erreicht werden oder durch das Auftragen teil-okklusiver Zubereitungen, welche die transepidermale Wasserabgabe behindern (Daniels und Knie 2007).

Ein weiterer Vorteil der multiplen Emulsionen sind ihre pflegenden Eigenschaften.

Um den Anforderungen einer sensiblen Haut eines Atopikers und den Aspekten einer traditionell angewandten und bewährten fettreichen, okklusiven Basispflege gerecht zu werden (Hanifin, Cooper et al. 2004), wurde im Rahmen der Arbeit als Vergleichssystem das konventionelle Trägersystem Wasser-in-Öl-Emulsion eingesetzt. Konkret wurde hierzu die hydrophobe Basiscreme nach DAC NRF verwendet. Im Falle der multiplen Emulsionen wurde Paraffinöl als Ölphase aufgrund seines ausgeprägten okklusiven Effekts ausgewählt (Stamatas, Sterke et al. 2008). Genauso wie bei der Wasser-in-Öl-Emulsion liegt der Wirkstoff geschützt in der inneren Phase vor.

Betrachtet man zusammenfassend die galenischen Entwicklungsarbeiten aller Trägersysteme, so kann festgehalten werden, dass alle Trägersysteme nach entsprechender Optimierung ausreichende physikochemische Stabilität aufzeigten. Betrachtet man jedoch die Stabilitätsdaten hinsichtlich der Wirkstoffwiederfindung, so zeigten die Systeme, in denen der Wirkstoff nicht eingeschlossen war (Submikronemulsion und Mikroemulsion), eine Degradation des Wirkstoffs DNAzym hgd40 über den Lagerzeitraum. Ähnliche Ergebnisse wurden für pharmazeutische Wirkstoffe (Fukushima, Nishida et al. 1987; Khopade und Jain 1999; Lindenstruth

und Müller 2004) und Geschmacksstoffe in Nahrungsmitteln gezeigt (Garti und Benichou 2003).

Für den in der Wasser-in-Öl Emulsion eingeschlossenen Wirkstoff zeigte sich ebenfalls eine Degradation. Möglicherweise lag eine unspezifische Wechselwirkung zwischen Wirkstoff und Hilfsstoffen vor. Ausschließlich die multiple Emulsion zeigte ausreichende Stabilität und Schutz des DNAzym hgd 40 in allen untersuchten Parametern.

Parallel zur Galenischen Entwicklung und Stabilitätsprüfung der Rezepturen erfolgten umfangreiche Untersuchungen zur Schutzfunktion der Galeniken gegenüber hauteigenen DNasen und zur Bioverfügbarkeit des Wirkstoffs in der Haut. DNA-abbauende Enzyme konnten auf der Haut und im Hautgewebe nachgewiesen werden. Deoxynukleasen auf der Haut werden dort ubiquitär als Abwehrstrategie durch Mikroorganismen, wie etwa Staphylokokken (Langlois, Harmon et al. 1989; Wierup 1978), generiert. DNAsen im Körper sind lysosomalen Ursprungs oder werden im Pankreas exprimiert. Sie lassen sich in zwei Klassen einteilen: DNase I und DNase II, beides Endonukleasen, die im Zentrum des DNA-Strangs durch Hydrolyse der Purin- und Pyrimidin-Bindung schneiden (Laskowski 1959). Die DNasen unterscheiden sich durch ihr pH Optimum (pH 7.5 für DNase I, pH 5 für DNase II) (Santojanni und Rothman 1961). Aufgrund der ubiquitär auf der Haut vorkommenden DNasen wurde mit Hilfe einer entwickelten Testmethode die Schutzeffizienz der Galeniken gegenüber einem DNase Abbau ermittelt. Hierzu wurden die Galeniken mit DNase Lösung inkubiert und der Abbau mittels HPLC Detektion bestimmt. Ein Abbau durch DNase I resultierte in einer Reduktion des Hauptpeaks und der Entstehung weiterer Peaks mit kürzeren Retentionszeiten; ähnliche Abhängigkeiten der Kettenlänge und Retentionszeit finden sich in der Literatur (Prazeres et al. 1998). Hier zeigten die Systeme Submikronemulsion und Mikroemulsion, genau wie wässrige Lösung als Vergleich, einen vollständigen Abbau des Wirkstoffes innerhalb der Formulierung. Die Systeme multiple Emulsion und Wasser-in-Öl Emulsion zeigten eine Wiederfindung des Wirkstoffs von über 60%, respektive 97%. Lag der Wirkstoff bei der multiplen Emulsion nicht geschützt in der inneren Phase vor, sondern wurde in die äußere Phase eingearbeitet, so erfolgte ein Abbau von 100%. Dies spricht für eine gute Schutz- und Einschlusseffizienz des Wirkstoffes durch multiple Emulsionen. Bislang konnte eine Schutzfunktion für DNA durch Einschluss nur für Liposome (Ali, Tariq et al. 2009), Lipoplexe (Henriques,

Madeira et al. 2009) oder kationische Dendrimere (Bielinska, Kukowska-Latallo et al. 1996) erbracht werden.

Zur Untersuchung der Kinetik wurden Freisetzungsversuche an Cellulosemembranen sowie finite-dose und infinite-dose Penetrationsversuche mittels Franzzellen und Schweineohrenhaut durchgeführt. Die Systeme Mikroemulsion und Submikronemulsion überzeugten zunächst mit einer im Vergleich zu der multiplen Emulsion und der W/O-Emulsion höheren Freisetzung und höheren Hautpenetration innerhalb der infinite-dose Versuche (500 µL auf 1,76 cm² Hautfläche) nach 24 Stunden. Die erhöhte Penetration der Trägersysteme Mikroemulsion und Submikronemulsion gegenüber konventionellen Systemen deckt sich mit aktueller Literatur (Friedman, Schwarz et al. 1995; Ebrahimi, Lavi et al. 2008). So zeigte etwa Ferreira (Ferreira, Seiller et al. 2004) ähnliche Ergebnisse mit Glucose als Modellwirkstoff. Abweichend zu aktueller Literatur (D. Verma, S. Verma et al. 2003) zeigten die mit unterschiedlichen Tropfengrößen hergestellten Submikronemulsionen jedoch auf die Penetration von DNAzyme keinen signifikanten Einfluss – vermutlich aufgrund der breiten Tropfengrößenverteilung oder durch übergeordnete Rolle der penetrationsfördernden Eigenschaften der Inhaltsstoffe. Dennoch überzeugte die Submikronemulsion vermutlich aufgrund der penetrationsfördernden Eigenschaften des enthaltenden Oleylestere der Ölsäure (Kanikkannan und Singh 2002).

