

Schlussbericht vom 23.03.2026

zum IGF-Vorhaben Nr.: 22947 N/1

Thema

Nachweis der Eignung der konfokalen Raman-Mikrospektroskopie zur Durchführung von Bioäquivalenzuntersuchungen von Dermatika

Berichtszeitraum

01.05.2023 - 31.12.2025

Forschungsvereinigung

Forschungsvereinigung der Arzneimittel-Hersteller e. V. (FAH)
Mühlenstr. 33
53173 Bonn

Forschungseinrichtung

Eberhard-Karls-Universität Tübingen

Fachbereich Pharmazie und Biochemie

Arbeitsgruppe Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie
Prof. Dr. Dominique Lunter (Leiterin des Forschungsprojekts)
Jonas Link (Doktorand)
Yinlu Gao (Masterandin)
Boguslaw Adamek (Technische Angestellte)

Auf der Morgenstelle 8
72076 Tübingen

Danksagung

Das IGF-Vorhaben 22947 N/1

der Forschungsvereinigung der Arzneimittel-Hersteller e. V. (Bonn, Deutschland)

zum Thema

„Nachweis der Eignung der konfokalen Raman-Mikrospektroskopie zur Durchführung von Bioäquivalenzuntersuchungen von Dermatika“

wurde über das Deutsche Zentrum für Luft- und Raumfahrt im Rahmen des Programms zur Förderung der industriellen Gemeinschaftsforschung und -entwicklung (IGF) vom Bundesministerium für Wirtschaft und Energie aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages gefördert. Für diese Förderung sei gedankt.

Darüber hinaus sprechen wir unseren Dank an die im projektbegleitenden Ausschuss vertretenen Unternehmen aus, die das Projekt mit wertvollen fachlichen Diskussionen und konstruktiver Unterstützung maßgeblich bereichert haben.

Der vorliegende Bericht stellt den Abschlussbericht dieses Forschungsvorhabens dar.

Abkürzungsverzeichnis

ACN	-	Acetonitril
API	-	Aktiver pharmazeutischer Wirkstoff
ATR-IR	-	Abgeschwächte Totalreflexions-Infrarot-Spektroskopie
AUC	-	Peakfläche (Fläche unter der Kurve)
BSA	-	Bovines Serumalbumin
CHMP	-	Ausschuss für Medizinprodukte und Humanarzneimittel der EMA
CI / KI	-	Konfidenzintervall
CRS	-	Konfokale Raman Spektroskopie
CV	-	Variationskoeffizient, hier: Intraindividuelle Variabilität
DAC	-	Deutscher Arzneimittel-Codex
DCF	-	Diclofenac
DLR	-	Deutsches Zentrum für Luft- und Raumfahrt
DoE	-	Statistische Versuchsplanung
EMA	-	Europäische Arzneimittel-Agentur
EtOH	-	Ethanol
Ex-vivo	-	Außerhalb des lebenden Organismus (z.B. am exzidierten Gewebe)
f / ff	-	folgend(e) / fortfolgend(e) Seite
FAH	-	Forschungsvereinigung der Arzneimittel-Hersteller e. V.
FDA	-	U.S. Food and Drug Administration
GM	-	Geometrischer Mittelwert
GMS	-	Glycerolmonostearat
GSD	-	Geometrische Standardabweichung
HPLC	-	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
IGF	-	Industrielle Gemeinschaftsforschung
In-vitro	-	Im Labor
In-vivo	-	Am lebenden Organismus
IRB	-	Ethikkommission
IVPT	-	In-vitro-Permeationstest
IVRT	-	In-vitro-Freisetzungstest
KMU	-	Kleine und mittlere Unternehmen
Lanette O	-	Cetylstearylalkohol
LOD	-	Detektionsgrenze
LOQ	-	Nachweisgrenze
MW	-	Mittelwert
n	-	Stichprobenumfang
NRF	-	Neues Rezeptur-Formularium
ns	-	Nicht signifikant
O/W	-	Öl in Wasser
OFM	-	Offene Mikroperfusion
p	-	p-Wert, Wahrscheinlichkeitswert
Pa	-	Pascal (SI-Einheit für Druck und mechanische Spannung)
PA	-	Projektbegleitender Ausschuss
POE-23-LE	-	Polyoxyethylene (23) - Laurylether
Ref	-	Referenzformulierung
RI	-	Revers-Iontophorese
SA / SS	-	Salicylsäure
SC	-	Stratum corneum
SRS	-	Stimulierte Raman-Spektroskopie
Stabw / SD	-	Standardabweichung
TEWL	-	Transepidermaler Wasserverlust
TS	-	Tape-Stripping-Methode mit Klebebandabrissen
XG	-	Xanthangummi
α	-	Signifikanzniveau

Zusammenfassung

Finales Ziel des Projektes im Rahmen des IGF-Vorhabens Nr. 22947 N/1 mit dem Titel „Nachweis der Eignung der konfokalen Raman-Mikrospektroskopie zur Durchführung von Bioäquivalenzuntersuchungen von Dermatika“ war es zu zeigen, dass die konfokale Raman-Mikrospektroskopie (CRS) als neuartige Methode für Wirkstoffpenetrationsuntersuchungen geeignet ist, um zukünftig dermale Bioäquivalenzuntersuchungen durchführen zu können.

Dieses Ziel ist auch vor dem Hintergrund der neu veröffentlichten European Medicines Agency (EMA) - Leitlinie zur Äquivalenz und Qualität kutaner Produkte, die seit April 2025 in Kraft ist, von hoher Relevanz. Mit dieser Aktualisierung der Leitlinie kann nun anstelle kostenintensiver klinischer Endpunktstudien die Tape-Stripping (TS) - Methode eingesetzt werden, um Bioäquivalenz nachzuweisen. Die CRS-Methode ist hingegen aufgrund der bislang noch begrenzten Datenlage derzeit nicht als alleinstehende Methode vorgesehen, sondern lediglich in unterstützender Funktion einsetzbar.

Um das Projektziel erreichen zu können, wurde zunächst die TS-Methode mit zugehöriger HPLC-Analytik für die beiden Wirkstoffe Salicylsäure und Diclofenac etabliert. Anschließend erfolgte der Aufbau der entsprechenden Raman-Analytik, deren Ergebnisse anhand der TS-Daten verifiziert wurden. Im Einklang mit den Vorgaben der EMA-Leitlinie legten vorbereitende Untersuchungen geeignete Studienzeitpunkte fest; parallel dazu wurden entsprechende Prüfprodukte hergestellt. Da für kosmetische Salicylsäure-Produkte kein Generikamarkt existiert, musste für das Testprodukt dieser Untersuchungen zunächst eine möglichst bioäquivalente Nachbildung durch Reverse-Engineering eines Referenzproduktes entwickelt werden.

Anschließend erfolgten die vergleichenden Bioäquivalenzuntersuchungen an identischen Hautproben. In den ex-vivo Versuchen zu Salicylsäure ließ sich ein zusätzlicher Vergleich zwischen Schweinehaut und Humanhaut durchführen, wobei bei beiden Hautmodellen Bioäquivalenz gezeigt werden konnte. Die CRS-Ergebnisse wurden stets mit den parallel erhobenen TS-Daten als Goldstandard verglichen und entsprechend verifiziert. Damit ließ sich sowohl die Eignung der Methode als auch das erfolgreiche Reverse-Engineering des nachgebildeten Testproduktes belegen. Entsprechende ex-vivo Studien zu Diclofenac an Schweinehaut verliefen ebenfalls erfolgreich. Dabei zeigte sich die diskriminatorische Aussagekraft der Methode anhand geeigneter Kontrollformulierungen für beide Wirkstoffe.

Abschließend bestätigten die Ergebnisse zu Salicylsäure in einer kosmetischen in-vivo Humanstudie unter strenger Befolgung der EMA-Leitlinie die zuvor gewonnenen Erkenntnisse. Die hierbei generierten Daten stellen die ersten systematischen Ergebnisse dieser Art dar und wurden publiziert.

Somit konnte das Ziel, die Eignung der CRS-Methode für dermale Bioäquivalenzuntersuchungen nachzuweisen, erreicht werden. Die Resultate wurden zudem auf verschiedenen wissenschaftlichen Kongressen vorgestellt. Kleine und mittelständische Unternehmen könnten bei Aufnahme der CRS-Methode in eine zukünftige aktualisierte Leitlinie aufgrund ihrer vergleichsweise guten Standardisierbarkeit kostengünstiger bioäquivalente Dermatika zur Zulassung bringen und damit zu einer finanziellen Entlastung der Gesundheitssysteme beitragen.

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	I
Abkürzungsverzeichnis	II
Zusammenfassung	III
1. Wissenschaftlich-technische und wirtschaftliche Problemstellung	1
2. Wirtschaftliche Bedeutung der angestrebten Forschungsergebnisse für KMU	3
3. Stand von Forschung und Entwicklung zu Projektbeginn	5
4. Arbeitshypothese	7
5. Durchgeführte Arbeiten und Ergebnisse	10
5.1 Arbeitspaket 1: Entwicklung einer HPLC-Analytik für Salicylsäure und Diclofenac	10
5.2 Arbeitspaket 2: Reverse-Engineering bzw. die Nachbildung einer Salicylsäure-haltigen Referenzformulierung	12
5.2.1 Charakterisierung der Referenzformulierung	13
5.2.2 Etablierung einer Herstellmethode	16
5.2.3 Reverse-Engineering der Testformulierung für spätere Bioäquivalenzuntersuchungen	17
5.3 Arbeitspaket 3: Evaluierung relevanter Einflussfaktoren auf die Penetration von Salicylsäure & Entwicklung der Studien-Kontrollformulierungen	20
5.4 Arbeitspaket 4: Penetrationsuntersuchungen zur Festlegung geeigneter Studienzeitpunkte für Salicylsäure und Diclofenac	23
5.4.1 Untersuchung für Salicylsäure-Studien	25
5.4.2 Untersuchung für Diclofenac-Studien	26
5.5 Arbeitspaket 5: Ex-vivo Penetrations- und Bioäquivalenzuntersuchungen mittels Tape-Stripping (TS) und konfokaler Raman-Mikrospektroskopie (CRS) (Diclofenac: Schweinehaut; Salicylsäure: Schweinehaut und Humanhaut)	27
5.5.1 CRS-Methodenentwicklung zur vollen Quantifizierung der Wirkstoffe	29
5.5.2 Ex-vivo Bioäquivalenzuntersuchungen für Salicylsäure an menschlicher Haut	31
5.5.3 Ex-vivo Bioäquivalenzuntersuchungen für Salicylsäure an Schweinehaut	33
5.5.4 Ex-vivo Bioäquivalenzuntersuchungen für Diclofenac an Schweinehaut	34
5.6 Arbeitspaket 6: Durchführung einer pivotalen in-vivo CRS-Bioäquivalenzstudie in Anlehnung an die neue EMA-Leitlinie (Salicylsäure)	36
5.6.1 Zusätzliche Untersuchung	47
5.7 Arbeitspaket 7: Veröffentlichung und Präsentation der gewonnenen Ergebnisse	49
5.8 Arbeitspaket 8: Fortlaufende Dokumentation und Berichterstattung	50

6. Erweiterung des Stands von Wissenschaft und Technik während des Projektzeitraums	50
6.1 Kritik am alten EMA-Leitlinienentwurf.....	50
6.2 Aktualisierung der EMA-Leitlinie zur dermalen Bioäquivalenz.....	51
6.3 Durchführende Forschungsgruppe zur Vergleichbarkeit von TS und CRS sowie der Anwendung beider Methoden für Bioäquivalenzuntersuchungen	52
6.4 Nico et al. zur Verbesserung der quantitativen CRS-Methodik	53
6.5 Zusätzliche Studien zur CRS-Anwendung für Bioäquivalenzuntersuchungen	53
6.6 Alternative neuartige Methoden zur Untersuchung der dermalen Bioäquivalenz	55
7. Fazit.....	56
8. Verwendung der Zuwendung.....	57
9. Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit	58
10. Darstellung des wissenschaftlich-technischen und wirtschaftlichen Nutzens der erzielten Ergebnisse insbesondere für KMU sowie ihres innovativen Beitrags und ihrer industriellen Anwendungsmöglichkeiten	59
11. Wissenstransfer in die Wirtschaft	61
11.1 Konferenzen	61
11.2 Publikationen	62
11.2.1 In Fachzeitschriften.....	62
11.2.2 Weitere Veröffentlichungen	62
12. Plan zum Ergebnistransfer in die Wirtschaft	63
12.1 Durchgeführte Transfermaßnahmen (vom Projektstart bis zum Projektende).....	63
12.2 Geplante Transfermaßnahmen (nach Projektende)	65
13. Einschätzung der Realisierbarkeit.....	67
14. Literaturverzeichnis	68

1. Wissenschaftlich-technische und wirtschaftliche Problemstellung

Im Rahmen der Zulassung von Arzneimitteln sind Wirksamkeit und Unbedenklichkeit nachzuweisen. Die Zulassung sogenannter Generika (Nachahmerpräparate) wird erleichtert, indem diese Bezug auf die Zulassungsunterlagen des Originators nehmen dürfen. Es muss daher üblicherweise nur noch die Bioäquivalenz nachgewiesen werden. Auf umfangreiche Sicherheits- und Wirksamkeitsstudien kann verzichtet werden, da diese bereits vom Originator durchgeführt wurden. Dermatika stellten hier bisher eine Ausnahme dar. Auch im Rahmen der Generikazulassung mussten Wirksamkeitsprüfungen am Patienten durchgeführt werden. Diese sind zeit- und vor allem äußerst kostenintensiv. Daher müssen die zu prüfenden Formulierungen im Vorfeld sorgfältig ausgewählt werden, um nicht unnötig hohe Kosten durch eine unnötig hohe Anzahl von in-vivo-Untersuchungen zu erzeugen.

Die vorläufige Version der Leitlinie der European Medicines Agency (EMA) „Draft guideline on quality and equivalence of topical products“ [1], die sich lange im Bearbeitungsmodus befand und nun seit April 2025 durch die aktive Leitlinie „Guideline on quality and equivalence of locally applied, locally acting cutaneous products“ [2] abgelöst wurde, spezifiziert nun erstmals Kriterien für die Anwendung von Permeations- und Penetrationsuntersuchungen zum Nachweis der Bioäquivalenz von Dermatika. Im Rahmen dieser Methoden werden die Permeation eines Arzneistoffs durch oder die Penetration in die Haut mithilfe geeigneter Methoden quantifiziert. Dazu werden das Test- und das Referenzprodukt zusammen mit einer Negativkontrolle untersucht. Es wird die Äquivalenz von Test- und Referenzprodukt sowie die Nicht-Äquivalenz zur Kontrollformulierung nachgewiesen. Die Permeationsuntersuchungen erfolgen ex-vivo mithilfe exzidiierter Haut und bestimmen die Menge Arzneistoff, die im zeitlichen Verlauf über die Haut in ein geeignetes Rezeptormedium permeiert ist. Sie stellen damit im Grunde ein Modell für die transdermale Absorption von Arzneistoffen dar. Die Penetrationsuntersuchungen erfolgen in-vivo an gesunden Probanden und bestimmen die Menge Arzneistoff, die in das Stratum corneum (SC) aufgenommen wurde. Mithilfe von Klebebandabrissen wird das SC sukzessive Schicht für Schicht abgetragen, sodass nach Bestimmung des Wirkstoffgehalts in den einzelnen Klebebandabrissen ein Konzentrations-Tiefen-Profil erstellt werden kann. Bei beiden Untersuchungen fällt eine Vielzahl Proben an: Während bei den Permeationsuntersuchungen Proben zu mehreren Zeitpunkten entnommen und analysiert werden, werden bei den Penetrationsuntersuchungen nur zu zwei Zeitpunkten Proben genommen. Diese bestehen jedoch aus einer größeren Anzahl von Klebebandabrissen (ca. 12 - 30), die einzeln analysiert werden. Bei beiden Untersuchungen fordert die EMA, dass mit Haut von einer großen Anzahl Spendern/Probanden (≥ 12) gearbeitet wird, sodass sich insgesamt eine sehr hohe Probenanzahl (je Formulierung bis zu 400 Proben) ergibt. Die Analyse dieser Proben ist sowohl zeit- als auch kosten- und ressourcenintensiv.

CRS ist eine Methode, die sowohl ex-vivo als auch in-vivo die Detektion von Arzneistoffen in der Haut ohne die Verwendung von Markersubstanzen zulässt und die zudem nicht invasiv und zerstörungsfrei ist. Sie ist damit eine neuartige Alternativmethode anstelle der Tape-Stripping (TS) - Methode für Penetrationsuntersuchungen. Die Konfokalität garantiert dabei, dass Informationen aus verschiedenen Tiefen des SC gewonnen werden können, sodass hier, vergleichbar mit den konventionellen Penetrationsuntersuchungen, Konzentrations-Tiefen-Profile erhalten werden können. Zudem sind weitere Schritte, wie die Segmentierung der Haut, Extraktion und nachfolgende Quantifizierung aufgrund der

direkten Konzentrationsbestimmung über die Raman Mikrospektroskopie nicht notwendig. Die eigentliche Raman-spektroskopische Messung dauert nur wenige Minuten. Dies bedeutet, dass sich die Zeit bis zum Erhalt der Ergebnisse auf kaum mehr als die Inkubationszeit beschränkt und keine weiteren Kosten für Lösemittel oder HPLC-Material sowie kein Sondermüll (Lösemittel) anfallen. Dadurch können deutlich Zeit und auch Kosten eingespart werden. Bisherige Ergebnisse aus dem Bereich der Forschung haben gezeigt, dass mit der Methode der konfokalen Raman Mikrospektroskopie vergleichbare Ergebnisse zu ex-vivo Penetrationsuntersuchungen erhalten werden können. Ebenso ist bekannt, dass die Methode auch in-vivo zuverlässige Ergebnisse liefert. Dennoch weist der Richtlinienentwurf der EMA darauf hin, dass die konfokale Raman Spektroskopie noch nicht ausreichend etabliert ist, um Äquivalenzdaten zu generieren, aber unterstützende Daten liefern kann. Damit dokumentiert die EMA, dass generell Interesse an der Implementierung der Methode besteht, gibt aber gleichzeitig den Auftrag an die Forschung sich eingehender mit der Etablierung der Methode zu befassen.

Hier setzte das abgeschlossene Projekt an. Es sollte anhand von zwei Modellarzneistoffen in zwei Formulierungen gezeigt werden, dass CRS vergleichbare Ergebnisse mit den im Richtlinienentwurf beschriebenen Penetrationsuntersuchungen zeigt. Damit kann erreicht werden, dass ihre Anwendung in der Bioäquivalenz Untersuchung von Dermatika möglich und von den Behörden zukünftig akzeptiert wird. Dazu soll das abgeschlossene Projekt nun einen Beitrag leisten.

2. Wirtschaftliche Bedeutung der angestrebten Forschungsergebnisse für KMU

Das Projekt zielt auf die Verwendung einer innovativen Technologie in der mittleren bis späten Entwicklungsphase von Arzneimitteln zur äußerlichen Anwendung (Dermatika) ab. Der Vorteil der Methode gegenüber den bisher verwendeten Methoden liegt darin, dass essentielle Daten über die Arzneistoffaufnahme in die Haut deutlich schneller und mit geringerem, ressourcenschonendem Aufwand gewonnen werden können. Bei Anwendung der konfokalen Raman Mikrospektroskopie in der Entwicklung wird die Auswahl geeigneter Formulierungen für spätere in-vivo Untersuchungen beschleunigt und bei Aufnahme der Methode in eine spätere aktualisierte Version der neuen EMA-Leitlinie [2], könnten Bioäquivalenz-Daten generiert werden, welche teure in-vivo Wirksamkeitsuntersuchungen mit Endpunkt ersetzen würden.

Die wirtschaftliche Bedeutung des Vorhabens für kleine und mittlere Unternehmen ergibt sich aus den folgenden Überlegungen: Der Umsatz der pharmazeutischen Industrie wird weltweit auf 115,24 Mrd USD beziffert [3]. Davon entfallen 13,8 Mrd USD auf den Bereich Dermatika [4]. Die Umsätze auf dem deutschen Pharma-Gesamtmarkt beliefen sich 2020 auf 49,5 Mrd Euro [5]. Deutschland liegt somit auf Platz vier hinter den USA, China und Japan [6]. Die deutsche pharmazeutische Industrie stellte 2019 Produkte im Wert von 31,1 Mrd Euro her [7]. Immer noch ist der Großteil der deutschen pharmazeutischen Unternehmen, nämlich 67 % den kleinen und mittelständischen Unternehmen zuzuordnen, obgleich der Anteil rückläufig ist [8]. Diese vermarkten ihre Produkte zu einem großen Teil innerhalb Deutschlands, aber auch im europäischen Ausland, wobei die Konzentration auf Deutschland als Absatzmarkt mit abnehmender Größe der Unternehmen steigt [9]. Die Situation der mittelständischen deutschen Pharma-Unternehmen wird vom Bundesverband der Pharmazeutischen Industrie (BPI) als immer schwieriger beschrieben, da sie im Spannungsfeld zwischen direkten Mitbewerbern aus dem mittelständischen, wie dem Großunternehmens-Sektor, neuen wissenschaftlichen Erkenntnissen und Technologien sowie einem immer stärker regulierten Gesundheitsmarkt bestehen müssen während Entwicklungs- und Marketingkosten weiterhin hoch sind. Die mittelständischen Unternehmen lösen dies, indem sie sich erfolgreich auf einzelne Indikationsgebiete und Nischenmärkte spezialisiert haben (dazu können auch Dermatika gezählt werden) und sich vor allem in Schrittinnovationen engagieren [9, 10]. Gerade hier kann das vorgeschlagene Projekt eine Hilfe sein. Nach erfolgreicher Etablierung der Methode können interessierte Unternehmen auf die Daten und Methodik zugreifen und in ihren Betrieb integrieren bzw. im Auftrag die Erhebung solcher Daten vergeben. Dies kann Neuentwicklungen wie auch Weiterentwicklungen auf Grundlage bestehender Arzneimittel beschleunigen und kosteneffizienter gestalten und damit einen Wettbewerbsvorteil sichern. Aufgrund der zunächst hohen Investitionskosten für ein konfokales Raman-Mikroskop und des erheblichen Aufwands zur Etablierung einer Methode zur Bioäquivalenzbestimmung mittels konfokaler Raman Mikrospektroskopie ist es unwahrscheinlich, dass KMU die Entwicklung der vorgeschlagenen Methode selbst in die Hand nehmen würden. Deshalb sollte die Durchführung eines solchen Projekts idealerweise im Rahmen eines Forschungsvorhabens der industriellen Gemeinschaftsforschung (IGF) erfolgen.

Des Weiteren profitieren Labore, welche ex-vivo Untersuchungen der Penetration von Arzneistoffen durchführen und Auftrags-Entwicklungslabore von den Ergebnissen des Projekts. Da die Anschaffungskosten eines konfokalen Raman-Mikroskops vergleichsweise hoch sind und auch die Etablierung mit hohem Zeit-

und Kostenaufwand verbunden ist, können sich viele, vor allem kleinere und mittlere Pharmaunternehmen dies nicht leisten. Diese werden derartige Messungen an spezialisierte Labore vergeben. Die Labore ihrerseits müssen den Großteil ihrer Zeit auf die Durchführung von Untersuchungen aufwenden und können es sich kaum leisten, einen großen zeitlichen Aufwand in die Entwicklung neuer Methoden zu investieren. Nach Abschluss des Projekts werden die Daten, wie Versuchsprotokolle, Validierungsergebnisse etc. publiziert und somit den Laboren zur Nutzung zur Verfügung stehen. Dadurch können diese im Anschluss die Methode übernehmen und nutzen, um Aufträge von Pharmaunternehmen zu generieren.

3. Stand von Forschung und Entwicklung zu Projektbeginn

In der Entwicklung dermalen Arzneimittel werden ex-vivo Permeations- und Penetrationsuntersuchungen verwendet, um im Vorfeld von in-vivo Wirksamkeitsprüfungen die vielversprechendsten Formulierungskandidaten zu isolieren. Konventionelle Testmethoden beruhen auf der Inkubation exzidierten Haut mit der Formulierung und der anschließenden Analyse des Arzneistoffgehalts in der Haut und/oder der obersten Hautschicht, dem Stratum corneum (Penetrationsuntersuchungen) oder der Analyse des Arzneistoffs, der durch die Haut in ein geeignetes Rezeptormedium permeiert ist (Permeationsuntersuchungen). Penetrationsuntersuchungen, die auf die Analyse des Arzneistoffgehalts im Stratum corneum beschränkt sind, können auch in-vivo durchgeführt werden. Im Leitlinienentwurf der EMA werden ex-vivo Permeationsuntersuchungen und in-vivo Penetrationsuntersuchungen beschrieben, in der Forschung werden Penetrationsuntersuchungen auch ex-vivo durchgeführt. Penetrationsuntersuchungen können die Wirkstoffkonzentration in der Haut bestimmen, es handelt sich allerdings bezüglich der verwendeten Haut um eine zerstörende Prüfung. Daher ist für jeden Messzeitpunkt eine neue Probe notwendig. Pro Messzeitpunkt fallen in der Regel 12-30 Klebebandabrisse als Proben an, die einzeln analysiert werden müssen. Die Analytik ist daher sehr zeit- und kostenintensiv. Gleichzeitig limitiert die Menge der vorhandenen Haut pro Spender die Anzahl an Zeitpunkten bzw. Wiederholungsexperimenten, die an ihr durchgeführt werden können. Der Vorteil der Penetrationsuntersuchungen liegt darin, dass sie sowohl ex-vivo als auch in-vivo in gleicher Weise durchgeführt werden können, allerdings sind zum einen in-vivo Messungen in frühen Entwicklungsstadien nicht zweckmäßig und zum anderen sind auch bei der in-vivo Untersuchung die verfügbaren Hautflächen (also Applikationsstellen pro Proband, an denen man die Penetration untersuchen kann) limitiert. Aufgrund einer hohen interindividuellen Variabilität müssen die Untersuchungen an einer geeigneten Anzahl Probanden (mindestens zwölf) wiederholt werden, um aussagekräftige Ergebnisse zu erzielen. Neben den konventionellen Methoden werden auch konfokale optische Methoden in der Untersuchung der Penetration eingesetzt. Diese umfassen die Fluoreszenzmikroskopie, abgeschwächte Totalreflexions-Infrarot-Spektroskopie und -Mikroskopie (ATR-IR) sowie die konfokale Raman-Mikrospektroskopie. Insbesondere letztere eignet sich ausgesprochen gut zur Untersuchung der Arzneistoff Penetration in die Haut, da sie eine hohe Ortsauflösung mit einer hohen Eindringtiefe kombiniert. Dadurch lassen sich exakte Konzentrations-Tiefen-Profile erstellen, die denen der konventionellen ex-vivo Penetrationsuntersuchungen vergleichbar sind und zudem nicht-invasiver und nicht-zerstörerischer Natur sind.

Neben verschiedenen Untersuchungen zur Verteilung von hauteigenen Substanzen, wie Carotinoiden, Harnstoff oder Wasser [11-16] umfassen bisherige Untersuchungen mittels konfokaler Raman Mikrospektroskopie die Hautpenetration von verschiedenen lipophilen, wie hydrophilen Stoffen aus dem Bereich der Arzneimittel und Kosmetik. So stellten Puppels und Caspers als zwei der ersten Forscher die Machbarkeit der Raman-spektroskopischen Detektion von Xenobiotika in der Haut dar, indem sie die Penetration von Retinol untersuchten [17, 18]. Daneben wurden von verschiedenen Forschergruppen die Penetration von Metronidazol, Coffein, Resveratrol, Diclofenac, Lidocain, Sulfathiazol, Niacinamid und Salicylsäure aus Lösungen untersucht [19-26]. Weitere Untersuchungen befassen sich auch mit dem Einfluss von penetrationsfördernden Substanzen auf die Hautpenetration von Arzneistoffen [27-29]. In diesem Kontext wurden in der durchführenden Forschungseinrichtung der Einfluss von Penetrationsverbesserungen

und Emulgatoren auf die Penetration von Coffein, Retinol und Procain in umfangreichen Untersuchungen evaluiert [28, 30-35]. Obwohl allgemein bekannt ist, dass die Formulierungszusammensetzung einen großen Effekt auf die Hautpenetration ausübt, berücksichtigten bisher nur wenige Forschungsarbeiten, unter ihnen die Untersuchungen der durchführenden Forschungseinrichtung die Penetration von Wirkstoffen aus einer echten Formulierung, während ansonsten die meisten Untersuchungen nur mit einfachen Wirkstofflösungen durchgeführt wurden [28]. Auch hier hat die durchführende Forschungseinrichtung einen entscheidenden Beitrag geleistet, indem sie die Penetration von Coffein, Procain und Retinol aus Gelen und Emulsionen untersucht hat [28, 32, 33, 36, 37]. Weitere Untersuchungen an Formulierungen befassen sich z.B. mit kosmetischen Inhaltsstoffen [38]. Ebenso gibt es bisher kaum Raman-spektroskopisch erhobene Daten zur Kinetik der Arzneistoffaufnahme bzw. des Arzneistofftransports in der Haut. Neben Flach und Tfayli, die die Arzneistoffkonzentration in der Haut nach zwei Zeitpunkten untersuchten, um daraus kinetische Daten abzuleiten, entstanden in der durchführenden Forschungseinrichtung im Rahmen eines vorhergehenden IGF-Projektes detaillierte Daten zur Kinetik der Arzneistoff Penetration mittels konfokaler Raman Mikrospektroskopie [19, 27, 31, 36, 39]. Ebenso hat bisher einzig die durchführenden Forschungseinrichtung eine systematische Gegenüberstellung der etablierten Methoden der Permeations- und Penetrationsuntersuchungen mit den Untersuchungen mittels konfokaler Raman Mikrospektroskopie durchgeführt [26, 33]. Alle bisherigen Untersuchungen der durchführenden Forschungseinrichtung wurden mit postaurikulärer Schweinehaut durchgeführt, dem bevorzugten und validen Tiermodell für die Humanhaut [40].

Es ist also inzwischen gezeigt, dass die Raman-mikroskopische Detektion der Hautpenetration von einer breiten Auswahl von Arzneistoffen mit unterschiedlichsten physikalisch-chemischen Eigenschaften möglich ist. Für einen Technologietransfer in die pharmazeutische Industrie fehlen allerdings noch systematische Untersuchungen zur Penetration von Arzneistoffen aus Fertigarzneimitteln. Anhand dieser Formulierungen muss sodann gezeigt werden, dass mithilfe der konfokalen Raman-Mikrospektroskopie Ergebnisse erhalten werden, welche denen der konventionellen Methoden äquivalent sind. Dieser Vergleich sollte möglichst nahe an der von der EMA beschriebenen Versuchsdurchführung der Bioäquivalenz-Bestimmung gehalten werden und möglichst sowohl Formulierungen umfassen bei denen von Bioäquivalenz auszugehen ist als auch Formulierungen bei denen davon auszugehen ist, dass sie keine Bioäquivalenz zeigen werden. Die entwickelte Methode muss dann zeigen, dass sie in der Lage ist bioäquivalente und nicht-bioäquivalente Formulierungen zu unterscheiden.

4. Arbeitshypothese

Die EMA beschreibt in ihrem Leitlinienentwurf [2] ex-vivo Permeationsuntersuchungen und in-vivo Penetrationsuntersuchungen zur Bestimmung der Bioäquivalenz je nach Komplexität der zu untersuchenden Formulierung. Die Durchführung des vorgeschlagenen Projekts orientierte sich eng an dieser Beschreibung, v.a. jedoch an der nun mit der neusten Aktualisierung der EMA-Leitlinie [2] akzeptierten konventionellen TS-Methode als Goldstandard, bei der das SC der zu testenden Hautareale mit Klebeband nach Inkubation mit den Formulierungen abgerissen wird.

Um die Eignung der neuartigen CRS-Methode zu belegen, wurden zunächst die konventionellen TS ex-vivo Penetrationsuntersuchungen durchgeführt und simultan bzw. anschließend die ex-vivo und in-vivo Penetrationsuntersuchungen mittels CRS durchgeführt. Diese Durchführung sollte sich dabei eng an den Vorgaben der EMA-Leitlinie orientieren, wobei nachfolgend die wichtigsten Aspekte beschrieben werden:

Die ex-vivo Penetrationsuntersuchungen erfolgten für beide Messmethoden (konventionelles TS und neuartige CRS) an denselben drei exzidierten Hautproben (für Schweinehaut und Humanhaut), um interindividuellen Schwankungen adäquat zu begegnen. Die Untersuchungen wurden mit einer finiten Dosierung der Formulierung ($= 15 \text{ mg Formulierung/cm}^2$) [1, 41] und unter nicht okkludierten Bedingungen durchgeführt, um den in-vivo Bedingungen möglichst nahe zu kommen.

Um die späteren Studienzeitpunkte festzulegen, bei denen die finalen Bioäquivalenzuntersuchungen von Interesse durchgeführt werden sollten, wurden in separaten vorläufigen Versuchsreihen für alle Wirkstoffe entsprechende TS-Untersuchungen durchgeführt. Die EMA fordert für die nun akzeptierten TS-Penetrationsuntersuchungen zwei Zeitpunkte: Einen Uptake-Zeitpunkt, bei dem die Aufnahme des Wirkstoffes in das SC untersucht werden soll, und der sich im zeitlichen Steady-State (Gleichgewicht zwischen Invasion und Clearance) befinden soll, sodass keine Verfälschungen durch einen zeitlichen Faktor entstehen können. Der zweite Zeitpunkt soll die Wirkstoffabnahme (Clearance) im SC für alle Produkte untersuchen, nachdem die Formulierungen nach der Invasionsphase von der Haut wieder abgetragen wurden und somit den Abtransport des Arzneistoffs aus dem SC in tiefere Hautschichten beschreiben. Die Reduktionsrate der kumulierten penetrierten Wirkstoffmenge soll nach EMA-Leitlinie [2] mindestens 25 % im Vergleich zum Uptake-Zeitpunkt betragen.

Zur Bewertung der Bioäquivalenz wurde die kumulierte penetrierte Arzneistoffmenge im SC am Ende des Experiments für beide Studienzeitpunkte und für jedes Produkt herangezogen. Die 90 %-Konfidenzintervalle der Produkt-zu-Produkt-Verhältnisse von Test- und Referenzpräparat müssen innerhalb der Grenzen 80,00 - 125,00 % liegen. Außerdem müssen die 90 %-KIs von Test- und Negativkontrolle sowie von Referenz und Negativkontrolle außerhalb der Grenzen 80,00 - 125,00 % liegen. Zum Nachweis der Massenbilanz wurden nach dem beendeten Penetrationsexperiment die Massen des Arzneistoffs im Akzeptormedium, in der Haut sowie in der verbleibenden Formulierung bestimmt. Die Massenbilanz sollte nach EMA [2] zwischen 90 und 110 % liegen.

In Abb. 1 sind alle von der EMA geforderten Kriterien für eine Bioäquivalenzaussage nochmals übersichtlich grafisch dargestellt:

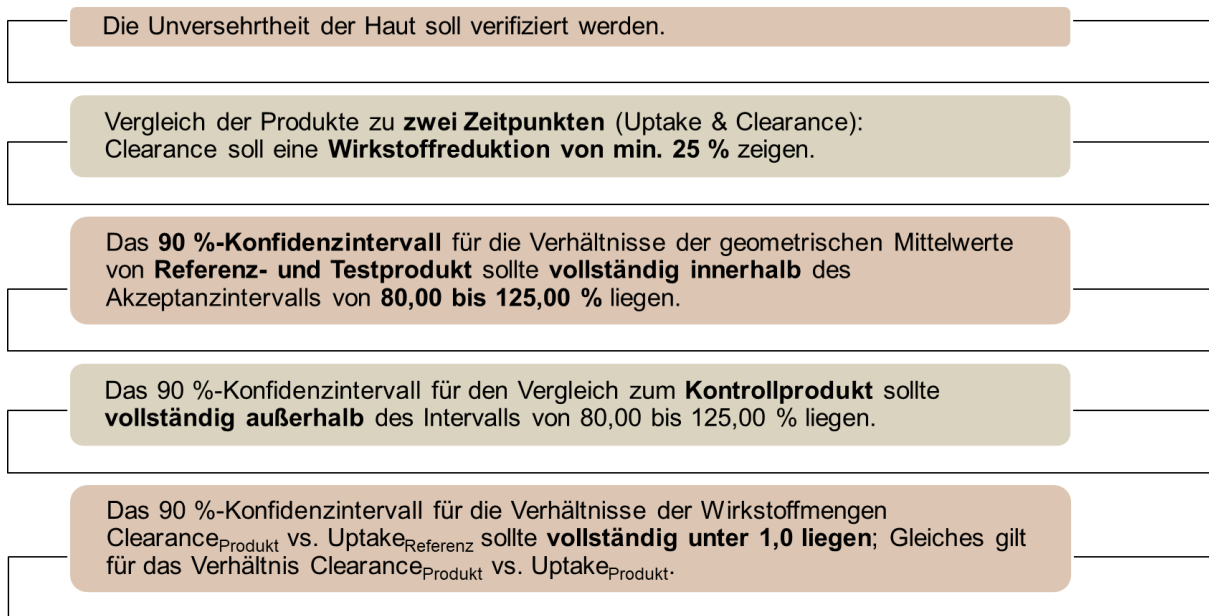


Abb. 1 EMA-Anforderungen an die Bioäquivalenz [2].

Wenn alle in Abb. 1 genannten Anforderungen erfüllt sind, kann von Bioäquivalenz ausgegangen werden.

Mit den oben beschriebenen Anforderungen ergibt sich eine große Anzahl an Proben in denen der Arzneistoff quantifiziert werden musste. Neben der Zeit, welche für die Durchführung des Experiments benötigt wurde, musste somit eine nicht unerhebliche Zeitdauer für die Analyse der Proben aufgewendet werden. Außerdem fielen hohe Kosten für HPLC-Material und Lösungsmittel an. Insgesamt war dieses Vorgehen also sowohl zeit- als auch kostenintensiv.

Entsprechend den Anforderungen der EMA [2] wurde für die ex-vivo Penetrationsuntersuchung neben der Schweinehaut auch Humanhaut verwendet - diese wurde von Körperspendern des Universitätsklinikums Tübingen bezogen; das Ethikvotum hierzu liegt vor.

Im Rahmen des Projektes wurden für die ex-vivo Untersuchungen sowohl Salicylsäure als auch Diclofenac als Modellsubstanzen eingesetzt, während für die in-vivo Untersuchungen lediglich Salicylsäure eingesetzt wurde. Eine Modellsubstanz war dabei ein Arzneistoff (Diclofenac), welcher verwendet wurde, um die Relevanz der Methode für die pharmazeutische Industrie zu zeigen. Die andere Modellsubstanz (Salicylsäure) war ein kosmetischer Wirkstoff, durch dessen Verwendung es ermöglicht wurde in-vivo Untersuchungen durchzuführen, ohne dass es sich um eine Arzneimittelstudie handelte, welche den finanziellen Rahmen des Projekts überstiegen hätte. Dadurch konnte sowohl die Anwendbarkeit der Methode auf Arzneimittel gezeigt werden als auch die Übertragbarkeit der ex-vivo Untersuchungen auf die in-vivo Situation.

Da für kosmetische Salicylsäure-Produkte kein Generikamarkt existiert, musste für das Testprodukt dieser Untersuchungen zunächst eine möglichst bioäquivalente Nachbildung durch Reverse-Engineering eines Referenzproduktes entwickelt werden, nachdem die Referenzformulierung ausgiebig charakterisiert und mögliche Penetrationsfaktoren auf die Salicylsäure-Penetration untersucht wurden.

Das übergeordnete Ziel bestand darin, die Methode der CRS zur Untersuchung der Bioäquivalenz topischer Zubereitungen weiter zu etablieren und somit dazu beizutragen, dass diese Methode in eine zukünftige EMA-Leitlinie aufgenommen werden kann. Dadurch könnte sie künftig von pharmazeutischen Unternehmen genutzt werden, um die Generikazulassung zu vereinfachen, zu beschleunigen und kosteneffizienter zu gestalten sowie gleichzeitig das Gesundheitssystem zu entlasten.

5. Durchgeführte Arbeiten und Ergebnisse

5.1 Arbeitspaket 1: Entwicklung einer HPLC-Analytik für Salicylsäure und Diclofenac

Ziel:

Ziel dieses Arbeitspaketes war die Entwicklung einer HPLC-Analytik für die beiden Wirkstoffe Salicylsäure und Diclofenac.

Details:

Im Labor wurden die beiden Analysenmethoden zunächst unabhängig voneinander entwickelt und optimiert. Dabei wurde besonderer Wert daraufgelegt, die Wirkstoffsignale eindeutig und ausreichend getrennt von potenziell störenden Analyten, wie beispielsweise aus der extrahierten Hautmatrix, zu detektieren. Gleichzeitig dazu wurde die Methodendauer so optimiert, dass der bei der Tape-Stripping-Methode anfallende hohe Probendurchsatz effizient bearbeitet werden kann.

Für Salicylsäure ergaben sich bei der Methodenentwicklung somit folgende Parameter:

- Fließmittelzusammensetzung: 37 % MeOH, 63 % H₂O (pH 2,65 - 0,1 % Ameisensäure)
- Flussrate: 1,2 mL/min
- Ofentemperatur: 37 °C
- Wellenlänge: 306 nm
- Dauer: 10 min
- Retentionszeit: ca. 5,9 min

In Abb. 2 wird das erhaltene Chromatogramm dargestellt:

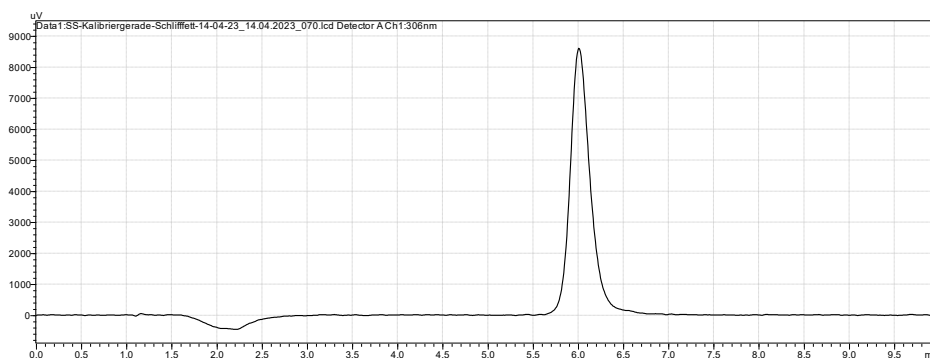


Abb. 2 Chromatogramm der entwickelten Salicylsäure HPLC-Analytik mit separiertem Wirkstoffpeak bei einer Retentionszeit von 5,9 min. Entwickelt auf einer EC 125/4 NUCLEOSIL 100-5 C18 Säule und einem Shimadzu LC-20 System mit UV/Vis - Detektor.

Die Ofentemperatur und der pH-Werten des Fließmittels wurden wie oben beschrieben entsprechend angepasst, um auch bei veränderten Umgebungsbedingungen möglichst robuste Ergebnisse zu erhalten.

Nach Kalibrierung mit verschiedenen Verdünnungsreihen und einem Injektionsvolumen von 20 - 30 µl wurde die Nachweisgrenze nach Gottwald auf 0,016 µg/ml und die Bestimmungsgrenze auf 0,058 µg/ml bestimmt.

Für Diclofenac ergaben sich bei der Methodenentwicklung folgende Parameter:

- Fließmittelzusammensetzung: 50 % ACN, 50 % H₂O (pH 2,65 - 0,1 % Ameisensäure)
- Flussrate: 1,1 mL/min
- Ofentemperatur: 37 °C
- Wellenlänge: 276 nm
- Dauer: 10 min
- Retentionszeit: ca. 6,2 min

In Abb. 3 wird das erhaltene Chromatogramm dargestellt:

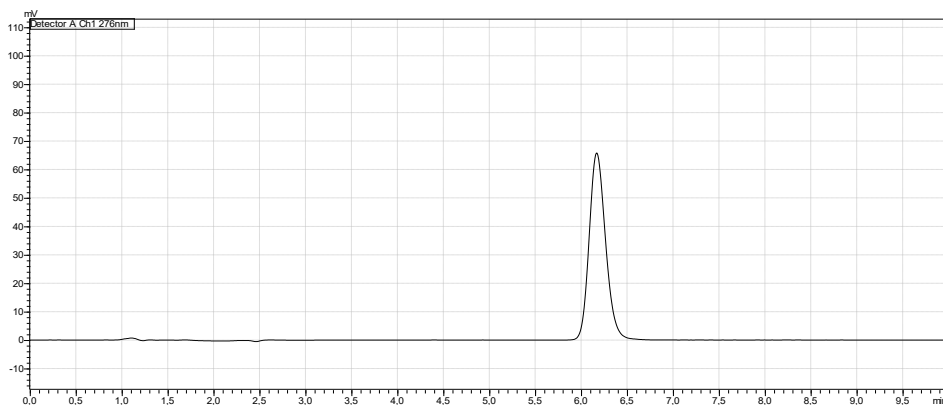


Abb. 3 Chromatogramm der entwickelten Diclofenac HPLC-Analytik mit separiertem Wirkstoffpeak bei einer Retentionszeit von 6,2 min. Entwickelt auf einer EC 125/4 NUCLEOSIL 100-5 C18 Säule und einem Shimadzu LC-20 System mit UV/Vis - Detektor.

Nach Kalibrierung mit verschiedenen Verdünnungsreihen und einem Injektionsvolumen von 20 - 30 µl wurde die Nachweisgrenze nach Gottwald auf 0,017 µg/ml und die Bestimmungsgrenze auf 0,059 µg/ml bestimmt. Bei der Kalibrierung wurde auf den Umrechnungsfaktor zwischen den Salzformen Diclofenac-Diethylamin (Wirkstoff in den Fertigarzneimitteln) und Diclofenac-Natrium geachtet.

Zwischenfazit Arbeitspaket:

Nach Abschluss des Arbeitspakets standen zwei etablierte HPLC-Methoden für die Wirkstoffe Salicylsäure und Diclofenac zur Verfügung. Diese ermöglichten im weiteren Projektverlauf die Quantifizierung der Wirkstoffe mittels HPLC-UV/Vis-Detektion, insbesondere bei der Analyse extrahierter Klebebandabrisse aus der TS-Methode. Nach entsprechender Kalibrierung konnten die Methoden zur Bewertung des Penetrationsvermögens der Wirkstoffe in das SC eingesetzt werden, wobei die TS-Methode als Referenzmethode zur neuartigen CRS-Methode dienen sollte. Das Ziel des Arbeitspakets wurde damit erreicht.