Es gilt zu bemerken, dass bei infinite-dose Versuchen die Emulsionen bei diesem Versuchsaufbau aufgrund der großen Mengen an applizierter Emulsion intakt auf der Haut verbleiben. Gerade aber multiple Emulsionen müssen für die Freisetzung der inneren Wasserphase und somit des Wirkstoffs mit der Zeit durch Verdunstung oder durch Scherkräfte brechen (Muguet, Seiller et al. 2001; Olivieri, Seiller et al. 2003) und setzen somit den Wirkstoff bei infinite-dose Versuchen nicht automatisch frei. Das Phänomen der gesicherten Freisetzung bestätigte sich innerhalb der realistischeren 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 somit 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 bei dem finite-dose Experiment nicht in größeren Mengen zu penetrieren, da er vorab durch die hauteigenen DNasen

abgebaut wird. Grundsätzlich zeigte sich bei allen Untersuchungen eine Penetration größtenteils in die obere Hautschicht. Da jedoch GATA-3 durch Immunzellen im Entzündungsinfiltrat und epidermale Zellen gebildet wird (Justice, Borchers et al. 2002; Masuda, Yoshikai et al. 2004; Zon, Yamaguchi et al. 1993), scheint die Eindringtiefe für einen therapeutischen Effekt ausreichend. Neben einer Penetration in die Haut ist auch ein Eindringen des Wirkstoffs in Zellen für einen pharmakologischen Effekt nötig. FACS-Analysen der Hautlysate der finite-dose Versuche zeigten eine etwa 4-fach höhere Aufnahme des Wirkstoffs in epidermale Zellen durch die multiple Emulsion im Vergleich zu der Submikronemulsion. Erste eruiierende Versuche in einem murinen Entzündungsmodell sind erfolgsversprechend (Schmidts, Garn et al. 2010). Hierzu wurde ein Mausmodell eingesetzt, in dem durch allergische Sensibilisierung mit dem Modellallergen Ovalbumin (OVA) und nachfolgender wiederholter epikutaner Applikation über Hautpatches eine spezifische Entzündungsreaktion in der Haut der Mäuse induziert wurde. Neben den typischen histologischen Veränderungen in der Haut wird dabei auch die erwartete erhöhte Expression des Zielgens GATA-3 sowie von Zytokinen der Th₂-Zellen ausgelöst und nachgewiesen. Durch Einsatz der multiplen Emulsion war eine therapeutische Wirksamkeit sichtbar. So wurde ein signifikant verminderter Entzündungs-Score und weniger Entzündungszellen, insbesondere CD4⁺-T-Lymphozyten, in den Hautarealen nachgewiesen.

Die durchweg positiven Ergebnisse dieser Versuche sowie parallele Untersuchungen des gleichen GATA-3-spezifischen DNAzyms zur Therapie des Asthma Bronchiale (Sel, Wegmann et al. 2008) lassen eine kausale, dermale Therapie der Atopischen Dermatitis mit Antisense Oligonukleotiden geschützt in multiplen Emulsionen in greifbare Nähe rücken.

REFERENZEN

- Ali, A., Tariq, M., Patel, R., Ittoo, F., 2008. Interaction of glycine with cationic, anionic, and nonionic surfactants at different temperatures: a volumetric, viscometric, refractive index, conductometric, and fluorescence probe study. *Colloid & Polymer Science* 286, 183–190.
- Ashton, P., Walters, K.A., Brain, K.R., Hadgraft, J., 1992. Surfactant effects in percutaneous absorption I. Effects on the transdermal flux of methyl nicotinate. *International Journal of Pharmaceutics* 87, 261–264.
- Aungst, B.J., 1989. Structure/Effect Studies of Fatty Acid Isomers as Skin Penetration Enhancers and Skin Irritants. *Pharmaceutical Research* 6, 244–247.
- Bally, M.B., Harvie, P., Wong, F.M., Kong, S., Wasan, E.K., Reimer, D.L., 1999. Biological barriers to cellular delivery of lipid-based DNA carriers. *Advanced Drug Delivery Reviews* 38, 291–315.
- Barnes, P.J., 1998. Anti-inflammatory actions of glucocorticoids: molecular mechanisms. *Clinical Science* 94, 557–572.
- Barnes, P.J., 2008. Role of GATA-3 in allergic diseases. *Curr. Mol. Med.* 8, 330–334.
- Bendas, B., Schmalfuß, U., Neubert, R., 1995. Influence of propylene glycol as cosolvent on mechanisms of drug transport from hydrogels. *International Journal of Pharmaceutics* 116, 19–30.
- Benichou, A., Garti, N., 2003. Recent Developments in Double Emulsions for Food Applications, in: Friberg, S., Larsson, K., Sjöblom, J. (Eds.), *Food Emulsions*. CRC Press.
- Bieber, T., 2008. Atopic Dermatitis. *Ann Dermatol* 22-2, 125-137.
- Bielinska, A., Kukowska-Latallo, J.F., Johnson, J., Tomalia, D.A., Baker, J.R., 1996. Regulation of in vitro gene expression using antisense oligonucleotides or antisense expression plasmids transfected using starburst PAMAM dendrimers. *Nucleic Acids Res* 24, 2176–2182.
- Bommannan, D., Potts, R.O., Guy, R.H., 1990. Examination of stratum corneum barrier function in vivo by infrared spectroscopy. *J. Invest. Dermatol.* 95, 403–408.
- Bouchemal, K., Briançon, S., Perrier, E., Fessi, H., 2004. Nano-emulsion formulation using spontaneous emulsification: solvent, oil and surfactant optimisation. *International Journal of Pharmaceutics* 280, 241–251.
- Breuer, K., Werfel, T., Kapp, A., 2006. Allergic Manifestations of Skin Diseases – Atopic Dermatitis. *Chem Immunol Allergy* 91, 76-86.
- Cairns, M.J., King, A., Sun, L.-Q., 2003. Optimisation of the 10–23 DNAzyme–substrate pairing interactions enhanced RNA cleavage activity at purine–cytosine target sites. *Nucl. Acids Res.* 31, 2883–2889.
- Conwell, C.C., Huang, L., 2005. Recent advances in non-viral gene delivery. *Adv. Genet.* 53, 3–18.
- Cork, M., 1997. The importance of skin barrier function. *Journal of Dermatological Treatment* 8, S7–S13.
- Daniels, R., Knie, U., 2007. Galenics of dermal products – vehicles, properties and drug release. *JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft* 5, 367–383.
- Delgado-Charro, M.B., Iglesias-Vilas, G., Blanco-Méndez, J., López-Quintela, M.A., Marty, J.-P., Guy, R.H., 1997. Delivery of a hydrophilic solute through the skin from novel microemulsion systems. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 43, 37–42.

- Djekic, L., Primorac, M., 2008. The influence of cosurfactants and oils on the formation of pharmaceutical microemulsions based on PEG-8 caprylic/capric glycerides. *International Journal of Pharmaceutics* 352, 231–239.
- Ebrahimi, M., Lavi, G., Schmidts, T., Runkel, F., Czermak, P., 2008. Development and production of oil-in-water vehicles — sub-micron emulsion using tubular ceramic membranes. *Desalination* 224, 40–45.
- Elias, P.M., 1988. Structure and function of the stratum corneum permeability barrier. *Drug Development Research* 13, 97–105.
- Ferreira, L.A.M., Seiller, M., Grossiord, J.L., Marty, J.P., Wepierre, J., 1994. Vehicle influence on in vitro release of metronidazole: role of w/o/w multiple emulsion. *International Journal of Pharmaceutics* 109, 251–259.
- Foldvari, 2000. Non-invasive administration of drugs through the skin: challenges in delivery system design. *Pharm. Sci. Technol. Today* 3, 417–425.
- Friedman, D.I., Schwarz, J.S., Weisspapir, M., 1995. Submicron emulsion vehicle for enhanced transdermal delivery of steroidal and nonsteroidal antiinflammatory drugs. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 84, 324–329.
- Fukushima, S., Nishida, M., Nakano, M., 1987. Preparation of and drug release from W/O/W type double emulsions containing anticancer agents using an oily lymphographic agent as an oil phase. *Chem. Pharm. Bull.* 35, 3375–3381.
- Hadgraft, J., 2001. Skin, the final frontier. *International Journal of Pharmaceutics* 224, 1–18.
- Hanifin, J.M., Cooper, K.D., Ho, V.C., Kang, S., Krafchik, B.R., Margolis, D.J., Schachner, L.A., Sidbury, R., Whitmore, S.E., Sieck, C.K., Van Voorhees, A.S., 2004. Guidelines of care for atopic dermatitis. *Journal of the American Academy of Dermatology* 50, 391–404.
- Hengge, U.R., Ruzicka, T., Schwartz, R.A., Cork, M.J., 2006. Adverse effects of topical glucocorticosteroids. *Journal of the American Academy of Dermatology* 54, 1–15.
- Henriques, A.M., Madeira, C., Fevereiro, M., Prazeres, D.M.F., Aires-Barros, M.R., Monteiro, G.A., 2009. Effect of cationic liposomes/DNA charge ratio on gene expression and antibody response of a candidate DNA vaccine against Maedi Visna virus. *International Journal of Pharmaceutics* 377, 92–98.
- Heymann, E., 2003. *Haut, Haar und Kosmetik: eine chemische Wechselwirkung; Handbuch für Körperpflegeberufe, Apotheker und Dermatologen*. Huber, Bern
- Hirasawa, R., Shimizu, R., Takahashi, S., Osawa, M., Takayanagi, S., Kato, Y., Onodera, M., Minegishi, N., Yamamoto, M., Fukao, K., Taniguchi, H., Nakauchi, H., Iwama, A., 2002. Essential and Instructive Roles of GATA Factors in Eosinophil Development. *J Exp Med* 195, 1379–1386.
- Howell, M.D., Kim, B.E., Gao, P., Grant, A.V., Boguniewicz, M., DeBenedetto, A., Schneider, L., Beck, L.A., Barnes, K.C., Leung, D.Y.M., 2007. Cytokine modulation of atopic dermatitis filaggrin skin expression. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 120, 150–155.
- Sugarman, J. L., 2008. The Epidermal Barrier in Atopic Dermatitis. *Semin Cutan Med Surg* 27, 108-114.
- Johansson, S.G.O., Hourihane, J. o', Bousquet, J., Brujnzeel-Koomen, C., Dreborg, S., Haahtela, T., Kowalski, M.L., Mygind, N., Ring, J., Van Cauwenberge, P., Van Hage-Hamsten, M., Wüthrich, B., 2001. A revised nomenclature for allergy: An EAACI position statement from the EAACI nomenclature task force. *Allergy* 56, 813–824.
- Justice, J.P., Borchers, M.T., Lee, J.J., Rowan, W.H., Shibata, Y., Scott, M.R.V., 2002. Ragweed-induced expression of GATA-3, IL-4, and IL-5 by eosinophils