5.2 Arbeitspaket 2: Reverse-Engineering bzw. die Nachbildung einer Salicylsäure-haltigen Referenzformulierung

Ziel:

In diesem Arbeitspaket sollte eine geeignete Modellformulierung auf Basis einer kosmetischen Salicylsäure-Creme entwickelt werden. Hintergrund war, dass für kosmetische Produkte - im Gegensatz zu Arzneimitteln - kein Generikamarkt existiert und somit keine klar definierte Testformulierung anstelle der Referenz zur Verfügung stand.

Für die Durchführung der dermalen in-vivo Bioäquivalenzstudie wurde mit einem kosmetischen Referenzprodukt geplant, da Studien mit kosmetischen Produkten im Vergleich zu Arzneimittelstudien mit deutlich geringerem regulatorischem Aufwand sowie einem geringeren finanziellen und ethischen Aufwand verbunden sind. Um nun dennoch vergleichende Bioäquivalenzuntersuchungen durchführen zu können, war es erforderlich, eine möglichst äquivalente Testformulierung durch gezielte Re-Formulierung der Referenz herzustellen.

Hierzu wurden die physikochemischen Eigenschaften (u. a. Rheologie, Tröpfchengröße, Ölgehalt, Partikelgröße, pH-Wert und mikroskopische Struktur) systematisch angepasst, um eine der Ausgangsformulierung vergleichbare Zubereitung zu erhalten. Zusätzlich sollte durch gezielte Modifikationen, eine bewusst nicht bioäquivalente Variante erzeugt werden, um die diskriminatorische Aussagekraft der eingesetzten CRS-Analytik zu überprüfen.

Für die ex-vivo Untersuchungen mit Diclofenac sollten geeignete marktverfügbare Fertigarzneimittel als Vergleichsprodukte in die Studien einbezogen werden: Eine genauere Charakterisierung oder Re-Formulierung war hier nicht nötig.

Details:

5.2.1 Charakterisierung der Referenzformulierung

Als kosmetische Salicylsäure-Formulierung wurde die Creme V55 MAX Double Strength Salicylic Acid Skin Cleansing Cream von V55 Max (London, UK) ausgewählt (siehe Abb. 4):

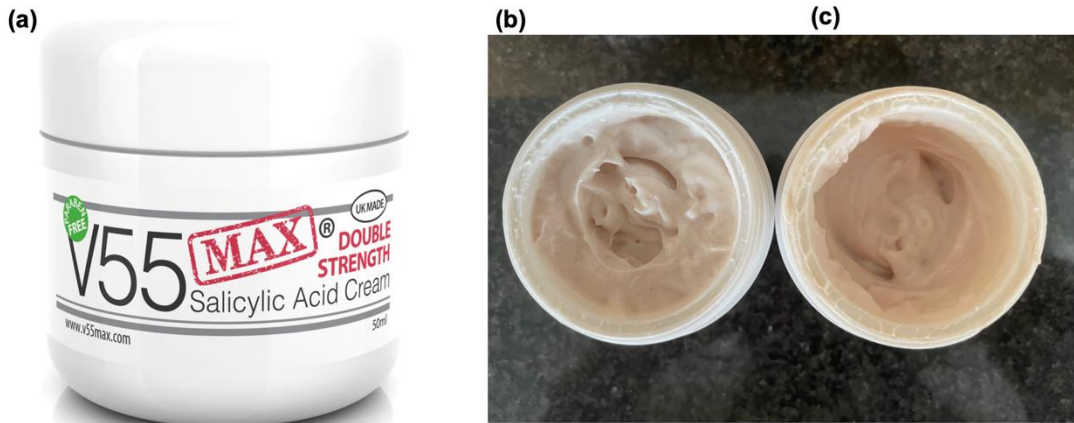


Abb. 4 In dieser Studie verwendetes Referenzprodukt. **(a)** V55 MAX Double Strength Salicylic Acid Skin Cleansing Cream, **(b)** Aussehen der Referenzcreme aus einer neu geöffneten Charge, **(c)** Aussehen der Referenzcreme aus einer bereits länger geöffneten Charge.

Die laut Hersteller angegebene Zusammensetzung umfasst: Wasser, Cetylstearylalkohol, Glycerolmonostearat, PEG-100-Stearat, Glycerin, Schwefelpulver, flüssiges Paraffin, Salicylsäure, Phenoxyethanol, Melaleuca alternifolia (Teebaumöl), Xanthangummi, Imidazolidinylharnstoff, Ethylhexylglycerin und Limonen. Die Formulierung ähnelt in ihrer Grundstruktur pharmazeutischen O/W-Cremegrundlagen wie z. B. Basiscreme oder nichtionischer hydrophiler Creme und eignet sich daher als Modellformulierung.

Der mittels HPLC bestimmte Wirkstoffgehalt lag dabei bei etwa 2,00 % Salicylsäure.

Um die Referenzcreme möglichst exakt re-formulieren zu können, wurden zunächst ihre physikochemischen Eigenschaften charakterisiert. Hierzu wurde die Mikrostruktur der Creme mittels Polarisationsmikroskopie untersucht, siehe Abb. 5:

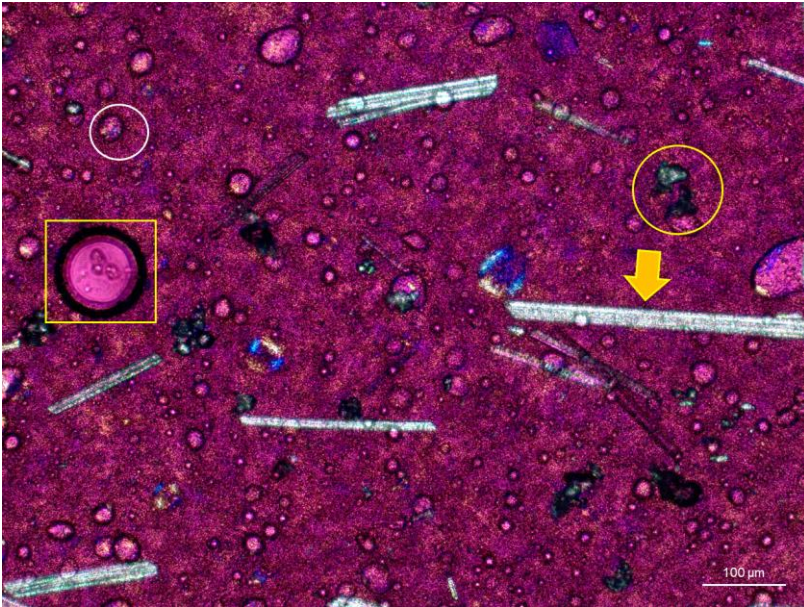


Abb. 5 Polarisationsmikroskopisches Bild der Referenzcreme aufgenommen mit einem 10-fach-Objektiv und einem Zeiss Imager Z1 mit einer Axiocam 105-Farbkamera. Charakteristische Strukturen sind fortlaufend gekennzeichnet: Gelbe Pfeile zeigen Salicylsäure (API)-Nadeln an, Gelbe Quadrate zeigen Luftblasen an, Gelbe Kreise zeigen Schwefelpulver an, Weiße Kreise zeigen Öltröpfchen an.

Dabei konnten charakteristische Strukturen identifiziert werden, darunter nadelförmige Kristalle der Salicylsäure mit einer Größe von ca. $\pm 150 \mu\text{m}$, ebenfalls suspendierte Schwefelpulver-Partikel sowie dispergierte Öltröpfchen der inneren Phase.

Nachdem nun die Mikrostruktur aufgeklärt war, wurde die Phasenlage durch die Anfärbemethode mit lipophilen Sudanrot und hydrophilem Methylenblau überprüft:



Abb. 6 Überprüfung der Phasenlage der Referenz. Mit lipophilem Sudanrot gefärbte Referenzcreme (links); mit hydrophilem Methylenblau gefärbte Creme (rechts).

Da die äußere Phase mit hydrophilem Methylenblau gleichmäßig angefärbt wurde und die dispergierten Öltröpfchen der inneren Phase mit lipophilem Sudanrot angefärbt werden konnten (siehe Abb. 6), wurde die Formulierung als Öl-in-Wasser-Creme charakterisiert.

Anschließend wurden weitere quantitative Analysen durchgeführt. Neben der Bestimmung des pH-Wertes wurde der Ölgehalt mittels eines Stresstestprotokolls ermittelt. Dabei wurden wiederholte Temperaturzyklen durchgeführt, bestehend aus einer Erwärmungsphase bei 80°C , gefolgt von einer Abkühlphase auf Raumtemperatur und einer weiteren Abkühlphase auf 4°C . Nach einer ausreichenden Anzahl Zyklen konnte der Ölgehalt bestimmt werden, der überwiegend aus flüssigem Paraffin bestand. Die

Tröpfchengröße variierte zwischen den untersuchten Tiegeln, konnte jedoch mikroskopisch im Mittel auf unter 5 μm eingegrenzt werden.

Da das rheologische Verhalten einer halbfesten Formulierung nicht nur für das Auftragsgefühl und die gleichmäßige Verteilung auf der Haut entscheidend ist, sondern auch einen Einfluss auf das Penetrationsvermögen des Wirkstoffs ausüben kann [42-44], wurde das rheologische Verhalten als physikochemische Eigenschaft der Referenzcreme zusätzlich untersucht. Hierzu wurden Rotationsmessungen an einem Platte-Platte-Aufbau durchgeführt, siehe Abb. 7:

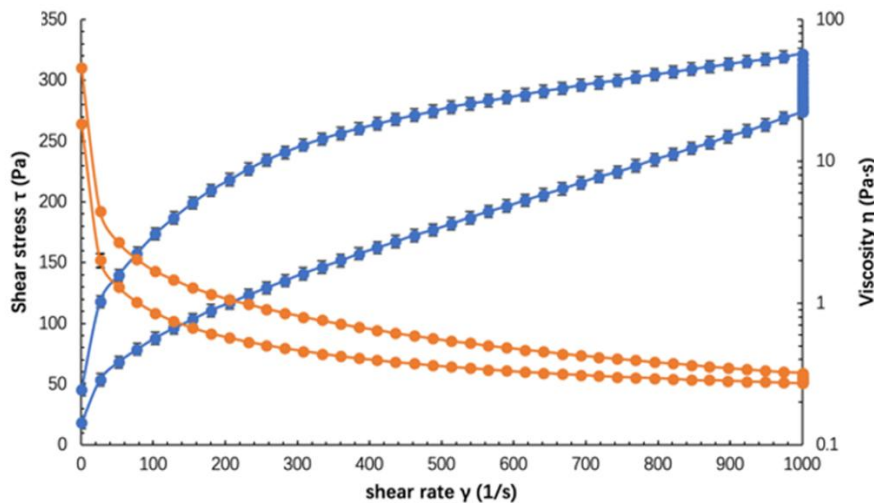


Abb. 7 Rheologische Charakterisierung der Referenzcreme für die Scherspannung (τ) sowie die dynamische Viskosität (η) im Verhältnis zur Schergeschwindigkeit (γ) durch Rotationsuntersuchung.

Aus den Messungen (vgl. Abb. 7) ging hervor, dass die Referenzcreme ein scherverdünnendes Verhalten mit einer Fließgrenze sowie einer moderaten Hysteresefläche zeigte. Sie ist somit dem Casson-Typ zuzuordnen.

Da neben der Viskosität insbesondere die thermodynamische Aktivität des Wirkstoffes in der Formulierung entscheidend für das Penetrationsvermögen ist [42], war auch die Charakterisierung der Salicylsäure-Nadelgröße von zentraler Bedeutung. Ziel war es, eine Testformulierung zu entwickeln, die a) mikroskopisch der Referenzcreme entspricht und b) im Idealfall ein gleiches, möglichst äquivalentes Penetrationsvermögen der Salicylsäure in das SC aufweist. Hierfür wurde die Nadelgröße von sieben verschiedenen Referenzcremes mikroskopisch untersucht und anschließend mithilfe der Software ImageJ quantitativ ausgewertet. Der Medianwert für die Nadelgröße, abgeleitet aus allen analysierten Referenzprodukten, wurde auf $\pm 150 \mu\text{m}$ bestimmt.

Diese oben beschriebenen charakterisierten Parameter dienten als Ausgangspunkt für die Re-Formulierung, um eine Testformulierung zu entwickeln, die der Referenzcreme in ihren physikochemischen Eigenschaften möglichst nahekommt und im späteren Projektverlauf idealerweise auch bioäquivalente Ergebnisse liefert.

5.2.2 Etablierung einer Herstellmethode

Vor Herstellung der Testproben der Nachbildung musste zunächst eine Herstellmethode etabliert werden, die zu stabilen Cremes mit akzeptablen physikochemischen Eigenschaften führt:

Die Herstellung der O/W-Creme erfolgte phasenweise (siehe Abb. 8). Zunächst wurde Phase A vorbereitet, indem die Salicylsäure in Glycerin gelöst und in einem Melaminschälchen erhitzt wurde, um eine gute Löslichkeit der Salicylsäure zu gewährleisten und die Re-Kristallisation zu stabilen Nadeln zu unterstützen. In Vorversuchen wurde die zu verwendete Temperatur im Wasserbad evaluiert, die im Nachgang der Herstellung zu einem raschen Nadelwachstum führt, um die gewünschte Nadelgröße von $\pm 150 \mu\text{m}$ schnellstmöglich zu erreichen. Parallel dazu wurde Phase B hergestellt, indem die drei Emulgatoren in flüssigem Paraffin auf dem Wasserbad geschmolzen und gelegentlich gerührt wurden, bis eine vollständig homogene Flüssigkeit entstand.

Für die Wasserphase wurde zusätzlich die benötigte Menge Wasser auf dem Wasserbad erwärmt, sodass sie dieselbe Temperatur wie Phase A und B erreichte. Xanthangummi wurde in warmem Wasser als Hydrogel (Phase C) dispergiert und hydratisiert, wobei kontinuierlich gerührt wurde, um Klumpenbildung zu vermeiden.

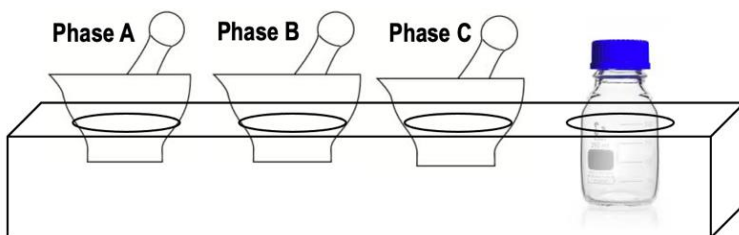


Abb. 8 Schematische Darstellung des Erhitzungsprozesses bei der entwickelten Herstellmethode der Testformulierungen mit verschiedenen Phasen im selben Wasserbad.

Zur Mischung wurden die Komponenten nacheinander in ein Gefäß überführt: zunächst die Hälfte des warmen Wassers, dann Phase A, Phase B, das XG-Hydrogel, Schwefelpulver sowie das restliche warme Wasser. Die Mischung wurde anschließend homogenisiert. Während des gesamten Rührvorgangs wurde die Mischung in einem Kaltwasserbad gekühlt, um eine stabile, gleichmäßige Creme mit der gewünschten Konsistenz zu erhalten.

5.2.3 Reverse-Engineering der Testformulierung für spätere Bioäquivalenzuntersuchungen

Bei der Re-Formulierung wurde bewusst auf Teebaumöl (*Melaleuca alternifolia*), Imidazolidinylharnstoff, Ethylhexylglycerin und Limonen verzichtet, da diese entweder keinen relevanten Beitrag zur Penetration der Salicylsäure leisten und/oder in pharmazeutischen Dermatika üblicherweise nicht eingesetzt werden. Die übrigen Bestandteile wurden zunächst in üblichen Konzentrationen übernommen. Anschließend wurde die Formulierung schrittweise optimiert, sodass ihre Eigenschaften (Rheologie, Tröpfchengröße, Ölgehalt, Partikelgröße der Salicylsäure, pH-Wert und mikroskopische Struktur) möglichst denen des Kosmetikums entsprechen.

Eine statistische Versuchsplanung wurde durchgeführt, um die Einflüsse mehrerer Formulierungsparameter auf die rheologischen Eigenschaften der Salicylsäure-Creme systematisch zu untersuchen. Sie ermöglicht es, die wichtigsten Einflüsse effizient zu erfassen und die Anzahl der Versuche gezielt zu reduzieren, wodurch sowohl Zeit als auch Material eingespart werden können, da nicht alle möglichen Kombinationen der Faktoren einzeln getestet werden müssen. Die rheologischen Eigenschaften wurden dabei als Zielgrößen ausgewählt, da sie einen quantitativen Ansatz zur Beurteilung der Formulierung liefern und zudem einen Einfluss auf das Penetrationsvermögen des Wirkstoffs haben können [42].

Für die Re-Formulierung der Salicylsäure-Creme wurde ein Vollfaktorplan mit drei Faktoren und drei Stufen durchgeführt. Die Auswahl der Faktoren basierte auf Vorversuchen, in denen die Wirkung verschiedener Parameter auf die rheologischen Eigenschaften untersucht wurde. Dabei zeigte sich, dass der Ölphasenanteil einen deutlichen Einfluss auf die scheinbare Viskosität und die Schubspannung ausübt; dieser wurde daher als Faktor aufgenommen. Die Konzentration des Xanthangummis (XG) wurde ebenfalls berücksichtigt, da sie die Fließeigenschaften und Stabilität der Creme beeinflusst. Als dritter Faktor wurde der Gesamtgehalt an Emulgator aufgenommen, der für die Stabilisierung der Öl-in-Wasser-Emulsion entscheidend ist.

Die Stufen der Faktoren entsprechen jeweils den niedrigen (Modus: 1), mittleren (Zentralpunkt, Modus: 2) und hohen (Modus: 3) Werten aus den Vorversuchen. Vorversuche zeigten außerdem, dass die Rührgeschwindigkeit des Homogenisators zwar leichte Abweichungen in den rheologischen Eigenschaften erzeugt, diese jedoch deutlich geringer waren als die Effekte des Ölgehalts; daher wurde sie nicht als Faktor in die statistische Versuchsplanung aufgenommen.

Als Zielgrößen (Responses) wurden die Hysteresefläche sowie die maximale Schubspannung gewählt, die zuvor in den Vorversuchen rheologisch bestimmt wurden. Die oberen und unteren Grenzwerte dieser Zielgrößen wurden auf $\pm 10\%$ des Mittelwerts der sechs Referenzcremes festgelegt, sodass die durch die statistische Versuchsplanung berechnete ideale Formulierung innerhalb dieses Bereichs liegt. Auf diese Weise konnten die wichtigsten Einflussgrößen gezielt untersucht und eine Formulierung entwickelt werden, die den rheologischen Eigenschaften der Referenzcreme möglichst nahekommt.

Auf Grundlage der oben beschriebenen Annahmen wurde mithilfe der verwendeten JMP 16-Software ein statistischer Versuchsplan erstellt, der insgesamt 30 herzustellende und zu untersuchende Proben umfasste. Um einer möglichen Variabilität durch Herstellung und andere Einflussfaktoren entgegenzuwirken, wurden hierbei zusätzlich drei Proben mit der Kombination aller Zentralwerte der Faktoren inkludiert.

Nachdem alle 30 Proben hergestellt und für denselben Zeitraum (mindestens jedoch 7 Tage) gelagert wurden, um eine gleichmäßig stabile Ausbildung der inneren Struktur zu gewährleisten, wurden sie rheologisch untersucht. Die Messungen erfolgten wie in den Vorversuchen mithilfe eines Platte-Platte-Aufbaus und Rotationsversuchen.

Basierend auf den Ergebnissen der vorgeschlagenen Proben der statistischen Versuchsplanung wurde die Zielzusammensetzung der Nachbildung (Emulgator-Anteil, XG-Gummi-Anteil sowie Ölphasen-Anteil) mittels JMP 16 Software berechnet: Aus der Analyse der statistischen Versuchsplanung ergab sich nicht nur die vorhergesagte Zusammensetzung der Nachbildungsformulierung sondern es ließen sich auch Zusammenhänge zwischen den untersuchten Faktoren und den rheologischen Eigenschaften ableiten. Dabei zeigte sich, dass eine steigende Konzentration der O/W-Emulgatoren, insbesondere von Cetylstearylalkohol (Lanette O) mit zusätzlicher Funktion als Gerüstbildner, den größten Einfluss auf eine Zunahme der Viskosität hatte. Demgegenüber führte eine erhöhte Konzentration von Xanthangummi v.a. zu einer deutlichen Verringerung der Hysterese fläche, da die innere Struktur nach Beanspruchung wieder schneller aufgebaut werden konnte.

Da für eine möglichst gute Stabilisierung der dispergierten Phase ein 1:1-Verhältnis der beiden O/W-Emulgatoren Glycerolmonostearat und PEG-100-Stearat empfohlen wird [45], wurde in Vorversuchen vor der statistischen Versuchsplanung das Verhältnis der drei in der Referenz eingesetzten Emulgatoren Glycerolmonostearat : PEG-100-Stearat : Cetylstearylalkohol auf 1 : 1 : 3,5 festgelegt. Hieraus ergab sich die finale Zusammensetzung der Nachbildungsformulierung.

Nachdem die finale Zusammensetzung der Nachbildungsformulierung festgelegt war, wurde diese gemäß der zuvor beschriebenen Herstellmethode als Triplikat (F1 - F3) hergestellt. Anschließend wurde die Nachbildung wie zuvor die Referenzcreme charakterisiert und hinsichtlich ihrer physikochemischen Eigenschaften mit dieser verglichen, um die pharmazeutische Äquivalenz zu überprüfen. Zunächst wurde das rheologische Verhalten einer der drei Formulierungen untersucht und zusätzlich bestimmt, wie lange es dauert, bis sich die innere Struktur vollständig aufgebaut hat und die Viskosität stabil bleibt: In den rheologischen Untersuchungen wurde deutlich, dass die Viskosität drei Tage nach Herstellung noch etwas niedriger als die der Referenzcreme war. Nach sieben Tagen zeigte die Nachbildung jedoch eine sehr ähnliche Viskosität sowie eine vergleichbare Hysterese fläche, die sich anschließend nicht mehr veränderte und stabil blieb. Somit wurde das Ziel eines vergleichbaren rheologischen Verhaltens erreicht. Hierfür mussten die nachgebildeten Testformulierungen zunächst für mindestens drei Tage gelagert werden. Dies konnte durch eine weitere Analyse aller drei als Triplikat hergestellten Cremes nochmals bestätigt werden.

Alle drei hergestellten finalen Nachbildungen (F1 – F3) wiesen unter Berücksichtigung kleiner Abweichungen also eine sehr ähnliche rheologische Charakteristik wie die der Referenzcreme auf, was das erfolgreiche Reverse-Engineering mithilfe der statistischen Versuchsplanung erneut bestätigte. Die Nachbildung lag innerhalb des von der EMA-Leitlinie empfohlenen $\pm 10\%$ -Bereichs bezüglich der pharmazeutischen Äquivalenz in Bezug auf die physikochemischen Eigenschaften [2].