- in the lungs of allergic C57BL/6J mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 282, L302–L309.
- Kanikkannan, N., Singh, M., 2002. Skin permeation enhancement effect and skin irritation of saturated fatty alcohols. *International Journal of Pharmaceutics* 248, 219–228.
- Khopade, A.J., Jain, N.K., 1999. Multiple emulsions containing rifampicin. *Pharmazie* 54, 915–919.
- Kim, C.-K., Kim, S.-C., Shin, H.-J., Kim, K.M., Oh, K.-H., Lee, Y.-B., Oh, I.-J., 1995. Preparation and characterization of cytarabine-loaded w/o/w multiple emulsions. *International Journal of Pharmaceutics* 124, 61–67.
- Knoch, A., Merkle, H.P., 1985. Theorie und Praxis transdermaler Freigabesysteme. *Acta pharmaceutica technologica* 31, 197–209.
- Kurreck, J., 2003. Antisense technologies. *European Journal of Biochemistry* 270, 1628–1644.
- Langlois, B.E., Harmon, R.J., Akers, K., Aaron, D.K., 1989. Comparison of methods for determining DNase and phosphatase activities of staphylococci. *J. Clin. Microbiol.* 27, 1127–1129.
- Laskowski, M., 1959. ENZYMES HYDROLYZING DNA*. *Annals of the New York Academy of Sciences* 81, 776–783.
- Leung, D.Y., Bieber, T., 2003. Atopic dermatitis. *The Lancet* 361, 151–160.
- Leung, D.Y.M., Soter, N.A., 2001. Cellular and immunologic mechanisms in atopic dermatitis. *Journal of the American Academy of Dermatology* 44, S1–S12.
- Lindenstruth, K., Müller, B.W., 2004. W/O/W multiple emulsions with diclofenac sodium. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 58, 621–627.
- Lüllmann, H., Mohr, K., Wehling, M., 1999. *Pharmakologie und Toxikologie*. Thieme, Stuttgart.
- Masuda, A., Yoshikai, Y., Kume, H., Matsuguchi, T., 2004. The Interaction between GATA Proteins and Activator Protein-1 Promotes the Transcription of IL-13 in Mast Cells. *J Immunol* 173, 5564–5573.
- Miller, P.S., Ts'o, P.O., 1987. A new approach to chemotherapy based on molecular biology and nucleic acid chemistry: Matagen (masking tape for gene expression). *Anticancer Drug Des.* 2, 117–128.
- Muguet, V., Seiller, M., Barratt, G., Ozer, O., Marty, J., Grossiord, J., 2001. Formulation of shear rate sensitive multiple emulsions. *Journal of Controlled Release* 70, 37–49.
- Mura, P., Faucci, M., Bramanti, G., Corti, P., 2000. Evaluation of transcutol as a clonazepam transdermal permeation enhancer from hydrophilic gel formulations. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 9, 365–372.
- Muschiolik, G., Bunjes, H., 2007. *Multiple Emulsionen: Herstellung und Eigenschaften*. Behr's Verlag, Hamburg.
- Nghiem, P., Pearson, G., Langley, R.G., 2002. Tacrolimus and pimecrolimus: From clever prokaryotes to inhibiting calcineurin and treating atopic dermatitis. *Journal of the American Academy of Dermatology* 46, 228–241.
- Olivieri, L., Seiller, M., Bromberg, L., Besnard, M., Duong, T.-N.-L., Grossiord, J.-L., 2003. Optimization of a thermally reversible W/O/W multiple emulsion for shear-induced drug release. *Journal of Controlled Release* 88, 401–412.
- Ongpipattanakul, B., Burnette, R., Potts, R., Francoeur, M., 1991. Evidence that Oleic Acid Exists in a Separate Phase Within Stratum Corneum Lipids. *Pharmaceutical Research* 8, 350–354.
- Patravale, V.B., Mandawgade, S.D., 2008. Novel cosmetic delivery systems: an

- application update. *International Journal of Cosmetic Science* 30, 19–33.
- Potts, R.O., Francoeur, M.L., 1991. The influence of stratum corneum morphology on water permeability. *J. Invest. Dermatol.* 96, 495–499.
- Prazeres, D.M.F., Schlupe, T., Cooney, C., 1998. Preparative purification of supercoiled plasmid DNA using anion-exchange chromatography. *Journal of Chromatography A* 806, 31–45.
- SANTOIANI, P., ROTHMAN, S., 1961. Nucleic acid-splitting enzymes in human epidermis and their possible role in keratinization. *J. Invest. Dermatol.* 37, 489–495.
- Santoyo, S., Ygartua, P., 2000. Effect of skin pretreatment with fatty acids on percutaneous absorption and skin retention of piroxicam after its topical application. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 50, 245–250.
- Schlosser, K., Gu, J., Lam, J.C.F., Li, Y., 2008. In vitro selection of small RNA-cleaving deoxyribozymes that cleave pyrimidine–pyrimidine junctions. *Nucleic Acids Res* 36, 4768–4777.
- Schmidts, T., Dobler, D., Guldán, A.-C., Paulus, N., Runkel, F., 2010. Multiple W/O/W emulsions—Using the required HLB for emulsifier evaluation. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 372, 48–54.
- Schmidts, T., Dobler, D., Nissing, C., Runkel, F., 2009. Influence of hydrophilic surfactants on the properties of multiple W/O/W emulsions. *Journal of Colloid and Interface Science* 338, 184–192.
- Schmidts, T., Dobler, D., Schlupp, P., Nissing, C., Garn, H., Runkel, F., 2010. Development of multiple W/O/W emulsions as dermal carrier system for oligonucleotides: Effect of additives on emulsion stability. *International Journal of Pharmaceutics* 398, 107–113.
- Schmidts, T., Dobler, D., von den Hoff, S., Schlupp, P., Garn, H., Runkel, F., 2011. Protective effect of drug delivery systems against the enzymatic degradation of dermally applied DNAzyme. *International Journal of Pharmaceutics* 410, 75–82.
- Schmidts, T., Garn, H., Runkel, F., 2011. Dermatologische, pharmazeutische Zusammensetzung geeignet für Oligonukleotide. Patent DE102010007562A1
- Schmidts, T., Marquardt, K., Schlupp, P., Dobler, D., Heinz, F., Mäder, U., Garn, H., Renz, H., Zeitvogel, J., Werfel, T., Runkel, F., 2012. Development of drug delivery systems for the dermal application of therapeutic DNAzymes. *International Journal of Pharmaceutics* 431, 61–69.
- Schmidts, T., Nocker, P., Lavi, G., Kuhlmann, J., Czermak, P., Runkel, F., 2009. Development of an alternative, time and cost saving method of creating pseudoternary diagrams using the example of a microemulsion. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 340, 187–192.
- Schmidts, T., Schlupp, P., Gross, A., Dobler, D., Runkel, F., 2012. Required HLB Determination of Some Pharmaceutical Oils in Submicron Emulsions. *Journal of Dispersion Science and Technology* 33, 816–820.
- Sel, S., Wegmann, M., Dicke, T., Sel, S., Henke, W., Yildirim, A.Ö., Renz, H., Garn, H., 2008. Effective prevention and therapy of experimental allergic asthma using a GATA-3-specific DNAzyme. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 121, 910–916.e5.
- Stamatas, G.N., de Sterke, J., Hauser, M., von Stetten, O., van der Pol, A., 2008. Lipid uptake and skin occlusion following topical application of oils on adult and infant skin. *Journal of Dermatological Science* 50, 135–142.
- Verma, D.D., Verma, S., Blume, G., Fahr, A., 2003. Particle size of liposomes

- influences dermal delivery of substances into skin. *International Journal of Pharmaceutics* 258, 141–151.
- Weaver, J.C., Vaughan, T.E., Chizmadzhev, Y., 1999. Theory of electrical creation of aqueous pathways across skin transport barriers. *Advanced Drug Delivery Reviews* 35, 21–39.
- Wierup, M., 1978. Production of coagulase, deoxyribonuclease and heat-stable deoxyribonuclease by canine isolates of staphylococci. *Zentralbl Bakteriolog Orig A* 242, 431–435.
- Williams, H.C., 1999. Diagnostic Criteria for Atopic Dermatitis: Where Do We Go From Here? *Archives of Dermatology* 135, 583–586.
- Williams, H.C., 2000. Epidemiology of atopic dermatitis. *Clin. Exp. Dermatol.* 25, 522–529.
- Zon, L.I., Yamaguchi, Y., Yee, K., Albee, E.A., Kimura, A., Bennett, J.C., Orkin, S.H., Ackerman, S.J., 1993. Expression of mRNA for the GATA-binding proteins in human eosinophils and basophils: potential role in gene transcription. *Blood* 81, 3234–3241.

ERKLÄRUNG ÜBER ANTEIL AN PUBLIKATIONEN

Schmidts, T., Nocker, P., Lavi, G., Kuhlmann, J., Czermak, P., Runkel, F., 2009. Development of an alternative, time and cost saving method of creating pseudoternary diagrams using the example of a microemulsion. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 340, 187–192.

Beitrag 70%: Design und Durchführung der Experimente. Analyse und Diskussion der Daten. Selbstständiges Verfassen des Manuskripts.

Schmidts, T., Schlupp, P., Gross, A., Dobler, D., Runkel, F., 2012. Required HLB Determination of Some Pharmaceutical Oils in Submicron Emulsions. *Journal of Dispersion Science and Technology* 33, 816–820.

Beitrag 60%: Design der gesamten Versuchsplanung. Durchführung von Teilen der Experimente. Analyse und Diskussion der Daten. Verfassen eines Großteils des Manuskripts.

Schmidts, T., Dobler, D., Nissing, C., Runkel, F., 2009. Influence of hydrophilic surfactants on the properties of multiple W/O/W emulsions. *Journal of Colloid and Interface Science* 338, 184–192.

Beitrag 60%: Design und Durchführung der Experimente und Erhebung der Physikochemischen Parameter. Analyse und Diskussion der Daten. Selbstständiges Verfassen des Manuskripts.

Schmidts, T., Dobler, D., Guldán, A.-C., Paulus, N., Runkel, F., 2010. Multiple W/O/W emulsions—Using the required HLB for emulsifier evaluation. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 372, 48–54.

Beitrag 60%: Versuchsplanung und Erhebung von analytischen Daten. Herstellung und Charakterisierung von Trägersystemen. Analyse und Diskussion der Daten. Verfassen des Manuskripts.

Schmidts, T., Dobler, D., Schlupp, P., Nissing, C., Garn, H., Runkel, F., 2010. Development of multiple W/O/W emulsions as dermal carrier system for oligonucleotides: Effect of additives on emulsion stability. *International Journal of Pharmaceutics* 398, 107–113.

Beitrag 55%: Versuchsplanung und Erhebung von analytischen Daten. Herstellung und Charakterisierung von Trägersystemen. Analyse und Diskussion der Daten. Verfassen eines Großteils des Manuskripts.

Schmidts, T., Dobler, D., von den Hoff, S., Schlupp, P., Garn, H., Runkel, F., 2011. Protective effect of drug delivery systems against the enzymatic degradation of dermally applied DNase. *International Journal of Pharmaceutics* 410, 75–82.

Beitrag 70%: Design und Durchführung von Teilen der Experimente. Analyse und Diskussion der Daten. Verfassen eines Großteils des Manuskripts.

Schmidts, T., Marquardt, K., Schlupp, P., Dobler, D., Heinz, F., Mäder, U., Garn, H., Renz, H., Zeitvogel, J., Werfel, T., Runkel, F., 2012. Development of drug delivery systems for the dermal application of therapeutic DNAzymes. *International Journal of Pharmaceutics* 431, 61–69.

Beitrag 70%: Design der gesamten Versuchsplanung. Durchführung eines Großteils der Experimente. Herstellung und Charakterisierung von Trägersystemen sowie HPLC Analyse. Analyse und Diskussion der Daten. Verfassen eines Großteils des Manuskripts.

AUSGEWÄHLTE PUBLIKATIONEN

Publikation 1:

Schmidts, T., Nocker, P., Lavi, G., Kuhlmann, J., Czermak, P., Runkel, F., 2009. Development of an alternative, time and cost saving method of creating pseudoternary diagrams using the example of a microemulsion. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 340, 187–192.

Publikation 2:

Schmidts, T., Schlupp, P., Gross, A., Dobler, D., Runkel, F., 2012. Required HLB Determination of Some Pharmaceutical Oils in Submicron Emulsions. *Journal of Dispersion Science and Technology* 33, 816–820.

Publikation 3:

Schmidts, T., Dobler, D., Nissing, C., Runkel, F., 2009. Influence of hydrophilic surfactants on the properties of multiple W/O/W emulsions. *Journal of Colloid and Interface Science* 338, 184–192.

Publikation 4:

Schmidts, T., Dobler, D., Guldán, A.-C., Paulus, N., Runkel, F., 2010. Multiple W/O/W emulsions—Using the required HLB for emulsifier evaluation. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 372, 48–54.

Publikation 5:

Schmidts, T., Dobler, D., Schlupp, P., Nissing, C., Garn, H., Runkel, F., 2010. Development of multiple W/O/W emulsions as dermal carrier system for oligonucleotides: Effect of additives on emulsion stability. *International Journal of Pharmaceutics* 398, 107–113.

Publikation 6:

Schmidts, T., Dobler, D., von den Hoff, S., Schlupp, P., Garn, H., Runkel, F., 2011. Protective effect of drug delivery systems against the enzymatic degradation of dermally applied DNase. *International Journal of Pharmaceutics* 410, 75–82.

Publikation 7:

Schmidts, T., Marquardt, K., Schlupp, P., Dobler, D., Heinz, F., Mäder, U., Garn, H., Renz, H., Zeitvogel, J., Werfel, T., Runkel, F., 2012. Development of drug delivery systems for the dermal application of therapeutic DNases. *International Journal of Pharmaceutics* 431, 61–69.

Publikation 1:

Schmidts, T., Nocker, P., Lavi, G., Kuhlmann, J., Czermak, P., Runkel, F., 2009. Development of an alternative, time and cost saving method of creating pseudoternary diagrams using the example of a microemulsion. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 340, 187–192.

Aus Gründen des Urheber- und Lizenzrechts (Copyright) ist diese Publikation und damit die Seiten 33 bis 38 nicht Bestandteil der Online-Veröffentlichung.