Nachdem die rheologische Äquivalenz nachgewiesen werden konnte, wurde anschließend auch die innere Struktur der hergestellten Nachbildung mittels Polarisationsmikroskopie untersucht und mit der Struktur des Referenzproduktes verglichen: Auch hier zeigte sich, dass die innere Struktur der hergestellten Nachbildungen eine hohe Ähnlichkeit mit der Referenzcreme aufwies. Die Öltröpfchen lagen ebenfalls in

Größenbereichen von deutlich unter 5 μm , und auch die Verteilung der dispergierten Partikel entsprach weitgehend der Referenzcreme. Auch der mittels HPLC bestimmte Gehalt an Salicylsäure lag mit 2 % im erwarteten Bereich.

Abschließend wurde die Größe der Salicylsäure-Nadeln in den hergestellten Nachbildungen analysiert. Aus theoretischer Sicht sollte die Nadelgröße keinen signifikanten Einfluss auf die thermodynamische Aktivität haben, da die Salicylsäure in jedem Fall innerhalb der Creme in einem Bereich oberhalb ihrer Sättigungslöslichkeit dispergiert vorliegt. Dabei gilt die thermodynamische Aktivität als maßgeblicher Faktor für das Penetrationsvermögen in das SC [42, 46]. Dennoch ist im Hinblick auf die pharmazeutische Äquivalenz ein möglichst vergleichbares mikroskopisches Erscheinungsbild der Formulierung anzustreben, weshalb dieser Aspekt ebenfalls für die Testformulierung untersucht wurde: Unmittelbar nach der Herstellung der Nachbildung lag die Nadelgröße noch deutlich unter der angestrebten Zielgröße der Referenz von ca. $\pm 150 \mu\text{m}$, was auf eine unvollständige Re-Kristallisierung sowie eine noch nicht ausreichend fortgeschrittene Ostwald-Reifung zurückzuführen war. Dementsprechend wurde die hergestellte Nachbildung über mehrere Wochen bei Raumtemperatur gelagert und das Wachstum der Nadelgröße beobachtet. Nach einer Lagerzeit von 3 Monaten erreichten die Nadeln eine mit der Referenzcreme vergleichbare Größe, wodurch die pharmazeutische Äquivalenz weiter komplementiert werden konnte.

Zwischenfazit Arbeitspaket:

Nach Abschluss des Arbeitspakets war die Referenzformulierung mit dem Wirkstoff Salicylsäure umfassend charakterisiert. Im Rahmen eines Reverse-Engineering-Ansatzes unter Anwendung einer statistischen Versuchsplanung wurde eine Testformulierung entwickelt und schrittweise optimiert, sodass ihre physikochemischen Eigenschaften weitgehend denen der Referenz entsprachen. Neben der rheologischen Stabilität wurde insbesondere das Wachstum der suspendierten Salicylsäure-Nadeln untersucht. Durch Lagerung bei Raumtemperatur konnte die angestrebte Zielgröße entsprechend der Referenz erreicht werden.

Damit wurde das Arbeitspaket erfolgreich abgeschlossen und die Voraussetzung geschaffen, die geplanten dermalen Bioäquivalenzstudien mit einem geeigneten und vergleichbaren Testprodukt durchzuführen.

Für die ex-vivo Diclofenac-Studien wurde das Voltaren Schmerzgel forte (23,2 mg Diclofenac-Diethylamin pro g) als Referenzpräparat ausgewählt, während für das zugelassene Generikum Diclox Forte (20 mg Diclofenac-Natrium pro g) als Testprodukt festgelegt wurde.

5.3 Arbeitspaket 3: Evaluierung relevanter Einflussfaktoren auf die Penetration von Salicylsäure & Entwicklung der Studien-Kontrollformulierungen

Ziel:

Ziel dieses Arbeitspaketes war es, ein besseres Verständnis verschiedener Einflussfaktoren auf die Penetration von Salicylsäure zu erlangen und damit das Penetrationsvermögen der eingesetzten Prüfprodukte für die späteren Bioäquivalenzstudien besser einschätzen zu können. Auf dieser Grundlage sollte anschließend durch gezielte Anpassung der Referenzformulierung eine Kontrollformulierung entwickelt werden, die sich statistisch signifikant von der Referenz unterscheidet, um die diskriminatorische Aussagekraft der beiden Penetrationsuntersuchungsmethoden (TS und CRS) belegen zu können.

Details:

Um Einflussfaktoren auf die Penetration von Salicylsäure untersuchen zu können, wurden Penetrationsuntersuchungen durchgeführt. Diese wurden zunächst als Vorversuche ex-vivo mit Schweinehaut unter Anwendung der TS-Methode durchgeführt. Hierzu wurde die Referenzcreme schrittweise hinsichtlich verschiedener Formulierungsparameter angepasst und anschließend das Penetrationsverhalten in das SC untersucht. Die Bewertung erfolgte anhand der kumulierten Wirkstoffmengen, die in das SC penetrierten, und wurde mit den entsprechenden Werten der Referenzformulierung verglichen.

Für die Entwicklung einer geeigneten Kontrollformulierung fordert die EMA, dass das 90 %-KI des Produkt-zu-Produkt-Verhältnisses vollständig außerhalb des Akzeptanzintervalls für Bioäquivalenz von 80,00 bis 125,00 % liegen soll [2]. Im späteren Rahmen des Projektes wurde entschieden, die Kontrollformulierung so zu entwickeln, dass sich deren 90 %-KI vollständig unterhalb der unteren Grenze von 80,00 % befinden soll.

Zunächst wurden verschiedene Formulierungsparameter der Referenzcreme gezielt verändert. Dazu gehörten der Zusatz von POE-23-Laurylether als Penetrationsbeschleuniger, die Anpassung des pH-Wertes von etwa 3 auf 10 sowie die Verdünnung der Formulierung mit einer amphiphilen Creme (Basiscreme DAC). Dabei sollte die untere Akzeptanzgrenze von 80,00 % gezielt unterschritten werden, um eine ausreichende Verschiedenheit zur Referenz darstellen zu können. Gleichzeitig sollte die untere Nachweisgrenze der SkinTools-Raman-Software (RiverD International B.V., Rotterdam, Niederlande) nicht unterschritten werden, um eine zuverlässige Bestimmbarkeit der Salicylsäure-Konzentration in der geplanten in-vivo Humanstudie mittels Raman-Spektroskopie sicherzustellen.

Aus den Penetrationsuntersuchungen ging hervor, dass der Zusatz von Penetrationsbeschleunigern keinen vergleichbar signifikanten Einfluss auf das Penetrationsvermögen ausübte wie der primäre Einflussfaktor, die thermodynamische Aktivität, was auch in den Arbeiten von Gaiser und Lunter [46] sowie Herbig et al. [42] bereits beschrieben wurde.

Auch die Modifikation des pH-Wertes erwies sich als ungeeignet: Zwar stellte der pH-Wert einen kritischen Parameter für die Veränderung des Penetrationsvermögens dar, jedoch konnte eine Anhebung nicht stabil und reproduzierbar realisiert werden und führte zusätzlich zu deutlich reduzierten Penetrationswerten. Ziel der pH-Anpassung war es, die thermodynamische Aktivität durch eine Erhöhung der Sättigungslöslichkeit zu maximieren, da dissoziierte Salicylsäure in der äußeren Phase der Creme deutlich besser wasserlöslich ist als

ungeladene Salicylsäure. Da jedoch nur die ungeladene Form von Salicylsäure die Haut penetrieren kann, während die geladene Form dies nicht tut, erklärte dies das beobachtete geringe Penetrationsvermögen der pH veränderten Creme.

Unter den getesteten Ansätzen erwies sich daher die Verdünnung der Referenzcreme mit der Basiscreme als die am besten geeignete Methode zur Reduktion des Penetrationsvermögens, da sie sowohl reproduzierbar als auch präzise einstellbar war.

Durch die Verdünnung der Referenzcreme mit der Basiscreme verringert sich erwartungsgemäß auch die Salicylsäure-Konzentration der Formulierung. Da sich die thermodynamische Aktivität jedoch, wie zuvor beschrieben, erst verändert, wenn sich die effektive gelöste Salicylsäure-Konzentration ändert, muss die Verdünnung ausreichend hoch sein, sodass die Sättigungslöslichkeit von Salicylsäure in der verdünnten Formulierung unterschritten wird. In diesem Fall liegt die Salicylsäure nicht mehr dispergiert, sondern vollständig gelöst vor. Nur gelöste, ungeladene Salicylsäure ist in der Lage, die Hautbarriere zu penetrieren. Folglich kann eine merkliche Reduktion des Penetrationsvermögens nur durch eine Verringerung der effektiv gelösten Salicylsäure-Konzentration erreicht werden. Hier hat die Entwicklung der Kontrollformulierung angesetzt.

Um das exakte Verdünnungsverhältnis zu ermitteln, ab dem die Sättigungslöslichkeit von Salicylsäure in der Referenzformulierung unterschritten wird, wurde eine schrittweise Verdünnungsreihe hergestellt. Nach Homogenisation und einer Wartezeit von mindestens einem Tag wurden die Proben mikroskopisch untersucht, um die Verdünnung zu bestimmen, ab der keine dispergierten Salicylsäure-Nadeln mehr sichtbar sind und somit die Sättigungslöslichkeit unterschritten wurde.

Es war erkennbar, dass mit zunehmender Verdünnung die Anzahl der dispergierten Salicylsäure-Nadeln zugunsten weniger, dafür größeren Nadeln abnahm. Mit dem Unterschreiten der Sättigungslöslichkeit in der Referenzformulierung löste sich schließlich auch die letzte verbliebene größte Nadel vollständig auf.

Um die pharmazeutische Äquivalenz der re-formulierten Nachbildung der Referenzcreme zu bestätigen, wurde zusätzlich wie oben beschrieben eine mikroskopische Untersuchung der Salicylsäure-Sättigungslöslichkeit mittels Verdünnungsreihe durchgeführt. Vergleicht man die erhaltenen 90 %-KI Ergebnisse der Sättigungslöslichkeiten der verdünnten Referenzcreme und der verdünnten Nachbildung, zeigte sich, dass der Unterschied, analog zum rheologischen Verhalten, kleiner war als die in der EMA-Leitlinie empfohlenen 10 % [2]. Dies sprach erneut für das erfolgreiche Reverse-Engineering der Referenzformulierung.

Die Kontrollformulierung ermöglichte ein signifikant niedrigeres Penetrationsniveau im Vergleich zur Referenzcreme, ohne gleichzeitig die zuverlässige Bestimmbarkeit der Salicylsäure zu gefährden. Da die effektive Konzentration unterhalb der ermittelten Sättigungslöslichkeit lag, lässt sich das reduzierte Penetrationsvermögen durch die entsprechend herabgesetzte thermodynamische Aktivität auch quantitativ erklären.

Zwischenfazit Arbeitspaket:

Mit dem erfolgreichen Abschluss dieses Arbeitspaketes konnte ein vertieftes Verständnis für das Penetrationsverhalten der Salicylsäure in den untersuchten Formulierungen gewonnen werden, was für die Planung der nachfolgenden Bioäquivalenzstudien von zentraler Bedeutung war. Darüber hinaus standen nun mit der Referenzcreme, der erfolgreich nachgebildeten Testformulierung sowie der definierten Kontrollformulierung alle Prüfprodukte für die Bioäquivalenzstudien des Wirkstoffs Salicylsäure zur Verfügung.

Die für Diclofenac entwickelte Kontrollformulierung besteht dahingehend ebenfalls aus einer Verdünnung: Die Referenzcreme wurde mit Carbomer-Gel nach NRF 13.2. [47] verdünnt, wobei Carbomer bereits als Bestandteil des Voltaren forte Referenz-Gels enthalten ist.

5.4 Arbeitspaket 4: Penetrationsuntersuchungen zur Festlegung geeigneter Studienzeitpunkte für Salicylsäure und Diclofenac

Ziel:

Ziel dieses Arbeitspakets war es zum einen, die zuvor etablierte TS-Methode einschließlich der zugehörigen HPLC-Analytik für beide Wirkstoffe weiter zu validieren. Zum anderen sollten geeignete Studienzeitpunkte für die nachfolgenden pivotalen Penetrationsstudien im Rahmen der dermalen Bioäquivalenzuntersuchungen festgelegt werden.

Diese Studien sollten dann anschließend sowohl mit der TS-Methode als Referenzmethode als auch mit der neuartigen CRS-Methode durchgeführt werden, um deren Eignung für entsprechende Bioäquivalenzuntersuchungen nachzuweisen.

Die hierfür erforderlichen TS-Penetrationsuntersuchungen mit den beiden Wirkstoffen Salicylsäure und Diclofenac wurden in zwei separaten Projektabschnitten durchgeführt.

Die aktualisierte Leitlinie der EMA zu dermalen Bioäquivalenzuntersuchungen [2] fordert für die Anwendung der mittlerweile akzeptierten TS-Methode die Bestimmung der penetrierten Wirkstoffmenge zu zwei definierten Zeitpunkten für alle Prüfprodukte. Ein Zeitpunkt soll dabei innerhalb der Anströmphase des Wirkstoffs liegen (= Uptake-Zeitpunkt) und sich idealerweise in einem quasi-stationären Zustand (steady state) befinden. In diesem Gleichgewichtszustand stehen Wirkstoffaufnahme in das SC und Wirkstoffabgabe durch Diffusion in tiefere Hautschichten in einem dynamischen Gleichgewicht. Dadurch soll der Einfluss des zeitlichen Verlaufs als potenzieller Störfaktor reduziert und eine zuverlässige sowie reproduzierbare Bewertung der Penetrationskinetik ermöglicht werden.

Ein zweiter Zeitpunkt soll innerhalb der Auswaschphase (= Clearance-Zeitpunkt) liegen, um die zeitabhängige Abnahme der Wirkstoffkonzentration erfassen zu können. Hierzu wird nach Ablauf der Anströmphase (Uptake-Zeitpunkt) die verbliebene Formulierung von der Haut entfernt und die Haut anschließend für einen weiteren definierten Zeitraum inkubiert. Zur Charakterisierung dieser Auswaschphase empfiehlt die EMA eine pharmakokinetische Abnahme der Wirkstoffkonzentration von mindestens 25 % (Clearance) im Vergleich zum Uptake-Zeitpunkt.

Auf diese Weise soll mit den eingesetzten analytischen Methoden nachgewiesen werden können, dass die Wirkstoffkonzentration im Zeitverlauf tatsächlich abnimmt und somit die Elimination des Wirkstoffs aus dem SC zuverlässig abgebildet werden kann.

Details:

Die im Vorfeld der Bioäquivalenzstudien durchgeführten Penetrationsuntersuchungen zur finalen Festlegung der Studienzeitpunkte wurden für beide Wirkstoffe separat mittels TS-Methode ex-vivo an Schweinehaut durchgeführt (siehe Prozessschema: Abb. 10). Nach unterschiedlichen Inkubationszeiten wurde das SC schrittweise durch aufeinanderfolgende Klebebandabrisse bis zu einer angestrebten Tiefe von 10 µm entfernt. Anschließend wurde die kumulativ penetrierte Wirkstoffmenge aus den einzelnen extrahierten Tape-Strips mittels zuvor etablierter HPLC-Analytik (siehe „5.1 Arbeitspaket 1: Entwicklung einer HPLC-Analytik für Salicylsäure und Diclofenac“) quantifiziert. Zur Bestimmung der abgezogenen SC-Tiefe wurden

die Tapes vor und nach dem Tape-Stripping jeder SC-Schicht mittels einer Mikrowaage (AX26DR, d = 2 µg, Mettler Toledo, Columbus, Ohio, USA) gewogen. Die Quantifizierung von Salicylsäure und Diclofenac erfolgte entsprechend mittels HPLC.

Für beide Wirkstoffe wurde eine Applikationsmenge von 26,5 mg der Referenzformulierung gewählt. Bei einer Penetrationsfläche von 1,77 cm² innerhalb der Franz-Diffusionszelle entspricht dies einer aufgetragenen Menge von 15 mg Formulierung pro cm². Diese begrenzte Menge kann verlässlich appliziert und quantifiziert werden und entspricht der von der FDA empfohlenen topischen Auftragsmenge bei Penetrationsuntersuchungen [41] und liegt zugleich innerhalb des im Leitlinienentwurfs der EMA beschriebenen Bereichs von 2 - 15 mg/cm² [1]. Für jeden untersuchten Zeitpunkt wurden jeweils drei Hautproben als Stichprobenumfang verwendet.

5.4.1 Untersuchung für Salicylsäure-Studien

In Abb. 9 sind die Versuchsergebnisse für den Uptake-Zeitpunkt (links) sowie für den Clearance-Zeitpunkt (rechts) für die Salicylsäure-Referenzformulierung dargestellt. Für den Clearance-Zeitpunkt wurde die Haut zunächst über die zuvor für den Uptake-Zeitpunkt festgelegte Zeitperiode inkubiert, anschließend die verbleibende Formulierung von der Hautoberfläche entfernt und die Haut danach für einen weiteren definierten Zeitraum inkubiert:

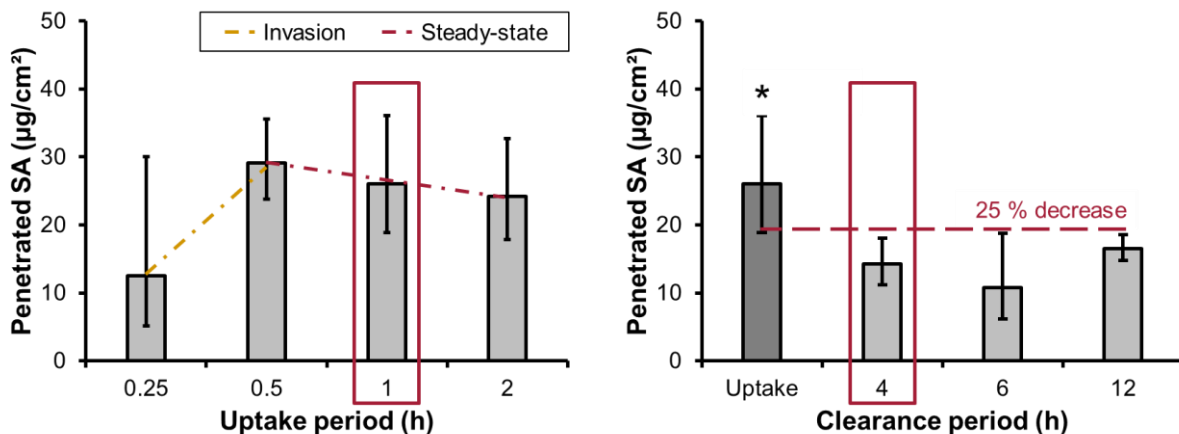


Abb. 9 Steady-State-Studie zur Bestimmung des Uptake-Zeitpunkts (links) und Clearance-Studie für den Clearance-Zeitpunkt (rechts). Mit TS wurden die nach Inkubation mit einer finalen Dosis (15 mg Produkt/cm²) einer 2 %igen Salicylsäure-haltigen Referenzcreme penetrierten Salicylsäure-Mengen bestimmt und auf eine SC-Tiefe von 9,71 µm normiert. (n = 3, geometrischer Mittelwert ± GSD, * p < 0,05). Adaptiert nach Link et al. [48].

Zunächst wurde der finale Uptake-Zeitpunkt festgelegt. Wie aus Abb. 9 (links) hervorgeht, erreicht die im SC nachgewiesene Wirkstoffmenge bereits nach einer Inkubationszeit von etwa 30 Minuten ein annähernd konstantes Niveau. Um mit ausreichender Sicherheitsmarge sicherzustellen, dass der Gleichgewichtszustand tatsächlich erreicht ist, wurde der Uptake-Zeitpunkt auf eine Applikationsdauer von 1 Stunde festgelegt.

Bei Betrachtung der Clearance von Salicylsäure aus dem SC zeigt sich in Abb. 9 (rechts), dass bereits nach 4 Stunden eine signifikante Abnahme der Wirkstoffmenge vorliegt. Die Reduktion übersteigt dabei die in der Leitlinie der EMA empfohlene Mindestabnahme von 25 % [2]. Um die Dauer der Versuchstage in der späteren Humanstudie für die Probanden möglichst gering zu halten, wurde der Clearance-Zeitpunkt daher auf 4 Stunden festgelegt.

5.4.2 Untersuchung für Diclofenac-Studien

Bei der Untersuchung der Studienzeitpunkte für die vergleichenden ex-vivo-Bioäquivalenzuntersuchungen mit der TS- und der CRS-Methode für den Modellwirkstoff Diclofenac wurde das zugelassene Dermatikum Voltaren Schmerzgel forte als Referenzformulierung verwendet. Dabei wurde analog zu den Penetrationsuntersuchungen mit der TS-Methode für Salicylsäure vorgegangen.

Aus den Untersuchungen ging hervor, dass für Diclofenac ebenfalls ein Uptake-Zeitpunkt von 1 Stunde sowie ein Clearance-Zeitpunkt von 4 Stunden nach Entfernung der Formulierung festgelegt werden konnte. Diese Zeitpunkte entsprechen denen der Salicylsäure-Untersuchungen, wodurch später ein direkter und konsistenter Vergleich der penetrierten Wirkstoffmengen sowohl zwischen den beiden Methoden (TS und CRS) als auch zwischen den beiden Wirkstoffen ermöglicht wird.

Zwischenfazit Arbeitspaket:

Nach Abschluss des Arbeitspakets wurden die Studienzeitpunkte erfolgreich festgelegt: Für den Uptake-Zeitpunkt wird eine Applikationsdauer von 1 Stunde und für den Clearance-Zeitpunkt eine Inkubationsdauer von 4 Stunden nach Entfernung der Formulierung verwendet. Damit standen nun die definierten Zeitpunkte für die nachfolgenden Penetrations- und Bioäquivalenzstudien zur Verfügung, wobei für Salicylsäure sowohl ex-vivo (Human- und Schweinehaut) als auch in-vivo Untersuchungen durchgeführt werden, während für Diclofenac ex-vivo-Untersuchungen an Schweinehaut durchgeführt werden. Hierbei sollte die CRS-Methode mit der TS-Methode zu beiden Zeitpunkten verglichen werden.

5.5 Arbeitspaket 5: Ex-vivo Penetrations- und Bioäquivalenzuntersuchungen mittels Tape-Stripping (TS) und konfokaler Raman-Mikrospektroskopie (CRS) (Diclofenac: Schweinehaut; Salicylsäure: Schweinehaut und Humanhaut)

Ziel:

Die ex-vivo-Bioäquivalenzuntersuchungen sollten dazu dienen, die Eignung der neuartigen CRS-Methode nachzuweisen, indem die zuvor festgelegten Prüfprodukte und Studienzeitpunkte gleichzeitig sowohl mit der offiziell akzeptierten TS-Methode als auch mit der CRS-Methode an denselben drei Hautproben untersucht werden. Der direkte Vergleich der Ergebnisse beider Methoden an denselben Proben ermöglichte dabei eine verlässliche Bewertung der CRS-Methode hinsichtlich ihrer Eignung für dermale Bioäquivalenzstudien.

Für Salicylsäure konnten sowohl ex-vivo-Untersuchungen an Human- und Schweinehaut als auch in-vivo-Studien durchgeführt werden, während für Diclofenac ausschließlich ex-vivo-Untersuchungen an Schweinehaut vorgesehen waren. Somit ermöglichte der ex-vivo-Methodenvergleich sowohl den Vergleich zweier Wirkstoffe als auch zweier Hautmodelle, wodurch die Aussagekraft und Relevanz der Ergebnisse deutlich erhöht wurden.