Publikation 2:

Schmidts, T., Schlupp, P., Gross, A., Dobler, D., Runkel, F., 2012. Required HLB Determination of Some Pharmaceutical Oils in Submicron Emulsions. *Journal of Dispersion Science and Technology* 33, 816–820.

Aus Gründen des Urheber- und Lizenzrechts (Copyright) ist diese Publikation und damit die Seiten 39 bis 43 nicht Bestandteil der Online-Veröffentlichung.

Publikation 3:

Schmidts, T., Dobler, D., Nissing, C., Runkel, F., 2009. Influence of hydrophilic surfactants on the properties of multiple W/O/W emulsions. *Journal of Colloid and Interface Science* 338, 184–192.

Aus Gründen des Urheber- und Lizenzrechts (Copyright) ist diese Publikation und damit die Seiten 44 bis 52 nicht Bestandteil der Online-Veröffentlichung.

Publikation 4:

Schmidts, T., Dobler, D., Guldán, A.-C., Paulus, N., Runkel, F., 2010. Multiple W/O/W emulsions—Using the required HLB for emulsifier evaluation. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 372, 48–54.

Aus Gründen des Urheber- und Lizenzrechts (Copyright) ist diese Publikation und damit die Seiten 53 bis 59 nicht Bestandteil der Online-Veröffentlichung.

Publikation 5:

Schmidts, T., Dobler, D., Schlupp, P., Nissing, C., Garn, H., Runkel, F., 2010. Development of multiple W/O/W emulsions as dermal carrier system for oligonucleotides: Effect of additives on emulsion stability. *International Journal of Pharmaceutics* 398, 107–113.

Aus Gründen des Urheber- und Lizenzrechts (Copyright) ist diese Publikation und damit die Seiten 60 bis 66 nicht Bestandteil der Online-Veröffentlichung.

Publikation 6:

Schmidts, T., Dobler, D., von den Hoff, S., Schlupp, P., Garn, H., Runkel, F., 2011. Protective effect of drug delivery systems against the enzymatic degradation of dermally applied DNAzyme. *International Journal of Pharmaceutics* 410, 75–82.

Aus Gründen des Urheber- und Lizenzrechts (Copyright) ist diese Publikation und damit die Seiten 67 bis 74 nicht Bestandteil der Online-Veröffentlichung.

Publikation 7:

Schmidts, T., Marquardt, K., Schlupp, P., Dobler, D., Heinz, F., Mäder, U., Garn, H., Renz, H., Zeitvogel, J., Werfel, T., Runkel, F., 2012. Development of drug delivery systems for the dermal application of therapeutic DNazymes. *International Journal of Pharmaceutics* 431, 61–69.

Aus Gründen des Urheber- und Lizenzrechts (Copyright) ist diese Publikation und damit die Seiten 75 bis 83 nicht Bestandteil der Online-Veröffentlichung.

WISSENSCHAFTLICHER LEBENSLAUF

Die Seite 84 enthält persönliche Daten. Sie ist deshalb nicht Bestandteil der Online-Veröffentlichung.

PUBLIKATIONSLISTE (Stand 04/2013)

VERÖFFENTLICHUNGEN

Dobler, D., Schmidts, T., Klingenhöfer, I., Runkel, F. (2012). Ionic Liquids as ingredients in topical drug delivery systems. *International journal of pharmaceutics*; DOI:10.1016/j.ijpharm.2012.10.035

Beer, S., Dobler, D., Gross, A., Ost, M., Elseberg, C., Maeder, U., Schmidts, T., Keusgen, M., Fiebich, M., Runkel, F. (2012). In line monitoring of the preparation of water-in-oil-in-water (W/O/W) type multiple emulsions via dielectric spectroscopy. *International journal of pharmaceutics*; DOI:10.1016/j.ijpharm.2012.10.032

Maeder, U., Marquardt, K., Beer, S., Bergmann, T., Schmidts, T., Heverhagen, J., Zink, K., Runkel, F., Fiebich, M., 2012. Evaluation and quantification of spectral information in tissue by confocal microscopy. *Journal of biomedical optics* 17(10), 106011

Schmidts, T., Marquardt, K., Schlupp, P., Dobler, D., Heinz, F., Mäder, U., Garn, H., Renz, H., Zeitvogel, J., Werfel, T., Runkel, F., 2012. Development of drug delivery systems for the dermal application of therapeutic DNAzymes. *International Journal of Pharmaceutics* 431, 61–69.

Schmidts, T., Schlupp, P., Gross, A., Dobler, D., Runkel, F., 2012. Required HLB Determination of Some Pharmaceutical Oils in Submicron Emulsions. *Journal of Dispersion Science and Technology* 33, 816–820.

Hug, A.M., Schmidts, T., Kuhlmann, J., Segger, D., Fotopoulos, G., Heinzerling, J., 2012. Skin hydration and cooling effect produced by the Voltaren® vehicle gel. *Skin Research and Technology* 18, 199–206.

Schmidts, T., Dobler, D., von den Hoff, S., Schlupp, P., Garn, H., Runkel, F., 2011. Protective effect of drug delivery systems against the enzymatic degradation of dermally applied DNAzyme. *International Journal of Pharmaceutics* 410, 75–82.

Maeder, U., Schmidts, T., Avci, E., Heverhagen, J.T., Runkel, F., Fiebich, M., 2010. Feasibility of Monte Carlo simulations in quantitative tissue imaging. *Int J Artif Organs* 33, 253–259.

Schmidts, T., Dobler, D., Schlupp, P., Nissing, C., Garn, H., Runkel, F., 2010. Development of multiple W/O/W emulsions as dermal carrier system for oligonucleotides: Effect of additives on emulsion stability. *International Journal of Pharmaceutics* 398, 107–113.

Czermak, P., Steinle, T., Ebrahimi, M., Schmidts, T., Runkel, F., 2010. Membrane-assisted production of S1P loaded SLNs for the treatment of acne vulgaris. *Desalination* 250, 1132–1135.

Schmidts, T., Dobler, D., Guldán, A.-C., Paulus, N., Runkel, F., 2010. Multiple W/O/W emulsions—Using the required HLB for emulsifier evaluation. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 372, 48–54.

Schmidts, T., Nocker, P., Lavi, G., Kuhlmann, J., Czermak, P., Runkel, F., 2009. Development of an alternative, time and cost saving method of creating pseudoternary diagrams using the example of a microemulsion. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 340, 187–192.