Die Auswahl von Salicylsäure erfolgte zudem vor dem Hintergrund, im Anschluss an die ex-vivo-Untersuchungen eine in-vivo-Humanstudie als entscheidenden Nachweis der Methodeneignung durchführen zu können. Aufgrund der hohen finanziellen und ethischen Anforderungen an klinische Arzneimittelstudien wurde hierfür ein Wirkstoff gewählt, der sowohl kosmetisch eingesetzt wird als auch in Arzneimitteln Verwendung findet. In der in-vivo-Studie wurden dann kosmetische Formulierungen verwendet. Um eine direkte Vergleichbarkeit zwischen ex-vivo- und in-vivo-Ergebnissen auf Humanhaut zu gewährleisten, wurden für Salicylsäure ex-vivo-Untersuchungen sowohl an Human- als auch an Schweinehaut durchgeführt.

Details:

Für die Salicylsäure-Studien standen, wie oben beschrieben, drei Prüfprodukte zur Verfügung: die V55 MAX Double Strength Salicylic Acid Skin Cleansing Cream als Referenz, die durch Reverse-Engineering nachgebildete Testformulierung sowie eine Kontrollformulierung, die durch Verdünnung hergestellt wurde. Da trotz ähnlicher physikochemischer Eigenschaften der Testformulierung im Vergleich zur Referenzformulierung zuvor nicht gesichert war, ob die Testformulierung in den Bioäquivalenzuntersuchungen tatsächlich bioäquivalent abschneiden würde, und um die Robustheit der CRS-Methode zu überprüfen, wurde entschieden, die Referenzformulierung aus demselben Tiegel zweimal zu testen. Somit wurden insgesamt vier Formulierungen appliziert: 2 × Referenz, 1 × Testformulierung und 1 × Kontrollformulierung. Für die abschließende Bioäquivalenzbewertung diente dabei eine der beiden Referenzformulierungen als Vergleichswert.

Bei der Diclofenac-Studie galt ein ähnliches Vorgehen: Obwohl pharmazeutische Generika-Hersteller seit Inkrafttreten der EMA-Leitlinie im April 2025 [2] Generika über den vereinfachten Nachweis der Bioäquivalenz zulassen können, existieren bislang noch keine auf diesem Weg zugelassenen Produkte auf dem Dermatika-Markt. Dies unterstreicht die Relevanz dieses Projektes. Bei der Zulassung des zum Referenzprodukts Voltaren Schmerzgel forte (GlaxoSmithKline Consumer Healthcare GmbH & Co. KG, München, Deutschland) generischen Produkts Diclox forte (ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland), mussten

daher aufwendige klinische Wirksamkeitsstudien durchgeführt werden. Die Zulassung beruhte auf einer ausreichend äquivalenten Wirksamkeit des Produkts. Eine Bioäquivalenz anhand quantitativ vergleichbarer Penetrationsdaten in den Wirkort wurde bislang nicht nachgewiesen. Um jedoch auch hier die Robustheit der CRS-Methode zu gewährleisten und mindestens einen Vergleich von zwei bioäquivalenten Formulierungen einzuschließen, wurde die Referenzformulierung ebenfalls zweimal ins Studiendesign eingeschlossen.

Abb. 10 veranschaulicht das Prozessschema des Methodenvergleichs zwischen der TS-Methode als Goldstandard und der neuartigen CRS-Methode. Ebenfalls dargestellt wird die Präparation der Schweinehaut, die zuvor entsprechend aufbereitet werden musste, während die Humanhaut für die Salicylsäure-Studie von Körperspendern des Universitätsklinikums Tübingen bereitgestellt wurde. Ein entsprechendes Ethikvotum für die berechtigte Nutzung der Humanhaut des Instituts für Klinische Anatomie und Zellanalytik liegt vor (Projektnummer: 467/2025BO2, Genehmigungsdatum: 21.08.2025). Die durchführende Forschungsgruppe ist zudem für die Verwendung von tierischen Produkten beim Tübinger Veterinäramt/Landratsamt registriert (Registrierungsnummer: DE 08416105221, Genehmigungsdatum: 22. Dezember 2015).

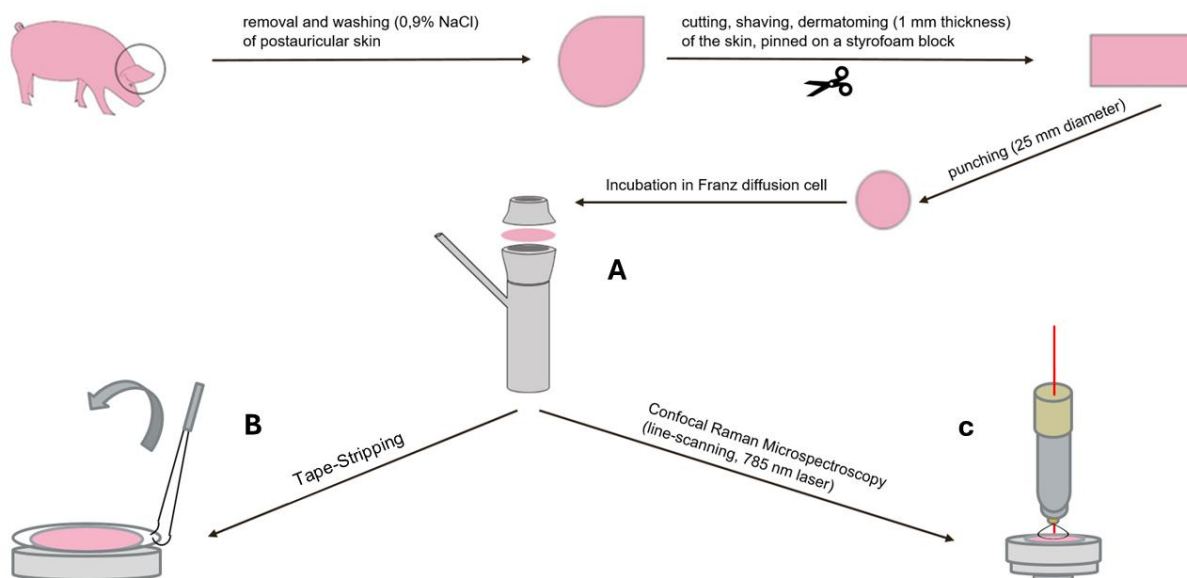


Abb. 10 Prozessschema für Methodenvergleich bei der Analyse der Wirkstoffpenetration in Schweinehaut: Präparation und Inkubation von Schweineohrhaut für ex-vivo Penetrationsexperimente in einer Franz-Diffusionszelle **(A)** nach Auftragung der Formulierung. Anschließender Methodenvergleich von konfokaler Raman Spektroskopie **(C)** mit der konventionellen Tape-Stripping-Methode (= Klebebandabrissmethode **(B)**).

Die ex-vivo Versuche wurden jeweils mit einem Stichprobenumfang von drei Hautproben derselben Hautcharge durchgeführt, um eine gute Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten und zusätzliche interindividuelle Variabilität zu vermeiden. Dies ist besonders relevant, da die interindividuelle Variabilität bei Hautexperimenten generell als hoch einzustufen ist [30]. Die Versuche wurden zunächst mittels CRS-Analytik an den Hautproben durchgeführt, bevor der Vergleich an exakt denselben Hautproben abschließend durch die zerstörerische TS-Methode vervollständigt wurde.

Die Charakteristika der verwendeten Prüfprodukte, die applizierte Auftragsmenge sowie die festgelegten Studienzeitpunkte wurden bereits oben beschrieben.

5.5.1 CRS-Methodenentwicklung zur vollen Quantifizierung der Wirkstoffe

Bevor die pivotalen Bioäquivalenzstudien durchgeführt werden konnten, musste zunächst die CRS-Methode für beide Wirkstoffe entwickelt und etabliert werden, sodass sie anschließend angewendet und mit den Ergebnissen der etablierten TS-Methode verglichen werden konnte.

Für die ex-vivo CRS-Untersuchungen wurde das alpha300 R Confocal Raman Microscope von WITec (Ulm, Deutschland) von der durchführenden Forschungsgruppe eingesetzt. Es wurde standardmäßig mit dem roten 785 nm-Laser gemessen.

Nachfolgend sind die Raman-Reinspektren für Salicylsäure (rot) und Diclofenac (blau) in Abb. 11 dargestellt:

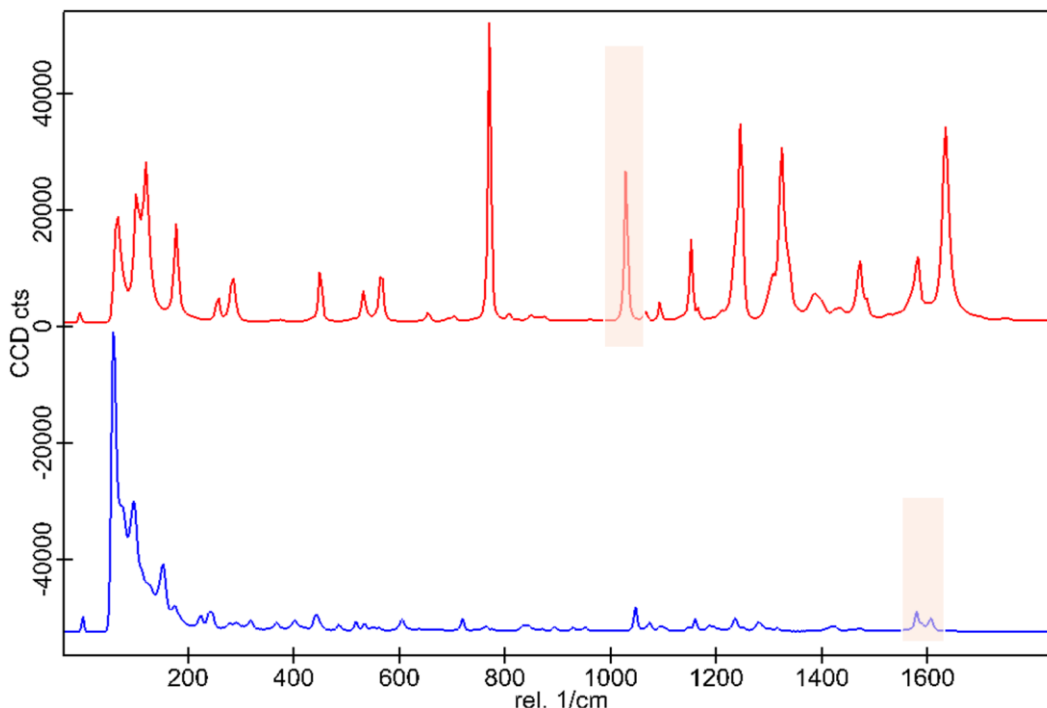


Abb. 11 Raman-Reinspektren von Salicylsäure (rot) und Diclofenac (blau) sowie die entsprechenden Wirkstoff-Signale, die der späteren Quantifizierung dienen (farbig hinterlegt).

Die Grundlage für die CRS-Detektion der Salicylsäure bildete der charakteristische Peak der CH-Deformationsschwingung der Salicylsäure bei einer Wellenzahl von 1030 cm^{-1} (vgl. Abb. 11). Dieser Peak

kann nach Inkubation mit den Prüfprodukten auch im SC detektiert und mithilfe des intrinsischen Hautsignals bei 1450 cm^{-1} normalisiert werden. Da das SC an dieser Wellenzahl ein geringes Eigen-Signal aufweist, wurden jeweils zwei Tiefenprofile aufgenommen: Eines vor der Inkubation mit den Prüfprodukten zur Bestimmung der Nullwerte und eines nach der Inkubation mit Salicylsäure-haltigen Formulierungen. Die Differenz zwischen beiden Profilen diente nach Kalibrierung zur quantitativen Bestimmung der Salicylsäure im SC.

Das SC wurde durch CRS-Tiefenscans mit einer vordefinierten Schrittweite von $1\text{ }\mu\text{m}$, einer Integrationszeit von 3 s sowie drei Akkumulationen gemessen.

Die anschließende Quantifizierung auf Basis der ermittelten Profildifferenzen erfolgte nach dem von Caspers et al. entwickelten Ansatz zur Bestimmung von Wirkstoffkonzentrationen in der Haut mittels CRS [49]. Dieser Ansatz stellt eine Weiterentwicklung der ursprünglich semiquantitativen Analyse dar und basiert auf der spektralen Anpassung des gemessenen Hautspektrums mit Referenzspektren intrinsischer Hautbestandteile sowie des untersuchten Wirkstoffs.

Da die absolute Intensität eines Raman-Signals nicht nur von der Konzentration des Analyten abhängt, sondern auch von dessen Streueigenschaften sowie von experimentellen Faktoren wie Messvolumen, Laserintensität oder Messgeometrie beeinflusst wird, kann sie in einem inhomogenen Medium wie der Haut nicht direkt in eine Konzentration überführt werden. Zusätzlich können strukturelle Eigenschaften der Haut, wie Oberflächenrauigkeit, unterschiedliche Hautschichten oder zelluläre Strukturen, die detektierte Signalintensität beeinflussen. Dies führt unter anderem zu einer zunehmenden Signalabschwächung mit steigender Hauttiefe. Um diesen Effekten zu begegnen, wird das Wirkstoff-Signal zunächst mit einem charakteristischen Hautsignal normalisiert. Hierzu diente das Signal von Keratin, dem Hauptprotein des SCs. Das Verhältnis der Signalintensitäten zweier Komponenten ist proportional zum Verhältnis ihrer Konzentrationen im Messvolumen und ermöglicht somit eine robuste Quantifizierung [49].

Für die anschließende vollquantitative Bestimmung der Wirkstoffkonzentration im SC wurden zuvor spezifische Kalibrierungen durchgeführt, die in die Berechnung einfließen. Hierzu gehörten insbesondere Messungen von bovinem Serumalbumin (BSA) als Surrogat für Keratin in Wasser, des Wirkstoffs in einem geeigneten Lösungsmittel sowie des Lösungsmittels in Wasser. Diese Kalibrierungen ermöglichen es, die gemessenen Raman-Signale in absolute Wirkstoffkonzentrationen innerhalb des SC zu überführen. Dieser Ansatz wurde auch von Gaiser und Lunter erfolgreich angewendet, beispielsweise für die Quantifizierung der Wirkstoffe Coffein und Ketoprofen im SC [46, 50].

Nach Faktorisierung mit diesen Komponenten und der Normierung auf das entsprechende Hautsignal in der jeweiligen Tiefe musste zusätzlich der sich mit der Tiefe verändernde Wassergehalt des SC berücksichtigt werden, der mit zunehmender Tiefe ansteigt (25 zu 65 % [49]), während der relative Proteingehalt entsprechend abnimmt. Dadurch ergibt sich für jede gemessene SC-Tiefe ein spezifischer Korrekturfaktor, der in die finale Berechnung der Wirkstoffkonzentration einfließt.

Nach anfänglichen Unstimmigkeiten in der Berechnungsweise der zuvor genannten Publikation und unter Berücksichtigung der Möglichkeit eines wissenschaftlichen Austauschs bei RiverD International B.V. in Rotterdam konnte nach eingehender Diskussion mit Caspers et al. eine stimmige Berechnung der Penetrationsdaten erreicht werden, die dazu führte, dass die damit zukünftig ermittelten CRS-Ergebnisse mit

den TS-Ergebnissen derselben drei Hautproben übereinstimmten und keine signifikanten Unterschiede ($\alpha = 5\%$) aufwiesen.

Um die nun etablierte CRS-Methode mit der TS-Methode zu vergleichen, wurden dieselben Hautproben aus fünf verschiedenen Schweinehäuten nach Inkubation mit der Salicylsäure-Referenzformulierung (26,5 mg Formulierung, 1 Stunde Uptake-Zeitpunkt) sowohl mittels CRS als auch TS-Methode untersucht. Die Analyse zeigte dabei, dass die Validierung der CRS-Methode erfolgreich war: Die erhaltenen CRS-Ergebnisse unterschieden sich nicht signifikant von denen der TS-Referenzmethode und konnten damit als äquivalent bewertet werden.

Ebenso wurde die CRS-Methode für die Quantifizierung von Diclofenac etabliert. Als charakteristisches Signal für die Bestimmung diente hierbei die Ring-1+2-Streckschwingung bei einer Wellenzahl von 1604 cm^{-1} (vgl. Abb. 11).

Mit Abschluss der CRS-Kalibrierungen und der Validierung der Ergebnisse durch den Vergleich mit den TS-Daten für Salicylsäure waren nun alle Voraussetzungen für die Durchführung der dermalen Bioäquivalenzstudien geschaffen:

5.5.2 Ex-vivo Bioäquivalenzuntersuchungen für Salicylsäure an menschlicher Haut

Zunächst sollen die Ergebnisse der Salicylsäure-Ex-vivo-Untersuchungen für den Uptake-Zeitpunkt an der Humanhaut besprochen werden. Die Untersuchungen wurden gemäß den Vorgaben der EMA-Leitlinie [2] für die TS-Methode durchgeführt und auf die CRS-Methode übertragen. Für den Methodenvergleich bei den Prüfprodukten und den jeweiligen Studienzeitpunkten wurden jeweils die selben drei Hautproben herangezogen, die zunächst mittels CRS und anschließend mit der TS-Methode analysiert wurden.

Nach Auswertung der kumulativ penetrierten Salicylsäure-Mengen im SC bis zu einer Tiefe von $10\text{ }\mu\text{m}$ wurden für die jeweiligen Studienzeitpunkte die 90 %-KIs der Produkt-zu-Produkt-Verhältnisse berechnet. Die Ergebnisse zeigten, dass die Bioäquivalenzuntersuchung an der Humanhaut für den gewählten Uptake-Zeitpunkt erfolgreich verlief und sowohl die CRS- als auch die TS-Methode vergleichbare Ergebnisse lieferten:

Zuerst wurde die Referenzcreme gegen sich selbst getestet, wodurch die definitiv bioäquivalente Formulierung für beide Testmethoden bioäquivalente Ergebnisse lieferte, da die 90 %-KIs vollständig innerhalb des von der EMA definierten Akzeptanzbereichs von 80,00 - 125,00 % [2] lagen. Damit konnte die Funktionsfähigkeit des Systems und der Methode hinsichtlich der Eignung der CRS-Methode für dermale Bioäquivalenzuntersuchungen nachgewiesen werden.

Anschließend wurde die selbst nachgebildete Testformulierung betrachtet, die ebenfalls für beide Testmethoden bioäquivalente Ergebnisse erzielte. Dies bestätigte erneut die Eignung der Methode sowie den Erfolg des Reverse-Engineerings.

Zuletzt zeigte die Analyse der Kontrollformulierung, dass die 90 %-KIs erwartungsgemäß vollständig außerhalb des Akzeptanzbereichs lagen. Dies verdeutlicht nicht nur die Eignung der Methode, sondern auch ihre ausreichende diskriminatorische Aussagekraft für zukünftige Anwendungen.

Für den 4-Stunden-Clearance-Zeitpunkt wurden die Hautproben zunächst 1 Stunde lang mit den Prüfprodukten inkubiert, bevor die Formulierung von der Hautoberfläche entfernt und für 4 weitere Stunden inkubiert wurde.

Die Clearance-Ergebnisse zeigten, dass beide Methoden sowohl für den Referenz-gegen-Referenz-Vergleich als auch für den Testformulierung-gegen-Referenz-Vergleich dieselben Resultate lieferten wie bereits beim Uptake-Zeitpunkt. Dies bestätigte die Eignung der Methoden für dermale Bioäquivalenzuntersuchungen. Auffällig war lediglich, dass sich das 90 %-KI der Kontrollformulierung bei der CRS-Methode verkleinerte, was auf eine verringerte Messvariabilität und somit auf eine höhere Präzision der CRS-Analyse hinweist. Diese Beobachtung sollte jedoch in weiteren Studien überprüft werden.

Der numerische Vergleich der kumulativ penetrierten Salicylsäure-Mengen im Stratum corneum bis zu einer Tiefe von 10 μm für beide Methoden am Uptake-Zeitpunkt zeigte, dass zwischen CRS- und TS-Methode kein signifikanter Unterschied ($\alpha = 5\%$) bestand. Die Ergebnisse konnten somit als äquivalent bewertet werden, was die Eignung der CRS-Methode für zukünftige Bioäquivalenzstudien bestätigte, da sie mindestens vergleichbar mit der von der EMA akzeptierten TS-Methode war.

Betrachtete man die verschiedenen Prüfprodukte, zeigte sich, dass zwischen den drei bioäquivalenten Produkten (Referenz, Referenz und Testformulierung) kein signifikanter Unterschied bestand, was die vorherigen Befunde stützte. Die Kontrollformulierung wies hingegen, wie erwartet, ein signifikant geringeres Penetrationsvermögen auf ($\alpha = 5\%$).

Gleiches galt für den Methodenvergleich am Clearance-Zeitpunkt: Die Ergebnisse bestätigten erneut die zuvor dargestellten Befunde und unterstrichen die hohe Eignung der CRS-Methode. Die erzielte gute Vergleichbarkeit der CRS-Ergebnisse mit den Tape-Stripping-Ergebnissen entsprach den Befunden von Gasier und Lunter für die Wirkstoffe Koffein [46] und Ketoprofen [50].

Damit die Ergebnisse der Bioäquivalenzuntersuchungen gemäß EMA-Leitlinie als valide gelten, musste unter anderem die Integrität der zu testenden Hautflächen sichergestellt werden. Idealerweise erfolgt die Kontrolle der Hautintegrität sowohl vor der Applikation der Prüfprodukte als auch nach der Abtragung der Formulierung, direkt vor der Penetrationsuntersuchung [2].

Hierzu wird der Transepidermale Wasserverlust (TEWL) gemessen. Der TEWL-Wert gibt an, wie viel Wasser über die Haut diffundiert, und dient als empfindlicher Indikator für die Barrierefunktion des SCs. Ein stabiler TEWL-Wert zeigt dabei an, dass die Hautbarriere intakt ist, während erhöhte Werte auf eine geschädigte Hautbarriere hinweisen würden, was die Penetration der Wirkstoffe beeinflussen könnte [51].

Für die ex-vivo-TEWL-Untersuchungen setzte die durchführende Forschungsgruppe das In-vitro Tewameter VT 310 von Courage + Khazaka (Köln, Deutschland) ein.

Die Ergebnisse zeigten, dass die Hautintegrität bei allen Penetrationsuntersuchungen gewährleistet war und sich durch die Applikation der Salicylsäure-haltigen Prüfprodukte nicht signifikant veränderte. Mit Ausnahme der Messungen bei der zweiten Referenz lagen die Abweichungen der TEWL-Werte vor und nach der Applikation sogar innerhalb des Messfehlers des Geräts von $\pm 10\%$ plus $\pm 1 \text{ g/m}^2/\text{h}$ (bei einer relativen Feuchte zwischen 5 % und 90 %) [52]. Ein gleiches Ergebnis zeigte sich auch bei den Clearance-Untersuchungen.

Somit kann geschlossen werden, dass im festgelegten Studiendesign zu beiden Studienzeitpunkten bei den verwendeten Prüfprodukten keine signifikanten Unterschiede in der Hautintegrität auftreten. Dies gilt auch für den Clearance-Zeitpunkt mit der insgesamt längeren Expositionsdauer, obwohl aufgrund der keratolytischen Wirkung der Salicylsäure eine Beeinträchtigung hätte vermutet werden können. Dies unterstreicht die Konformität der Studienergebnisse mit der EMA-Leitlinie.