Schmidts, T., Dobler, D., Nissing, C., Runkel, F., 2009. Influence of hydrophilic surfactants on the properties of multiple W/O/W emulsions. *Journal of Colloid and Interface Science* 338, 184–192.

Ebrahimi, M., Lavi, G., Schmidts, T., Runkel, F., Czermak, P., 2008. Development and production of oil-in-water vehicles — sub-micron emulsion using tubular ceramic membranes. *Desalination* 224, 40–45.

TAGUNGSBEITRÄGE - PROCEEDINGS

Eisenhardt, M., Dobler, D., Schmidts, T., Runkel, F. Conference Proceeding: Thermo sensitive hydrogels as carrier-systems for insect-based proteins in chronic wound management. 17. Jahrestagung der Gesellschaft für Dermopharmaka, Mainz; 03/2013

Beer, S., Maeder, U., Bergmann, T., Schlupp, P., Schmidts, T., Heverhagen, J.T., Runkel, F., Fiebich, M., 2011. Calibration phantom for the quantification of fluorescent labels in deep skin tissue. *Proceedings of SPIE* 8086, 80861L–80861L–4.

Bergmann, T., Beer, S., Maeder, U., Burg, J.M., Schlupp, P., Schmidts, T., Runkel, F., Fiebich, M., 2011. Development of a skin phantom of the epidermis and evaluation by using fluorescence techniques. *Proceedings of SPIE* 7906, 79060T–79060T–9.

Burg, J.M., Voelker, M., Schlupp, P., Schmidts, T., Maeder, U., Bergmann, T., Runkel, F., Heverhagen, J.T., Fiebich, M., 2011. Studying skin penetration by NMR imaging. *Proceedings of SPIE* 7892, 78920V–78920V–4.

Maeder, U., Bergmann, T., Burg, J.M., Beer, S., Schlupp, P., Schmidts, T., Heverhagen, J.T., Runkel, F., Fiebich, M., 2011. 4D confocal microscopy method for drug localization in the skin. *Proceedings of SPIE* 8086, 80861A–80861A–6.

Maeder, U., Schmidts, T., Burg, J.-M., Heverhagen, J.T., Runkel, F., Fiebich, M., 2010. Hardware and software system for automatic microemulsion assay evaluation by analysis of optical properties. *Proceedings of SPIE* 7626, 762625–762625–9.

Burg J. M., Mäder U., Schmidts T., Runkel F., Fiebich M., 2010. Development of a method for quantitative determination of fluorescence dyes in skin using widefield fluorescence microscopy DGBMT, BMT 2010, Band 55, Heft s1, Seiten 21-23.

Maeder U., Burg J. M., Schmidts T., Heverhagen J., Runkel F., Fiebich M., 2010. Calculation of calibration factors for quantitative evaluation of fluorescent dye concentrations in skin using Monte-Carlo simulations DGBMT, BMT 2010, Band 55, Heft s1, Seiten 24-27.

Czermak P., Steinle, T., Ebrahimi, M., Schmidts, T., Runkel, F.: Membrane Assisted Production of S1P Loaded SLNs for the Treatment of Acne vulgaris, Proceedings 12. Aachener Membran Kolloquium 2008, p. 601-608, VIVTA Aachen 2008.

Ebrahimi, M., Lavi, G., Schmidts, T., Runkel, F., Czermak, P.: Development and Production of Oil-in-Water Vehicles Sub-micron Emulsion Using Tubular Ceramic Membranes, 11. Aachener Membran Kolloquium 2007, pp. 579-585, Verlag Mainz Aachen 2007.

Lavi, G., Ebrahimi, M., Schmidts, T., Runkel, F., Czermak, P.: Development and Production of Oil-in-Water Vehicles Microemulsion for Dermal Application of Ectoin, Extended Abstracts, Paper 439e, AIChE 2006 Annual Meeting, San Francisco, USA.

TAGUNGSBEITRÄGE - POSTER

Michaela Eisenhardt, Dorota Dobler, Thomas Schmidts, Frank Runkel. Thermo sensitive hydrogels as carrier-systems for insect-based proteins in chronic wound management. 17. Jahrestagung der Gesellschaft für Dermopharmaka, Mainz; 03/2013

Peggy Schlupp, Sören Wildenhain, Thomas Schmidts, Frank Runkel. Development of a permeation model using porcine small intestine. Bad Herrenalber Transporter- und Barriere Tage, Bad Herrenalb 14.05. - 16.05.2012.

Romy Thiele, Jürgen Engel, Sebastian Hühn, Thomas Schmidts, Frank Runkel, Karl G. Werner. Upscaling Nanosizing of Poorly water Soluble Drugs using various nanomills. 8th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, 2011, Istanbul.

Agnes M. Hug, Thomas Schmidts, Jens Kuhlmann, Dörte Segger, Grigorios Fotopoulos, Johanna Heinzerling. Skin Hydration and Cooling Properties of the Voltaren® Vehicle Gel. Skin Forum 12th Annual Meeting March 28th to 29th 2011, Frankfurt, Germany.

Peggy Schlupp, Alexander Gross, Thomas Schmidts, Frank Runkel. Development of Pharmaceutical Submicron Emulsions using the Required HLB Approach. International Congress of Pharmaceutical Engineering 2011 Graz.

Dorota Dobler, Thomas Schmidts, Sebastian Beer, Frank Runkel. In-process control of multiple W/O/W emulsions production using Impedance Spectroscopy. International Congress of Pharmaceutical Engineering 2011 Graz.

Kay Marquardt, Sebastian Hühn, Thomas Schmidts, Frank Runkel. Adaption of a SME for DNazymes. International Congress of Pharmaceutical Engineering 2011 Graz.

Thomas Schmidts, Dorota Dobler, Peggy Schlupp, Ulf Maeder, Pia Nocker, Frank Runkel. Phase Diagram by Microplate Dilution (PDMPD) as a promising tool for microemulsion development. 7th World Meeting on Pharmaceuticals, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, 8th to 11th March 2010, Malta.

Ulf Maeder, Thomas Schmidts, Jan-Michael Burg, Johannes T. Heverhagen, Frank Runkel, Martin Fiebich. Hardware and software system for automatic microemulsion assay evaluation by analysis of optical properties (2010). SPIE Medical Imaging, 13 - 18 February 2010, USA.