In Kombination mit den bereits beschriebenen methodischen Vorteilen (siehe Zusammenfassung) deutet dies darauf hin, dass die CRS-Methode für zukünftige routinemäßige dermale Bioäquivalenzuntersuchungen mindestens eine vergleichbare oder potenziell sogar eine höhere Eignung als die TS-Methode aufweist.

5.5.3 Ex-vivo Bioäquivalenzuntersuchungen für Salicylsäure an Schweinehaut

Neben der Bioäquivalenzuntersuchung an Humanhaut (siehe Abschnitt zuvor) wurde Schweinehaut als Surrogatmodell eingesetzt, um die Eignung der CRS-Methode auch in diesem Hautmodell zu überprüfen. In der Forschung wird Schweinehaut häufig als Modell für Humanhaut verwendet, allerdings ist die Aussagekraft dieses Modells weiterhin umstritten. Die Untersuchungen dienten daher dazu, die Methoden erneut in einem alternativen Hautmodell zu vergleichen und deren Übertragbarkeit zu beurteilen.

Die finalen Ergebnisse der Bioäquivalenzbewertung der Salicylsäure-haltigen Prüfprodukte zum Uptake-Zeitpunkt zeigten für beide Methoden ähnliche Befunde wie bereits bei den ex-vivo-Untersuchungen an Humanhaut. Die Referenzformulierung erfüllte erwartungsgemäß für beide Testmethoden die Bioäquivalenzkriterien, da die 90 %-KIs vollständig innerhalb des von der EMA definierten Akzeptanzbereichs von 80,00 - 125,00 % lagen. Auch die nachgebildete Testformulierung zeigte für beide Methoden bioäquivalente Ergebnisse, was sowohl die Eignung der Methode als auch den Erfolg des Reverse-Engineerings erneut bestätigt. Im Gegensatz dazu lagen die 90 %-KIs der Kontrollformulierung vollständig außerhalb des Akzeptanzbereichs, was die ausreichende diskriminatorische Aussagekraft der Methode unterstreicht.

Insgesamt konnte damit gezeigt werden, dass die CRS-Methode auch mit diesem Hautmodell für dermale Bioäquivalenzstudien geeignet ist.

Analog zu den Untersuchungen an Humanhaut wurde auch bei Schweinehaut ein direkter Methodenvergleich durchgeführt, bei dem die kumulativ penetrierten Wirkstoffmengen im SC bis zu einer Tiefe von 10 µm verglichen wurden. Wie bereits bei Humanhaut zeigte der Methodenvergleich zum Uptake-Zeitpunkt keinen signifikanten Unterschied zwischen CRS- und TS-Methode ($\alpha = 5\%$), sodass die Ergebnisse hinsichtlich der ermittelten kumulierten Wirkstoffmengen als äquivalent bewertet werden konnten. Zwischen den drei bioäquivalenten Formulierungen bestand ebenfalls kein signifikanter Unterschied, während die Kontrollformulierung erwartungsgemäß ein signifikant geringeres ($\alpha = 5\%$) Penetrationsvermögen aufwies.

Dank des gleichen Studiendesigns konnte abschließend auch ein Vergleich der penetrierten Mengen zwischen den ex-vivo Penetrationsuntersuchungen an Humanhaut und dem Surrogatmodell Schweinehaut durchgeführt werden. Obwohl für zulassungsrelevante Studien nach EMA ausschließlich in-vivo-Humanstudien zulässig sind [2], wird in ex-vivo Penetrationsuntersuchungen der Forschung Schweinehaut

aufgrund ethischer und finanzieller Gründe häufig als Surrogat verwendet, da die Literatur eine sehr gute Vergleichbarkeit der Hautstruktur und des Penetrationsverhaltens postulieren [53, 54].

Unsere Ergebnisse beim Vergleich der Hautmodelle zeigten, dass nach Auftragung der Referenzformulierung zum Uptake-Zeitpunkt in Schweinehaut mehr Wirkstoff penetrierte als in Humanhaut. In unseren Untersuchungen wies die Humanhaut dahingehend eine etwa 2- bis 3-fach höhere Penetrationsbarriere auf, was bedeutet, dass nur etwa ein Drittel bis die Hälfte der Wirkstoffmenge in die Humanhaut eindrang, die in Schweinehaut penetrierte. Dies lässt sich durch die insgesamt geringeren penetrierten Salicylsäure-Mengen in Humanhaut erklären und stimmt gut mit den Literaturwerten von 2–3 überein [53]. Im Vergleich zu anderen Hautmodellen wie Nagetierhaut, die eine deutlich geringere Barriere (Faktor 3 - 10) aufweist [53], bestätigen unsere Ergebnisse damit, dass die postaurikuläre Schweinehaut ein sehr geeignetes Surrogat für Humanhaut darstellt. Gleichzeitig zeigt dies, dass unsere Methodik (sowohl TS als auch CRS) zuverlässig ist und reproduzierbare Ergebnisse lieferte, die mit der Literatur konsistent sind.

Um die Relevanz der CRS-Methode auch für die pharmazeutische Industrie zu demonstrieren, wurden abschließend ex-vivo Bioäquivalenzuntersuchungen an Schweinehaut mit Diclofenac-haltigen Prüfprodukten durchgeführt. Damit sollte der Nachweis der Methode an einem zweiten Wirkstoff verifiziert werden:

5.5.4 Ex-vivo Bioäquivalenzuntersuchungen für Diclofenac an Schweinehaut

Bei den ex-vivo Bioäquivalenzuntersuchungen mit Diclofenac-haltigen Prüfprodukten entsprach das Studiendesign dem der zuvor beschriebenen Salicylsäure-Studien: 1 Stunde für den Uptake-Zeitpunkt, 4 Stunden für den Clearance-Zeitpunkt sowie eine Applikationsmenge von 15 mg Formulierung/cm². Als Referenzprodukt diente das Voltaren Schmerzgel forte (GlaxoSmithKline Consumer Healthcare GmbH & Co. KG, München, Deutschland), das zweifach getestet wurde. Das Testprodukt war Diclox forte (ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland), und die Kontrollformulierung bestand aus einer Verdünnung der Referenz mit Carbomel-Gel NRF 13.2 [47].

Nach Durchführung der ex-vivo-Bioäquivalenzuntersuchungen mit Schweinehaut zeigten die finalen Ergebnisse der Diclofenac-haltigen Prüfprodukte zum Uptake-Zeitpunkt, dass beide Methoden vergleichbare Befunde lieferten, ähnlich wie bereits bei den ex-vivo-Salicylsäure-Untersuchungen. Die Referenzformulierung erfüllte erwartungsgemäß die Bioäquivalenzkriterien, da die 90 %-KIs vollständig innerhalb des von der EMA definierten Akzeptanzbereichs von 80,00 – 125,00 % lagen. Auch das bereits als Generikum zugelassene Diclox forte Gel, das zuvor noch nicht quantitativ auf Bioäquivalenz getestet worden war, zeigte für beide Methoden bioäquivalente Ergebnisse. Dies bestätigte die Eignung der CRS-Methode und erklärt zugleich die vergleichbare klinische Wirksamkeit des zugelassenen Generikums. Im Gegensatz dazu lagen die 90 %-KIs der selbst hergestellten verdünnten Kontrollformulierung vollständig außerhalb des Akzeptanzbereichs, was die diskriminatorische Aussagekraft der Methode, wie zuvor bei den Salicylsäure-Untersuchungen, unterstreicht.

Die Ergebnisse ließen sich zudem durch die Daten zum Clearance-Zeitpunkt validieren. Dabei zeigte sich, dass beide Methoden die Bioäquivalenz zuverlässig nachweisen konnten, selbst wenn die Penetrationsmengen nach dem Uptake-Zeitpunkt abnahmen, bedingt durch die weitere Diffusion in tiefere Hautschichten. Dies belegt, dass die pharmakokinetische Analyse für beide Studienzeitpunkte (Anströmphase und Auswachphase) für alle untersuchten Produkte robust und reproduzierbar durchgeführt werden kann.

Auch für die Bioäquivalenzuntersuchungen mit Diclofenac konnte ein Methodenvergleich der kumulativ ermittelten Wirkstoffmengen untersucht werden. Die Ergebnisse zeigten, dass die Diclofenac-Penetrationsuntersuchungen äquivalente Befunde lieferten: Wie erwartet nahmen die penetrierten Mengen beim Clearance-Zeitpunkt im Vergleich zum Uptake-Zeitpunkt ab. Zwischen den bioäquivalenten und vermeintlich bioäquivalenten Prüfprodukten (Referenz vs. Referenz bzw. Testprodukt vs. Referenz) sowie zwischen den Ergebnissen der CRS-Methode und der von der EMA akzeptierten TS-Methode traten keine signifikanten Unterschiede auf ($\alpha = 5\%$).

Zwischenfazit Arbeitspaket:

Nach Abschluss des Arbeitspakets konnten mittels der kalibrierten CRS-Quantifizierungsmethode für die Wirkstoffe Salicylsäure und Diclofenac die ersten ex-vivo Bioäquivalenzuntersuchungen in Anlehnung an die EMA-Leitlinie [2] durchgeführt werden. Für Salicylsäure wurde dies an zwei Hautmodellen (Humanhaut und Schweinehaut), für Diclofenac an einem Hautmodell (Schweinehaut) umgesetzt, wodurch die Eignung der CRS-Methode für dermale Bioäquivalenzstudien verifiziert werden konnte. In beiden Fällen zeigten die beiden Messmethoden zu beiden untersuchten Zeitpunkten äquivalente Ergebnisse.

Da die 90 %-KIs der drei bioäquivalenten bzw. vermeintlich bioäquivalenten Prüfprodukte (Referenz, Referenz und Testformulierung) vollständig innerhalb des Akzeptanzintervalls von 80,00 - 125,00 % lagen, konnten diese als tatsächlich bioäquivalent eingestuft werden. Dies veranschaulicht die Funktionsfähigkeit der CRS-Methode und bestätigte im Falle der Salicylsäure-Untersuchungen zudem das erfolgreiche Reverse-Engineering der selbst nachgebildeten und re-formulierten Testformulierung. Darüber hinaus zeigte die statistisch signifikant unterschiedliche Kontrollformulierung die ausreichende diskriminatorische Aussagekraft der Methode, da sie auch in der Lage war, nicht bioäquivalente Produkte zuverlässig zu identifizieren.

Zusätzlich bestätigten die Ergebnisse die in der Literatur [53, 54] beschriebene Eignung der postaurikulären Schweinehaut als geeignetes Surrogat für Humanhaut. Schließlich konnte erstmals für das generische Diclofenac forte Gel, dessen klinische Wirksamkeit bereits bei der Zulassung als äquivalent zum Originator Voltaren Schmerzgel forte nachgewiesen wurde, auch eine ex-vivo Bioäquivalenz zum Referenzprodukt demonstriert werden.

Damit konnten die von der durchführenden Forschungsgruppe zuvor publizierten Ergebnisse für die Wirkstoffe Coffein [46] und Ketoprofen [50] durch eine Erweiterung auf die Wirkstoffe Salicylsäure und Diclofenac bestätigt werden. Allerdings fehlten weiterhin die von der EMA-Leitlinie [2] geforderten in-vivo-Daten an Menschen. Entsprechende Studien lagen bislang weder in ausreichender Konformität mit den regulatorischen Anforderungen noch mit einer ausreichend großen Probandenzahl in der Literatur vor. Diese regulatorische Lücke muss jedoch geschlossen werden, bevor die neuartige CRS-Methode perspektivisch in einer zukünftigen Aktualisierung der Leitlinie als akzeptierte Methode berücksichtigt werden kann. An dieser Stelle setzte das letzte und zugleich zentralste Arbeitspaket des IGF-Vorhabens Nr. 22947 N/1 an.

5.6 Arbeitspaket 6: Durchführung einer pivotalen in-vivo CRS-Bioäquivalenzstudie in Anlehnung an die neue EMA-Leitlinie (Salicylsäure)

Ziel:

Für zulassungsrelevante Fragestellungen werden gemäß der aktuellen EMA-Leitlinie je nach Komplexität der Formulierung anstelle kostenintensiver klinischer Wirksamkeitsstudien mit klinischen Endpunkten lediglich dermale in-vivo Bioäquivalenz Humanstudien akzeptiert [2]. Diese müssen derzeit alleinig mit der TS-Methode durchgeführt werden. [2] Für die CRS-Methode lagen bislang jedoch keine Daten vor, die in ausreichender Konformität mit der EMA-Leitlinie erhoben wurden oder auf einer ausreichend großen Anzahl menschlicher Probanden basierten. Die EMA führt hierzu aus, dass CRS derzeit lediglich als unterstützende Methode eingesetzt werden kann. Eine zukünftige Anerkennung als primäre Methode für Bioäquivalenzuntersuchungen erscheint jedoch möglich, sofern eine umfassende Validierung erfolgt und die Eignung für Äquivalenzprüfungen eindeutig nachgewiesen wird. Voraussetzung hierfür wäre idealerweise eine positive Qualifizierungsbewertung durch den Ausschuss für Medizinprodukte und Humanarzneimittel der EMA (CHMP) [2].

Ziel des letzten und zentralsten Arbeitspakets war daher die Durchführung einer an dieses Studiendesign angepassten in-vivo Humanstudie mit der CRS-Methode in enger Konformität zur EMA-Leitlinie. Hierbei soll die Eignung der CRS-Methode auch unter in-vivo-Bedingungen nachgewiesen werden. Dadurch sollte die bestehende regulatorische Datenlücke geschlossen und eine Grundlage für eine zukünftige regulatorische Bewertung der CRS-Methode geschaffen werden.

Details:

Die nachfolgend dargestellten Ergebnisse wurden bereits als Link et al. [48] mit dem Titel: A pivotal, dermal, in-vivo bioequivalence study performed by confocal Raman spectroscopy (CRS) in der Fachzeitschrift European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics (<https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2025.114891>) veröffentlicht.

In der durchgeführten in-vivo CRS-Humanstudie zur Untersuchung der dermalen Bioäquivalenz, die als Leistung Dritter von der SGS proderm GmbH (Hamburg, Deutschland) durchgeführt wurde, wurde ein Studiendesign gewählt, das an die zuvor beschriebenen ex-vivo Untersuchungen angelehnt war. Dabei wurden dieselben vier Prüfprodukte eingesetzt: 2 × die V55 Max - Creme als Referenz, 1 × die selbst reformulierte Testformulierung sowie 1 × die mit Basiscreme verdünnte Kontrollformulierung (siehe S.12ff & Abb. 12). Auch die Applikationsmenge von 15 mg Produkt pro cm² sowie die Studienzeitpunkte wurden übernommen. Der Uptake-Zeitpunkt lag bei 1 Stunde und der Clearance-Zeitpunkt bei 4 Stunden.

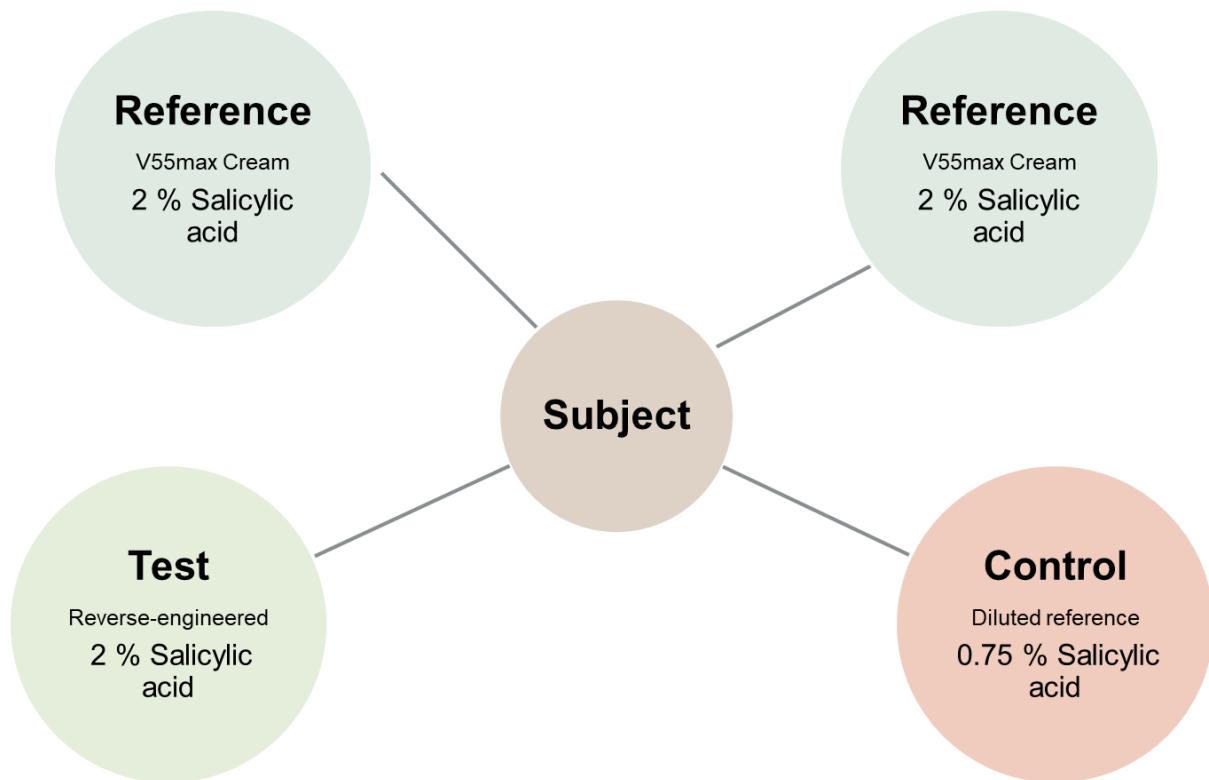


Abb. 12 Verwendete Prüfprodukte der Salicylsäure-Bioäquivalenzstudien.

Da in der Studie kosmetische Produkte verwendet wurden, war die Durchführung einer mit hohen finanziellen Hürden verbundene Arzneimittelstudie nicht notwendig. Da Salicylsäure jedoch auch als Wirkstoff in zahlreichen zugelassenen Arzneimitteln etabliert ist (z. B. „Salicyl-Vaseline 5 % Salbe“ von Bombastus-Werke AG, Freital, Deutschland oder „Salicylic Acid 5 % Topical Ointment“ von Kaiser Permanente, Oakland, Kalifornien, USA), besitzen die mit dieser in-vivo Humanstudie gewonnenen Ergebnisse dieselbe Relevanz wie Ergebnisse einer Arzneimittelstudie.

Das zuvor verwendete ex-vivo Studiendesign musste lediglich geringfügig angepasst werden. Mit der nicht-invasiven und nicht-destruktiven CRS-Methode ergibt sich ein klarer Vorteil: Da die Methode das Hautareal von Interesse nicht zerstört (vgl. TS-Methode), können die Clearance-Werte an denselben Hautarealen gemessen werden wie die Uptake-Werte, sodass gepaarte Daten zur Analyse vorliegen.

Bei der klassischen SC-Abtragung mittels TS müssten die Clearance-Messungen an separaten Hautarealen erfolgen, was zu Verzerrungen und Ungenauigkeiten bei der Goldstandard-Methode führen könnte und zudem eine größere Anzahl an Hautarealen erforderlich macht.

Die in-vivo-CRS-Untersuchungen wurden mit dem dafür qualifizierten gen2-SCA Skin Analyzer (RiverD International B.V., Rotterdam, Niederlande) durchgeführt.

Um Messfehlern vorzubeugen, wurden statt der geforderten zwei Replikate drei Replikate pro Produkt mit einer Fläche von 4×6 cm gewählt (siehe ex-vivo TS-Studiendesign). Pro Replikat, Produkt und Studienzeitpunkt wurden 3 Messungen, also insgesamt 9 Tiefenmessungen durchgeführt. Diese wurden auf die drei Replikate aufgeteilt, sodass jeweils drei Tiefenmessungen pro Replikat durchgeführt wurden. Die Tiefenmessungen wurden mit einer vordefinierten Schrittweite von $2 \mu\text{m}$ durchgeführt, um die penetrierte Salicylsäure-Konzentration bis zu einer Tiefe von $15 \mu\text{m}$ zu erfassen. Zusätzlich zu den 4 randomisierten Messzonen (für die 4 Prüfprodukte, siehe Abb. 12), wurde eine Nullmesszone zur Basislinienkorrektur eingeschlossen, analog zu den ex-vivo Nullmessungen:

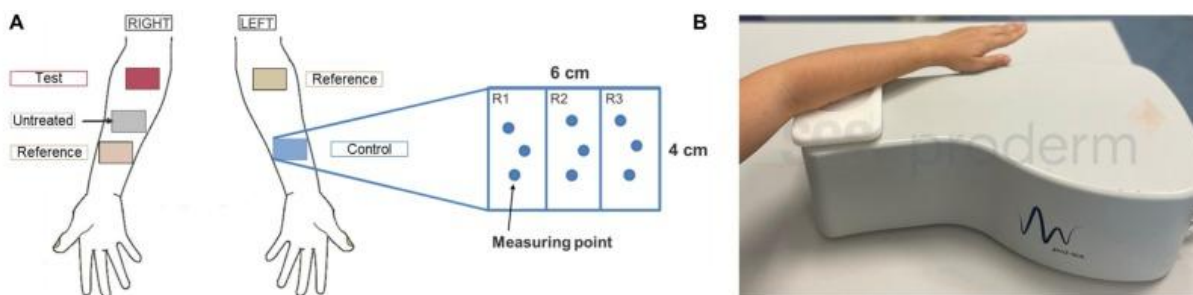


Abb. 13 **A:** Schematische Darstellung der Messzonen auf den volaren Unterarmen der 12 Probanden, mit der Unterteilung jeder Zone in drei Unterfelder, die als Replikate dienen. Insgesamt wurden je Produkt und Zeitpunkt 9 Tiefenmessungen durchgeführt. **B:** Messaufbau während der Spektrenerfassung mit dem gen2-SCA Skin Analyzer (RiverD International B.V., Rotterdam, Niederlande). Aus Link et al. [48].

Der Stichprobenumfang wurde nach Leitlinien-Empfehlung [2] auf 12 gesunde Probanden festgelegt. Dabei wurden vier Männer (33,3 %) und acht Frauen (66,7 %) eingeschlossen. Das mittlere Alter betrug $49,8 \pm 10,3$ Jahre, das Medianalter 49,5 Jahre. Alle Teilnehmenden wurden am Studienzentrum SGS proderm GmbH (Hamburg, Deutschland) rekrutiert und hatten vor Beginn der Studie eine schriftliche Einverständniserklärung abgegeben sowie eine ausführliche Aufklärung über die Studienabläufe erhalten. Die Ethikgenehmigung für die Bioäquivalenzstudie wurde von der Ethikkommission (Institutional Review Board, IRB) unter dem Referenzcode 2024/024 am 2. Oktober 2024 erteilt.

Einschlusskriterien waren ein Alter zwischen 18 und 65 Jahren, ein Body-Mass-Index unter 30, ein einheitlicher, gesunder Hauttyp ohne Erytheme oder starke Pigmentierungen im vorgesehenen Testbereich sowie Fitzpatrick-Hauttypen I bis III. Ausschlusskriterien umfassten aktive Hauterkrankungen im Testbereich, bekannte Allergien gegen Inhaltsstoffe der Prüfprodukte, eine Chemotherapie, Bestrahlung oder Hormontherapie in den letzten zwei Jahren sowie Wunden, Muttermale, Tattoos, Narben, irritierte Haut oder übermäßige Behaarung im Testbereich. Ebenfalls ausgeschlossen wurden Probanden mit sonnengebräunter Haut oder der Anwendung topischer Präparate auf dem Testareal in den sieben Tagen vor Studienbeginn.

Vor der Studie wurden die Teilnehmenden angewiesen, den Testbereich innerhalb von zwei Stunden vor Beginn nicht mit Wasser zu benetzen, innerhalb von 24 Stunden keine Seifen, Reinigungsmittel oder Kosmetika aufzutragen, den Bereich 48 Stunden vor Studienbeginn nicht zu rasieren, sieben Tage lang auf leave-on-Kosmetika zu verzichten sowie Sonnen- oder UV-Bestrahlung im Testbereich sechs Wochen lang zu vermeiden.

Während der Studie mussten die Probanden sowohl Wasserkontakt mit dem Messbereich sowie das Abwischen der aufgetragenen Formulierungen während der Anströmpphase vermeiden.

Nachdem die vier Prüfprodukte mit allen 12 Probanden für beide Studienzeitpunkte hinsichtlich der dermalen Bioäquivalenz untersucht worden waren, mussten sämtliche aufgenommenen Raman-Spektren einzeln auf mögliche Messauffälligkeiten überprüft werden, bevor die Datenanalyse durchgeführt werden konnte. Da die CRS-Methode zuvor noch nie in einer derart EMA-Leitlinien-konformen dermalen in-vivo Bioäquivalenzstudie angewendet wurde, konnten an dieser Stelle im Rahmen der Qualitätskontrolle der Spektren noch gezielt Optimierungen im Auswertungsprozess vorgenommen werden (siehe [48], ergänzendes Material und Abb. 19). Insbesondere wurde auf korrekt aufgezeichnete Tiefenmessungen des SCs geachtet, bei denen sich der Signalabstand zwischen den einzelnen SC-Tiefen durch die zunehmende Signalabschwächung gleichmäßig verhalten sollte. Eine repräsentative Tiefenmessung mit gleichmäßigem Keratinprofil des SCs zur möglichen Signal-Normierung ist in Abb. 14 dargestellt:

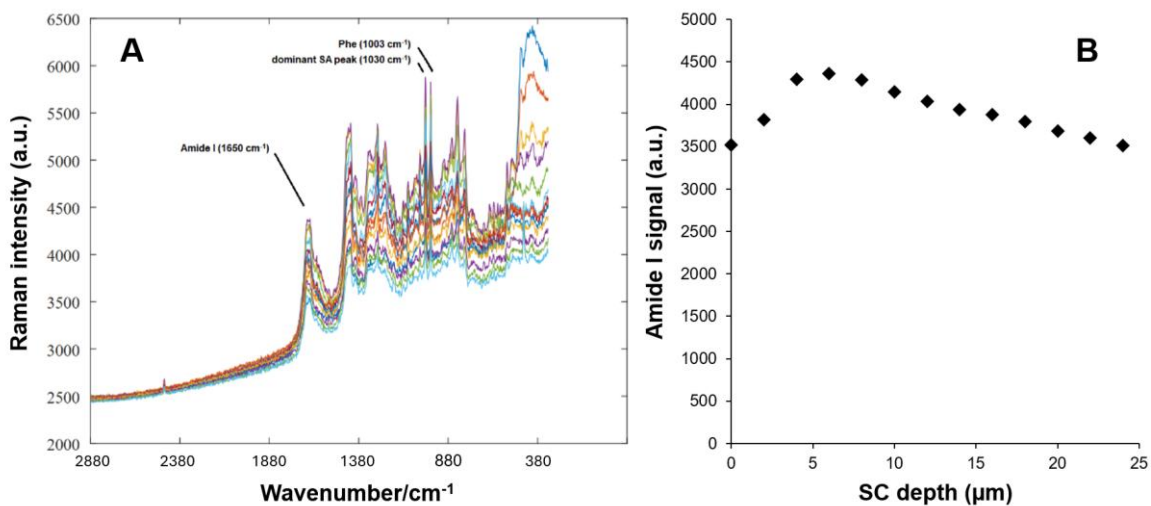


Abb. 14 Repräsentatives Raman-Spektren einer Tiefenmessung. **A:** Homogene und regelmäßig angeordnete Signalabstände zwischen einzelnen SC-Tiefen mit einer Schrittweite von 2 μm . Erkennbares Salicylsäure-Wirkstoffsignal bei einer Wellenzahl von 1030 cm^{-1} . **B:** Regelmäßiges Keratinprofil, abgeleitet aus dem Amide-I-Signal, mit abnehmender Intensität in tieferen Hautschichten aufgrund der zunehmenden Abschwächung des Proteinsignals. Aus ergänzendem Material von Link et al. [48].

In Abb. 15 sind beispielhaft fehlerhafte Raman-Tiefenmessungen dargestellt, die beispielsweise durch unzureichenden Kontakt des Messareals mit dem Messfenster des Raman-Geräts, durch kosmische Strahlung oder Fluoreszenzsignale verursacht werden können. Diese Spektren wurden bei der Datenanalyse von der anschließenden Bioäquivalenzbewertung ausgeschlossen:

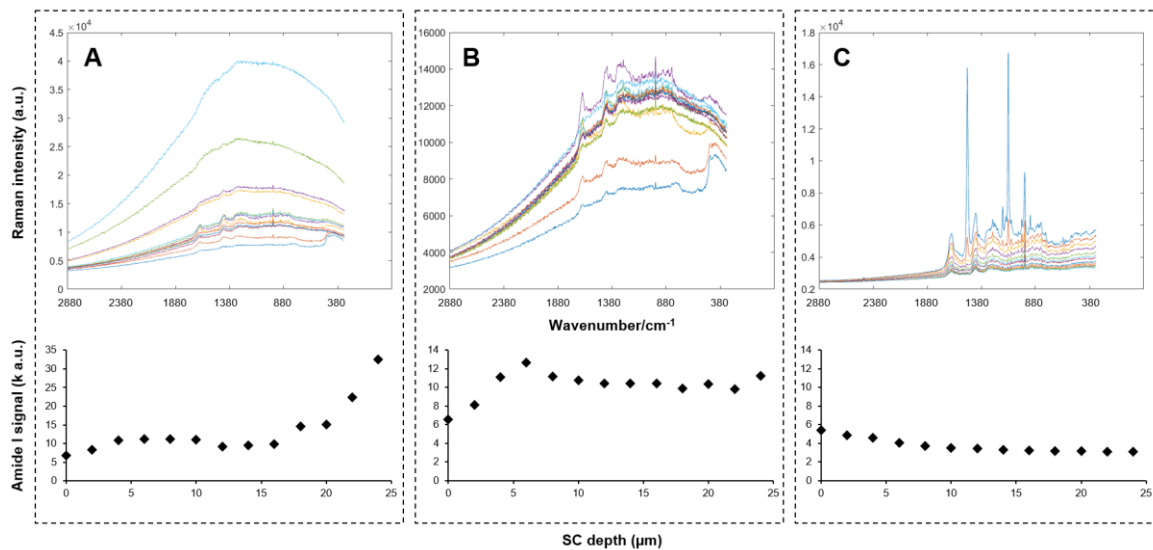


Abb. 15 Beispielhafte fehlerhafte und unregelmäßige Raman-Tiefenmessungen (oben) mit den entsprechenden Keratinprofilen (unten), abgeleitet aus dem Amide-I-Signal ($\sim 1650 \text{ cm}^{-1}$). **A:** Hohe Fluoreszenzsignale, die die tatsächlichen Spektren überlagern. **B:** Unregelmäßiger Signalabstand zwischen den SC-Tiefen aufgrund von Bewegungen der Probanden während der Messung. **C:** Störende Peaks, kosmische Strahlung. Aus ergänzendem Material von Link et al. [48].

Nach der Datenanalyse wurden für jedes Produkt die mittels CRS bestimmten mittleren Salicylsäure-Konzentrationen der 12 Probanden gegen die SC-Tiefe aufgetragen. Die Darstellung erfolgte bis zu einer SC-Tiefe von 15 μm , siehe Abb. 16:

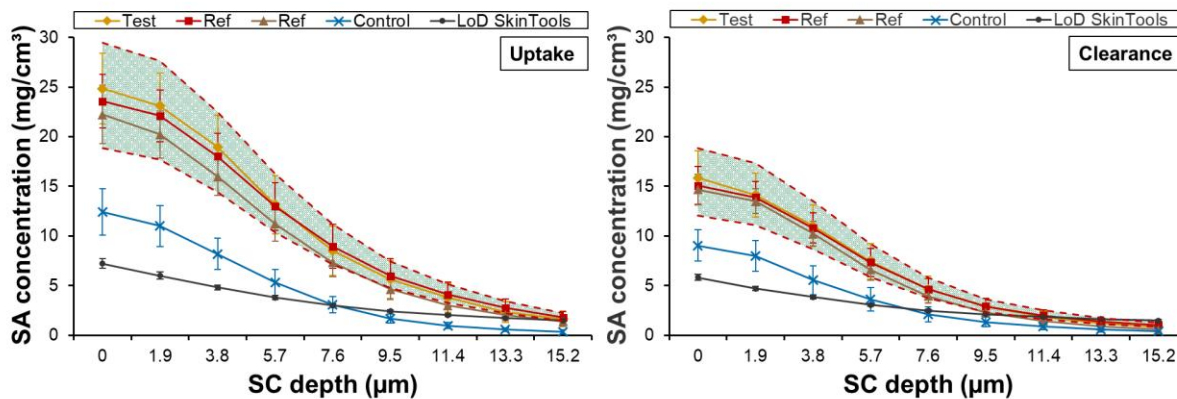


Abb. 16 Penetrationsprofile von Salicylsäure für den Uptake-Zeitpunkt (**links**) und den Clearance-Zeitpunkt (**rechts**). Der Bereich von 80,00 - 125,00 % der Mittelwerte der Referenz (in rot) ist zur besseren Visualisierung der Ähnlichkeiten grün markiert; eine derartige Darstellung ist von der EMA jedoch nicht vorgeschrieben. Die Referenz wurde zweimal getestet. Die simulierte LoD-Kurve markiert den Punkt, an dem das Hautsignal das Signal des Wirkstoffs übersteigen würde. ($n = 12$ Probanden, mittlere SS-Konzentration $\pm 90\%$ Konfidenzintervall, 9 Tiefenmessungen pro Produkt und Studienzeitpunkt). Aus Link et al. [48].

In Abb. 16 (links) zeigen die beiden Penetrationsprofile der Referenzformulierung für den ersten Uptake-Zeitpunkt (zweifache Bestimmung; rot und braun) eine hohe Übereinstimmung und belegen damit die Reproduzierbarkeit der CRS-Messungen. Das Konzentrationsprofil der nachgebildeten Testformulierung (gelb) weist über die gesamte SC-Tiefe hinweg ein sehr ähnliches Verhalten im Vergleich zur Referenz auf, was als erster Hinweis auf eine mögliche Bioäquivalenz gewertet werden kann.

Zur verbesserten Visualisierung wurde in Anlehnung an die Anforderungen der EMA an Bioäquivalenzkriterien [2] ein Akzeptanzbereich von 80,00 – 125,00 % relativ zum Referenzprofil in grün dargestellt. Auch wenn eine solche grafische Darstellung nicht explizit gefordert ist, erleichtert sie die Interpretation der Daten. Sämtliche Profile der Referenz- und Testformulierung liegen dabei innerhalb dieses Bereichs, was die hohe Ähnlichkeit der untersuchten Produkte zusätzlich unterstreicht und als Indiz für Bioäquivalenz gewertet werden kann.

Das Profil der Kontrollformulierung (blau) zeigt hingegen über die gesamte SC-Tiefe hinweg deutlich niedrigere Wirkstoffkonzentrationen. Dies spricht für einen klaren Unterschied zu den anderen Formulierungen und unterstreicht die diskriminatorische Aussagekraft der CRS-Methode, unterschiedliche Formulierungen unterscheiden zu können. Das in schwarz dargestellte tiefenabhängige Detektionslimit (ermittelt mit der SkinTools-Software, RiverD International B.V., Rotterdam, Niederlande) liegt für die meisten Profile unterhalb der gemessenen Signale. Lediglich die Kontrollformulierung unterschreitet ab etwa 7,5 µm SC-Tiefe die Nachweisgrenze, sodass in diesem Bereich das intrinsische Hautsignal dominiert. Diese Werte wurden folgerichtig von der weiteren Bioäquivalenzauswertung ausgeschlossen, wodurch die Validität der Analyse nicht beeinträchtigt wird.

Die rechte Seite der Abb. 16 (Clearance-Zeitpunkt) zeigt ein vergleichbares Bild: Referenz- und Testformulierung verhalten sich erneut sehr ähnlich und liegen innerhalb des definierten Akzeptanzbereichs, während die Kontrollformulierung weiterhin deutlich geringere Penetrationswerte aufweist. Dies bestätigt die Reproduzierbarkeit der CRS-Ergebnisse auch für den Zeitpunkt der Auswaschphase.

Im Vergleich beider Zeitpunkte wird zudem der erwartete Effekt der Auswaschphase sichtbar. Analog zu vorherigen ex-vivo-Untersuchungen (siehe S.31ff) zeigen sich reduzierte Wirkstoffkonzentrationen zum Clearance-Zeitpunkt im Vergleich zu den höheren Uptake-Werten innerhalb der Anströmphase. Diese Beobachtung entspricht den theoretischen Erwartungen und bestätigt die Plausibilität der erhobenen Daten. Gleichzeitig zeigt sie, dass CRS geeignet ist, die Ähnlichkeit verschiedener Produkte auch im Hinblick auf pharmakokinetische Zusammenhänge darzustellen.

Aus den ermittelten penetrierten Salicylsäure-Mengen wurde für jedes Produkt bei jedem Probanden zu beiden Studienzeitpunkten die intraindividuelle sowie die interindividuelle Variabilität bestimmt und miteinander verglichen:

Tab. 1 Intraindividuelle (Geometric mean of CV) und interindividuelle (Inter-subject variability) Variabilität der untersuchten Produkte bei allen 12 Probanden. Aus ergänzendem Material von Link et al. [48].

Subject	Ref (BENCHMARK)		Ref		Test		Control	
	Uptake CV	Clearance CV	Uptake CV	Clearance CV	Uptake CV	Clearance CV	Uptake CV	Clearance CV
S01	27.95 %	9.22 %	40.62 %	16.42 %	14.68 %	29.50 %	31.27 %	22.09 %
S02	21.47 %	24.46 %	15.49 %	21.30 %	38.87 %	21.98 %	22.44 %	40.68 %
S03	50.12 %	35.05 %	11.01 %	23.36 %	26.39 %	54.00 %	26.57 %	51.68 %
S04	41.84 %	16.65 %	22.13 %	13.84 %	14.67 %	28.08 %	14.27 %	16.76 %
S05	27.44 %	19.49 %	14.14 %	26.30 %	32.46 %	24.60 %	20.38 %	43.63 %
S06	24.82 %	35.14 %	10.53 %	14.10 %	8.30 %	55.06 %	19.10 %	36.13 %
S07	30.22 %	30.49 %	34.29 %	26.06 %	33.23 %	24.05 %	48.43 %	41.10 %
S08	21.61 %	35.61 %	14.96 %	23.87 %	53.13 %	9.73 %	33.58 %	23.33 %
S09	22.33 %	29.44 %	51.14 %	25.70 %	15.09 %	20.98 %	41.55 %	94.98 %
S10	41.40 %	23.66 %	16.12 %	19.00 %	14.85 %	19.92 %	21.34 %	14.25 %
S11	29.65 %	25.48 %	15.77 %	19.25 %	34.31 %	24.72 %	29.61 %	24.97 %
S12	19.10 %	10.52 %	11.67 %	11.99 %	35.61 %	28.98 %	26.43 %	39.05 %
Geometric mean of CV	28.55 %	22.66 %	18.65 %	19.46 %	23.53 %	25.95 %	26.44 %	32.80 %
Geometric SD factor	1.35	1.58	1.69	1.31	1.74	1.57	1.41	1.69
Geometric mean range of CV	21.08 - 38.65 %	14.37 - 35.73 %	11.01 - 31.60 %	14.81 - 25.57 %	13.49 - 41.03 %	16.51 - 40.79 %	18.77 - 37.26 %	19.38 % - 55.54 %
Inter-subject variability	42.90 %	39.64 %	36.01 %	31.89 %	47.60 %	50.99 %	52.66 %	73.81 %

Die in Tab. 1 ermittelten Werte der intraindividuellen Variabilität sind mit denen aus den ex-vivo Studien vergleichbar. Im Vergleich dazu fallen die interindividuellen Variabilitäten etwas höher aus, was Erkenntnissen der Literatur entspricht: Bodenlenz et al. untersuchten die Gesamtvariabilität in einer Bioäquivalenzstudie unter Verwendung der dermalen Open-Flow-Mikroperfusion. Dabei zeigte sich, dass die Gesamtvariabilität zu bis zu 91 % durch interindividuelle Unterschiede und nur zu bis zu 9 % durch intraindividuelle Unterschiede bestimmt wird [55].

Anschließend sind in Tab. 2 für jedes Produkt und jeden Probanden die geometrisch-gemittelten kumulativ penetrierten Salicylsäure-Werte bis zu einer SC-Tiefe von 15 µm dargestellt. Für jeden Studienzeitpunkt werden zudem die durch die Auswaschphase erhaltenen Reduktionswerte gezeigt:

Tab. 2 Probandenspezifische Salicylsäure-Uptake- und Clearance-Daten zur Bioäquivalenzbewertung. Aus ergänzendem Material von Link et al. [48].

	Ref (BENCHMARK)			Ref			Test			Control		
Subject	Uptake (µg/cm²)	Clearance (µg/cm²)	Decrease	Uptake (µg/cm²)	Clearance (µg/cm²)	Decrease	Uptake (µg/cm²)	Clearance (µg/cm²)	Decrease	Uptake (µg/cm²)	Clearance (µg/cm²)	Decrease
S01	24.03	12.56	47.75 %	17.50	12.57	28.18 %	29.34	17.19	41.41 %	9.80	10.03	-2.36 %
S02	22.73	12.32	45.81 %	19.02	8.66	54.48 %	10.67	10.87	-1.87 %	8.00	5.02	37.33 %
S03	10.81	8.69	19.55 %	14.53	9.06	37.65 %	21.39	9.30	56.54 %	7.81	5.54	29.14 %
S04	18.07	10.94	39.47 %	13.82	10.55	23.64 %	17.00	7.90	53.54 %	5.24	6.26	-19.39 %
S05	11.08	5.72	48.33 %	10.65	7.63	28.34 %	11.36	6.40	43.70 %	5.88	3.46	41.17 %
S06	12.28	5.40	56.07 %	12.55	7.07	43.72 %	12.84	4.49	65.06 %	10.00	4.66	53.42 %
S07	11.95	8.59	28.10 %	10.53	6.97	33.75 %	16.01	11.69	26.98 %	4.59	3.80	17.18 %
S08	12.99	8.62	34.40 %	8.59	5.23	39.08 %	14.70	10.03	31.77 %	4.23	2.78	34.19 %
S09	13.64	7.08	48.08 %	12.74	8.50	33.27 %	11.31	5.36	52.64 %	3.03	1.24	59.17 %
S10	21.74	15.34	29.44 %	16.04	11.44	36.58 %	28.75	15.02	47.77 %	12.72	8.80	30.86 %
S11	15.29	10.81	28.60 %	15.48	10.42	32.68 %	12.81	10.61	17.19 %	7.49	6.18	17.49 %
S12	23.32	11.26	51.72 %	19.25	10.66	44.63 %	13.30	9.26	30.39 %	7.17	3.37	53.01 %
Geometric mean $\times/\div$ GSD factor	15.78 $\times/\div$ 1.36	9.34 $\times/\div$ 1.38	38.07 % $\times/\div$ 1.38	13.97 $\times/\div$ 1.30	8.62 $\times/\div$ 1.28	35.47 % $\times/\div$ 1.28	15.65 $\times/\div$ 1.42	9.19 $\times/\div$ 1.48	39.84 % $\times/\div$ 1.48	6.66 $\times/\div$ 1.51	4.49 $\times/\div$ 1.75	34.49 $\times/\div$ 1.54

Der aus Abb. 16 erkennbare Trend, dass die Clearance-Werte niedriger ausfallen als die Uptake-Werte, konnte hier auch anhand der numerischen Werte in Tab. 2 bestätigt werden: Die Werte der Produkte Referenz, Referenz und Test sind für beide Zeitpunkte sehr ähnlich, während die Werte der Kontrollformulierung entsprechend niedriger liegen. Für den Clearance-Zeitpunkt zeigen alle Werte eine deutliche Abnahme im Vergleich zu den Uptake-Werten. Die blau markierten Werte zeigen Fälle ohne tatsächliche Clearance, bei denen im Vergleich zum Uptake keine statistisch signifikante Abnahme vorlag. Diese Hautareale wurden nicht in die Berechnung der geometrischen Mittelwerte der Reduktionswerte einbezogen.

Die gemittelten Werte aus Tab. 2 sind zudem grafisch in Abb. 17 dargestellt:

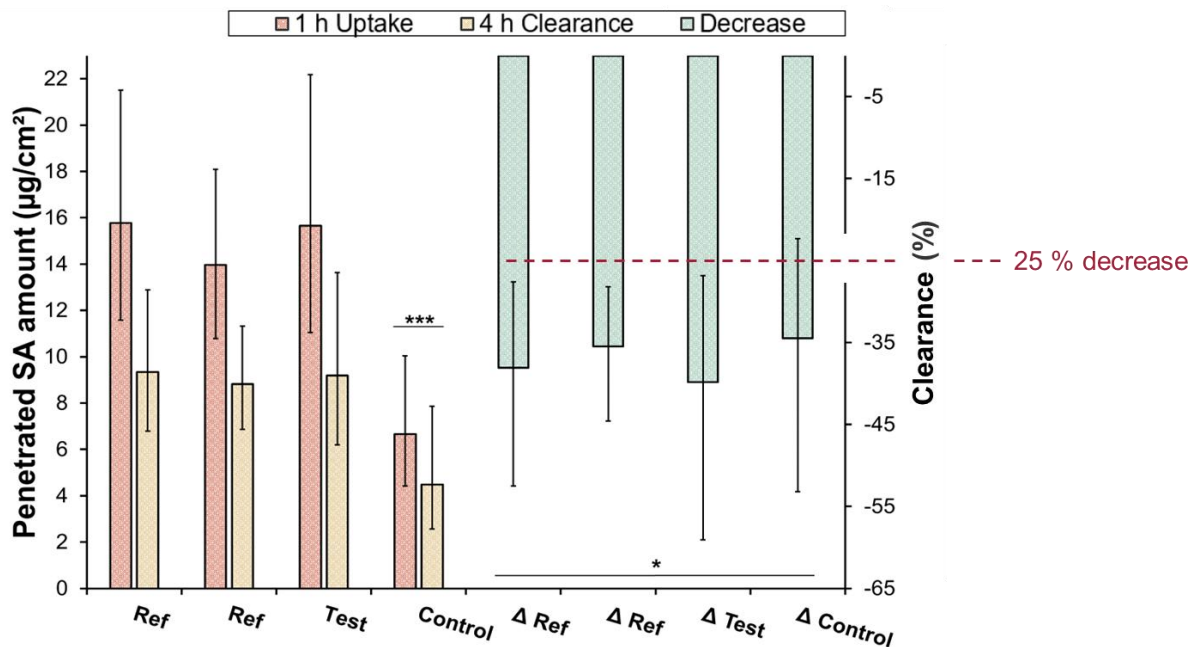


Abb. 17 Geometrische Mittelwerte der penetrierten SA-Mengen bis zu einer SC-Tiefe von $15 \mu\text{m} \pm \text{GSD}$ (links) mit den entsprechenden Reduktionsraten nach der Clearance-Phase (rechts). ($n = 12$ Probanden, 9 Messungen pro Produkt und Zeitpunkt, * $p < 0,05$, *** $p < 0,002$). Aus Link et al. [48].