Peggy Schlupp, Thomas Schmidts, Christian Siewert, Ulf Mäder, Wolfgang Mehnert, Martin Fiebich, Frank Runkel. Solid Lipid Nanoparticles (SLN) - an innovative carrier system for Sphingosine-1-phosphate (S1P). EuroNanoMedicine 2009, September 28-30, Bled, Slovenia.

Frank Runkel, Mehrdad Ebrahimi, Thomas Schmidts, Peter Czermak. Membrane Assisted Production of Sphingosine-1-Phosphate Loaded Solid Lipid Nanoparticles. AIChE Annual Meeting, 8.-12.11.2009, Nashville, USA.

Dorota Dobler, Thomas Schmidts, Frank Runkel. Influence of emulsifiers and preparation conditions on the properties of multiple emulsions, Jahrestagung 2009 der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft. 28. September - 1. Oktober 2009, Jena.

Czermak P, Steinle T, M Ebrahimi, T Schmidts, F Runkel: Membrane Assisted Production of Sphingosine-1-Phosphate (S1P) Loaded Solid Lipid Nanoparticles (SLN) for Treatment of Acne vulgaris, 12. Aachener Membran Kolloquium, 29.-30.10.2008.

G. Lavi, M. Ebrahimi, T. Schmidts, F. Runkel, P. Czermak: Development and Production of Oil-in-Water Vehicles Sub-micron Emulsion Using Tubular Ceramic Membranes, 11. Aachener Membran Kolloquium 28.-29.3.2007.

Lavi, G., M. Ebrahimi, T. Schmidts, F. Runkel, P. Czermak: Development and Production of Oil-in-Water Vehicles Microemulsion for Dermal Application of Ectoin, AIChE 2006 Annual Meeting, San Francisco, USA, 12.11.2006.

Lavi, G, Schmidts, T, Runkel, F, Czermak, P.: Comparing the Preparation of Microemulsion containing Ectoin by Ceramic-Membrane to different shear dispersing emulsification methods, Engineering with Membranes 2005, Camogli, Italien, 15.-18.5.2005.

VORTRÄGE

2012, Schmidts: Multiple Emulsionen als Trägersysteme zum Schutz von dermal appliziertem DNAzym. 16. Jahrestagung der GD Gesellschaft für Dermopharmazie, 2012 Berlin.

PATENTE

WO 2009/053741 A2 Novel Formulation, a hydrophilic nailgel for treating onychomycosis.

DE 102010007562 A1 Dermatologische, pharmazeutische Zusammensetzung geeignet für Oligonukleotide.

VERZEICHNIS DER AKADEMISCHEN LEHRER

Meine akademischen Lehrer waren Damen/Herren in Gießen:

Alter, Breckow, Czermak, Dammann, Gokorsch, Heimrich, Hemberger, Kitzrow, Kirschbaum, Kleinöder, Kügler, Lauwerth, Leicht, Metz, Nietert, Platen, Röhm, Röhricht, Runkel, Stadlbauer

Meine akademischen Lehrer waren Damen/Herren in Marburg:

Jacob, Lill, Lillig, Renz

DANKSAGUNG

Die vorliegende kooperative Dissertation entstand an der Technischen Hochschule Mittelhessen - Institut für Bioverfahrenstechnik und Pharmazeutische Technologie (Leitung Prof. Dr.-Ing. Peter Czermak und Prof. Dr. Frank Runkel) und an der Philipps-Universität Marburg - Institut für Laboratoriumsmedizin, Pathobiochemie und Molekulare Diagnostik (Leitung Prof. Dr. Harald Renz). Mein Dank gilt den jeweiligen Institutsleitern für die Bereitstellung von Ressourcen und die Möglichkeit, diese Arbeit an den Instituten durchführen zu können.

Mein Dank gilt Prof. Dr. Harald Renz für die Übernahme des Referats, die konstruktive und fachliche Unterstützung während meiner Arbeit sowie für die grundsätzliche Bereitschaft, mich als Externen über die Universität Marburg zu promovieren. Ich danke auch Dr. Holger Garn und Dr. Joachim Bille für die konstruktive Zusammenarbeit und Diskussion.

Mein ganz persönlicher Dank gilt Prof. Dr. Frank Runkel, Vizepräsident der Technischen Hochschule Mittelhessen - nicht nur für die Übernahme des Referats sondern auch für seine Unterstützung und Förderung seit Anbeginn meines Studiums. Lieber Frank, Du hast es über all die Jahre geschafft mir gleichermaßen Mentor, Vorgesetzter, Kollege und Vertrauensperson zu sein. Du hast mir frühzeitig Kompetenzen und Verantwortung übertragen, viele Freiheiten eingeräumt und Dich immer für mich eingesetzt. Ohne Dich wäre diese Arbeit nicht entstanden. Für das mir entgegengebrachte Vertrauen danke ich Dir sehr.

Des Weiteren danke ich den Herren Professoren Jacob, Lill und Lillig des Instituts für Zytobiologie und Zytopathologie, die mich an der Universität Marburg mit offenen Armen empfangen und unterstützt haben.

Mein Dank gilt weiterhin Dr. Dorota Dobler für die pragmatischen Diskussionen bei den Publikationen. Ohne Dich, liebe Dorota, wäre diese Arbeit noch nicht fertig. Danke auch an Dr. Peggy Schlupp für den Beistand gerade zum Ende der Arbeit hin und für die sehr konstruktive Hin- und Rückfahrt nach Hamburg.

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie, meiner Frau Cornelia und unseren Kindern Johanna und David, die mir immer wieder aufzeigen, was wirklich wichtig ist im Leben.

EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel: „Entwicklung innovativer Trägersysteme zur gezielten dermalen Applikation eines GATA-3-spezifischen DNAzyms als Therapeutikum der Atopischen Dermatitis“ aus dem Institut für Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie, Molekulare Diagnostik unter Leitung von Prof. Dr. med. Harald Renz in Kooperation mit dem Institut für Bioverfahrenstechnik und Pharmazeutische Technologie der Technischen Hochschule Mittelhessen unter Leitung von Prof. Dr.-Ing. Peter Czermak und Prof. Dr. rer. nat. Frank Runkel ohne die unzulässige Hilfe Dritter selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- oder ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Vorliegende Arbeit wurde in Teilen in folgenden Publikationsorganen veröffentlicht:

International Journal of Pharmaceutics

Journal of Colloid and Interface Science

Journal of Dispersion Science and Technology

Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects

Thomas Schmidts - Gießen, im April 2013