In Abb. 17 wird hervorgehoben, dass die drei vermeintlich bioäquivalenten Produkte (Ref, Ref und die selbst re-formulierte Testformulierung) für beide Studienzeitpunkte beim Uptake (rot) und bei der Clearance (gelb) auf vergleichbarem Niveau liegen. Dies deutet auf die Bioäquivalenz dieser Produkte hin. Statistisch signifikant niedriger ist das Penetrationsvermögen der Kontrollformulierung. Positiv hervorzuheben ist außerdem die Reduktionsrate durch die Auswaschphase, die bei allen vier getesteten Produkten höher liegt als die von der EMA empfohlene Grenze von 25 % [2].

Die in Tab. 2 dargestellten geometrischen Mittelwerte für jeden Probanden wurden abschließend zur Berechnung der Produkt-zu-Produkt-Verhältnisse sowie der entsprechenden 90 %-KIs verwendet, entsprechend der EMA-Leitlinie „Guideline on quality and equivalence of locally applied, locally acting cutaneous products“ [2] sowie der spezifischen Guideline zur Berechnung der Bioäquivalenz „Guideline on the investigation of“ [56]. Die finalen Ergebnisse der in-vivo CRS-Bioäquivalenzbewertung sind in der Abb. 18 dargestellt:

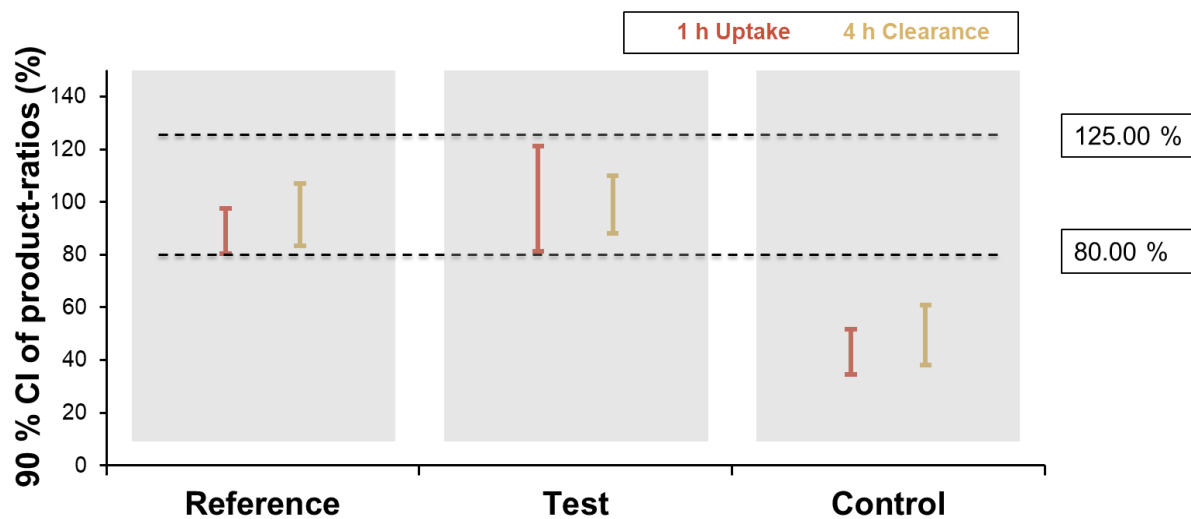


Abb. 18 Re-transformierte 90 %-Konfidenzintervalle der Produkt-zu-Produkt-Verhältnisse der geometrischen Mittelwerte der penetrierten Salicylsäure-Mengen aus den verschiedenen Formulierungen. Eine der beiden Referenzapplikationen diente als Bezugswert für alle Berechnungen. Aus Link et al. [48].

Die EMA verlangt zunächst, dass die 90 %-KIs der Kontroll- zu Referenzformulierung vollständig außerhalb der 80,00 – 125,00 %-Grenzen liegen, um die Fähigkeit der Methode zu zeigen, nicht-bioäquivalente Formulierungen zu erkennen. Im vorliegenden Fall erfüllen die KIs der Kontrollformulierung dieses Kriterium für die in-vivo-Anwendung der CRS-Methode und bestätigen damit erneut die diskriminierende Fähigkeit der Methode.

Die Referenzformulierung wurde zweimal getestet, um ein Verhältnis Referenz vs. Referenz zu berechnen. Die Referenzformulierung wurde hierfür, wie bereits oben beschrieben, zweimal in die Studie aufgenommen, um eine klar bioäquivalente Formulierung aus demselben Behälter mithilfe der CRS-Methode auch quantitativ auf Bioäquivalenz prüfen zu können.

Die KIs liegen dabei vollständig innerhalb des Akzeptanzbereichs, was zeigt, dass die Bioäquivalenz derselben Formulierung korrekt erkannt wird. Zusätzlich liegen die KIs der Testformulierung ebenfalls vollständig innerhalb der 80,00 - 125 %-Grenzen, sodass ihre Bioäquivalenz zur Referenz nachgewiesen werden konnte.

Damit bestätigt die Methode nicht nur die Bioäquivalenz der Testformulierung, sondern liefert Ergebnisse, die konsistent mit den zuvor in der separaten ex-vivo-Studie gewonnenen Erkenntnissen sind (siehe S.31ff und S.33ff). Das Reverse-Engineering der selbst entwickelten Testformulierung war somit ebenfalls erfolgreich.

Die numerisch berechneten Ergebnisse, die in Tab. 1 bis Abb. 18 grafisch veranschaulicht sind, werden in der abschließenden zusammenfassenden Tab. 3 dargestellt:

Tab. 3 Zusammenfassender Bericht der in-vivo CRS-Humanstudie zu den Bioäquivalenzanforderungen der EMA. Aus Link et al. [48].

Parameter	Product	Ref	Ref	Test	Control
Geometric mean of penetrated SA amount					
Uptake ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) $\times/\pm$ GSD factor		15.78 $\times/\pm$ 1.36	13.97 $\times/\pm$ 1.30	15.65 $\times/\pm$ 1.42	6.66 $\times/\pm$ 1.51
Clearance ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) $\times/\pm$ GSD factor		9.34 $\times/\pm$ 1.38	8.82 $\times/\pm$ 1.28	9.19 $\times/\pm$ 1.48	4.49 $\times/\pm$ 1.75
Geometric mean of Clearance decrease (%) $\times/\pm$ GSD factor		38.07 $\times/\pm$ 1.38	35.47 $\times/\pm$ 1.26	39.84 $\times/\pm$ 1.48	34.48 $\times/\pm$ 1.54
Geometric mean of EMA within-subject variability					
Uptake (%) $\times/\pm$ GSD factor		28.55 $\times/\pm$ 1.35	18.65 $\times/\pm$ 1.69	23.53 $\times/\pm$ 1.74	26.44 $\times/\pm$ 1.41
Clearance (%) $\times/\pm$ GSD factor		22.66 $\times/\pm$ 1.58	19.46 $\times/\pm$ 1.31	25.95 $\times/\pm$ 1.57	32.80 $\times/\pm$ 1.69
EMA inter-subject variability					
Uptake (%)		42.90	36.01	47.60	52.66
Clearance (%)		39.64	31.89	50.99	73.81
90 % bioequivalence CI of ratios of the geometric means					
Uptake			80.43 - 97.51 %	81.20 - 121.25 %	34.49 - 51.63 %
Clearance			83.21 - 107.02 %	88.03 - 109.98 %	38.01 - 60.76 %
90 % CI of Clearance_{product}/Uptake_{reference} ratios			0.50 - 0.63	0.49 - 0.69	0.22 - 0.37
90 % CI of Clearance_{product}/Uptake_{product} ratios		0.54 - 0.65	0.59 - 0.68	0.50 - 0.69	0.57 - 0.80

Abschließend lässt sich festhalten, dass alle von der EMA geforderten Kriterien erfüllt wurden: Sowohl für den Uptake- als auch Clearance-Zeitpunkt, lagen die 90 %-KIs der bioäquivalenten und vermeintlich bioäquivalenten Produkte vollständig innerhalb des Akzeptanzbereichs von 80,00 - 125,00 %, während die Kontrollformulierung vollständig außerhalb dieses Bereichs lag. Zusätzlich wurde in den in-vivo Versuchen nach der Clearance ein Rückgang von 34,48 bis 39,84 % beobachtet. Damit wurde die geforderte Abnahme von mindestens 25 % deutlich erreicht.

Darüber hinaus lagen die 90 %-KIs der Verhältnisse der geometrischen Mittelwerte der wiedergefundenen Wirkstoffmengen bei der Gegenüberstellung von Clearance und Uptake vollständig unterhalb von 1,0. Dies bestätigt die beobachtete Reduktionsrate sowohl beim Vergleich der Clearance Werte eines Produkts mit den Uptake-Werten der Referenz als auch beim Verhältnis von Clearance zu Uptake innerhalb desselben Produkts. Auch dieses Kriterium stellt eine Anforderung der EMA-Leitlinie dar [2].

Da sämtliche Kriterien der EMA (siehe Abb. 1) in der CRS-in-vivo-Studie erfüllt wurden, konnten die Voraussetzungen für die Bestätigung der Bioäquivalenz der geprüften Produkte als erfüllt angesehen werden. Die Ergebnisse bestätigen insbesondere die Eignung der CRS-Methode für die in-vivo Anwendung.

Wie bereits oben erwähnt, wurde die CRS-Methode zuvor noch nie in einer derart EMA-Leitlinien konformen dermalen in-vivo Bioäquivalenzstudie angewendet. Durch die erstmalige Durchführung einer solchen Studie konnte daher nicht nur die Eignung der Methode nachgewiesen werden, sondern es wurde darüber hinaus ein Empfehlungskatalog in Form eines Flussdiagramms für die direkte Anwendung und Durchführung zukünftiger Studien entwickelt und veröffentlicht, siehe Abb. 19:

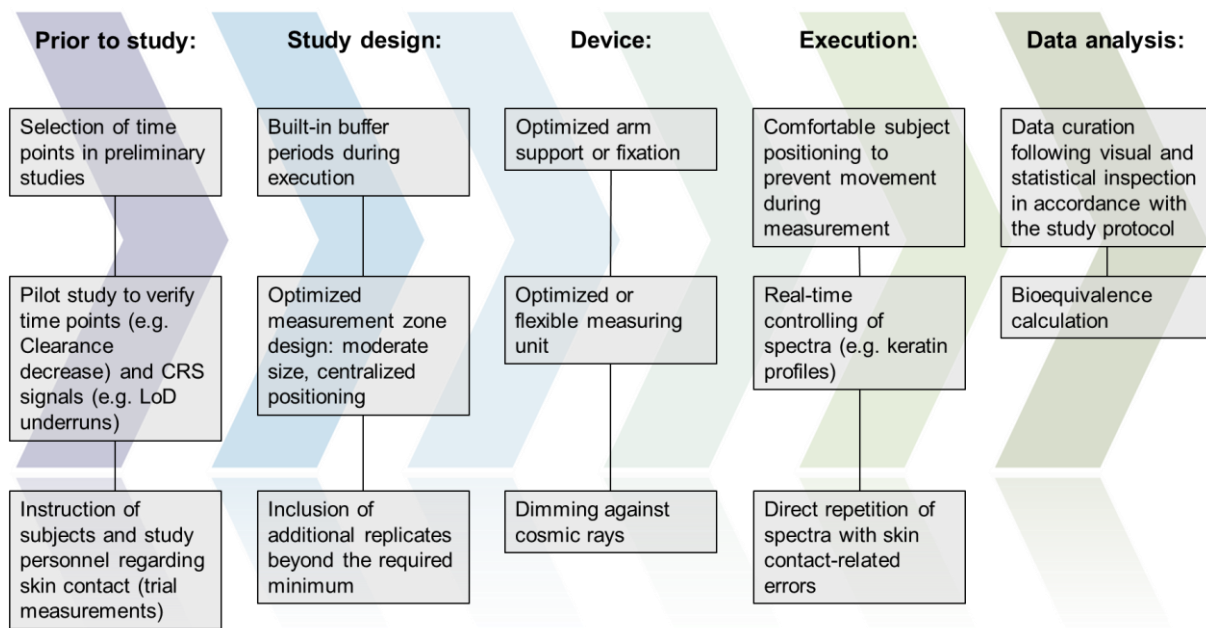


Abb. 19 Empfohlener und optimierter Arbeitsablauf zur in-vivo CRS-Bioäquivalenzstudiendurchführung. Aus Link et al. [48].

Der in Abb. 19 dargestellte und veröffentlichte Empfehlungskatalog soll zukünftige Anwendungen und Durchführungen von CRS-Studien erleichtern und optimieren:

Zunächst sollten vor Studienbeginn in Vorversuchen geeignete Messzeitpunkte definiert werden. Dabei ist insbesondere zu prüfen, ob sich der gewählte Uptake-Zeitpunkt im Gleichgewichtszustand zwischen Aufnahme des Wirkstoffs in das SC und Abgabe in tiefere Hautschichten befindet und ob sich der gewählte Clearance-Zeitpunkt zur ausreichenden Erfassung der Auswachphase (z. B. Abnahme der Wirkstoffkonzentration um mindestens 25 %) eignet, sowie die CRS-Signale für alle Prüfprodukte ausreichend über der Nachweisgrenze liegen. Zudem sollten sowohl Probanden als auch das Studienpersonal auf die Sicherstellung des Hautkontakts zum Messfenster und in Bezug auf die Messbedingungen geschult werden.

Im Rahmen des Studiendesigns sollten während der Durchführung ausreichende Pufferzeiten eingeplant werden. Darüber hinaus ist eine optimierte Messzonengestaltung mit moderater Größe und zentraler Positionierung anzustreben, um ein mögliches Verwischen der unabgedeckten halbfesten Formulierungen zu vermeiden. Die Einbeziehung zusätzlicher Replikate über das von der EMA geforderte Minimum von zwei Replikaten hinaus kann die Aussagekraft der Daten erhöhen und sicherstellen, dass ein möglicher Ausschluss einzelner Replikate nicht zu einer Nichteinhaltung der regulatorischen Anforderungen führt.

Bezüglich der Gerätevorbereitung ist auf eine stabile und komfortable Fixierung des Messarms (z.B. durch eine Armauflage) zu achten; ergänzend kann eine flexible Messeinheit zur Verbesserung des Messkomforts entwickelt werden. Zusätzlich sollte eine Abschirmung gegen externe Störeinflüsse wie kosmische Strahlung berücksichtigt werden.

Während der Studiendurchführung ist eine bequeme Lagerung des Messarms der Probanden entscheidend, um Bewegungsartefakte zu minimieren. Die Messungen sollten in Echtzeit kontrolliert werden, beispielsweise anhand von Keratinprofilen, und bei erkennbaren Fehlern unmittelbar wiederholt werden.

Im Rahmen der Datenauswertung sollten die erhobenen Daten gemäß Studienprotokoll sowohl visuell als auch statistisch geprüft und kuratiert werden. Abschließend kann die Berechnung der Bioäquivalenz auf Basis der qualitätsgesicherten Datensätze unter vollständiger Einhaltung der Anforderungen der EMA erfolgen.

Zwischenfazit Arbeitspaket:

In dieser Humanstudie wurde die Eignung der CRS-Methode für aussagekräftige in-vivo Bioäquivalenzprüfungen am Beispiel von Formulierungen mit Salicylsäure untersucht. Die erfolgreiche Durchführung der Studie mit 12 gesunden Probanden, vollständig konform zur aktuellen EMA-Leitlinie [2], unterstreicht die Effizienz und Zuverlässigkeit des CRS-Ansatzes. Gleichzeitig wird das Potenzial der Methode deutlich, den regulatorischen und logistischen Aufwand für kleinere und mittlere Generikahersteller deutlich zu reduzieren.

Die Ergebnisse bestätigen, dass CRS eine überlegene Methode für die dermale Bioäquivalenzbewertung darstellt, sofern der Wirkstoff Raman-aktiv ist. Im Vergleich zur etablierten TS-Methode, die schwer zu standardisieren, ressourcenintensiv und zeitaufwendig ist und deren eher ungleichmäßige Abnahme des SCs [57] die berechneten Wirkstoffkonzentrationen beeinflussen kann, bietet CRS mehrere Vorteile: Sie ist nicht-invasiv, gut standardisierbar, ressourcenschonend und ermöglicht eine hochauflösende, quantitative Bestimmung der Wirkstoffverteilung in jeder gewünschten SC-Tiefe [58].

Die erzielten Schlüsseldaten der Bioäquivalenzstudie belegen, dass CRS nicht nur die Bioäquivalenz zwischen Produkten zuverlässig bestätigt, sondern auch über die notwendige diskriminierende Fähigkeit verfügt, valide und robuste Daten zu liefern. Damit liefert diese Studie eine solide Grundlage für die Etablierung von CRS als überlegene, regulatorisch anerkannte Standardmethode für dermale Bioäquivalenzprüfungen, mit Perspektive auf zukünftige Leitlinienaktualisierungen. Mit dem Projekt konnte eine bisher bestehende Lücke in der Literatur geschlossen werden, da bis dato noch keine leitlinienkonforme Studie durchgeführt wurde, bei der die Vorgaben für die Durchführung einer regulatorischen TS-Studie direkt auf die CRS-Methodik übertragen wurde.

5.6.1 Zusätzliche Untersuchung

Neben der zentralen Fragestellung zur Eignung der CRS-Methode im in-vivo Rahmen für die Bestimmung der dermalen Bioäquivalenz von Prüfprodukten wurden zusätzliche, sekundäre Fragestellungen untersucht. Eine davon war, ob sich anhand der in der Studie generierten Daten bei den 12 gesunden Probanden eine Differenzierung zwischen niedrig- und hochpenetrierenden Individuen vornehmen lässt.

Zur Analyse wurde zunächst für jedes Produkt die maximal penetrierte kumulierte Wirkstoffmenge über alle Probanden als Referenzwert (100 %) festgelegt. Die individuellen Penetrationswerte der übrigen Probanden wurden anschließend relativ zu diesem Maximalwert berechnet. Die daraus resultierenden prozentualen Werte wurden über alle Produkte gemittelt und sind in Abb. 20 in absteigender Reihenfolge für beide Studienzeitpunkte dargestellt.

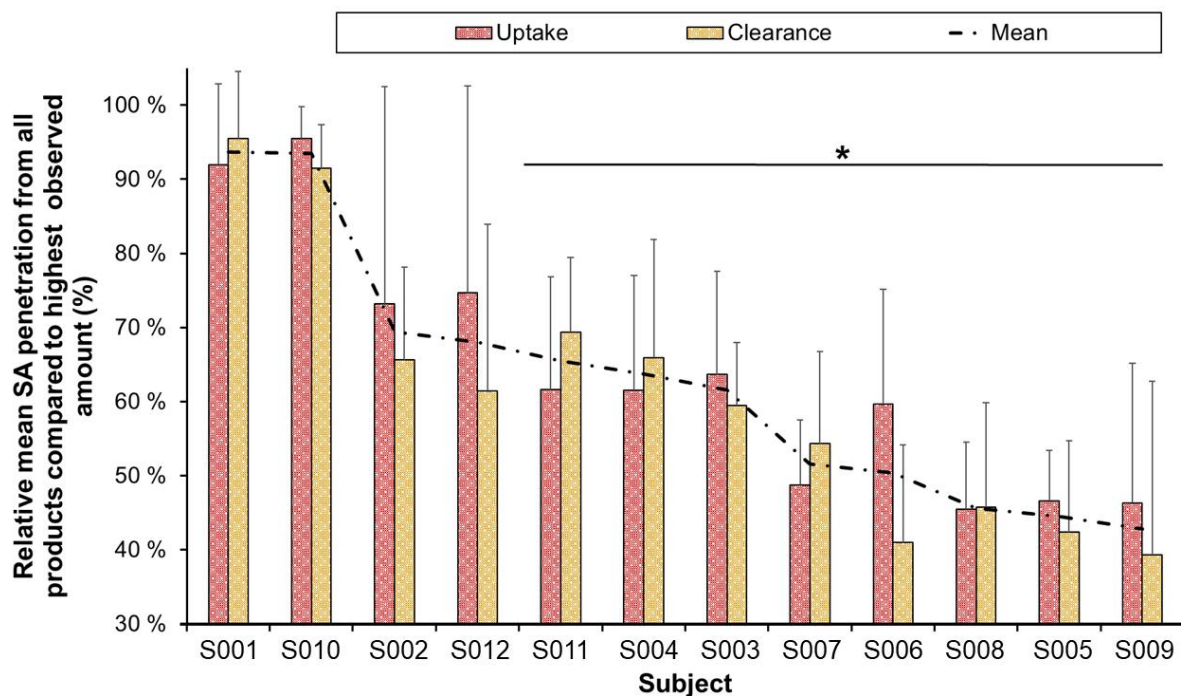


Abb. 20 Vergleich niedrig- und hochpenetrierender eingeschlossener Probanden aus der in-vivo-CRS-Studie. Dargestellt sind die gemittelten relativen, in das SC penetrierten Salicylsäure-Mengen für alle vier applizierten Produkte (Ref, Ref, Test, Kontrolle) im Vergleich zwischen insgesamt 12 Probanden. Für jedes Produkt, jeden Probanden und beide Messzeitpunkte wurden die penetrierten SS-Mengen relativ zum jeweils höchsten gemessenen Wert aller Probanden normiert. Anschließend wurden die vier prozentualen Vergleichswerte für jeden Probanden gemittelt und graphisch dargestellt. ($n = 4$ Produkte, Mittelwert + SD, $p < 0,05$).

Aus Abb. 20 wird ersichtlich, dass die Probanden S002 und S012 aufgrund der relativ hohen Varianz der penetrierten Wirkstoffmengen in ihrem SC nur schwer einzuordnen sind. Werden diese beiden Probanden ausgeschlossen, lassen sich insbesondere die hochpenetrierenden Probanden S001 und S010 statistisch signifikant ($p < 0,05$) von den mittel- bis niedrigpenetrierenden Probanden unterscheiden. Daraus lässt sich schließen, dass die Hautbarriere gegenüber der Penetration von Salicylsäure bei S001 und S010 am geringsten ausgeprägt war. Die CRS-Methode eignet sich somit zur groben Einstufung der Penetrationsleistung einzelner Probanden.

Aufgrund der begrenzten Stichprobengröße von 12 Probanden lassen sich jedoch keine belastbaren, generalisierbaren Schlussfolgerungen ableiten. Die beobachtete Variabilität deutet vielmehr darauf hin, dass die Hautbarriere bzw. die Penetrationsfähigkeit näherungsweise einer erwartbaren Normalverteilung folgt. Hinweise auf einzelne Probanden, die deutlich außerhalb dieser Verteilung liegen und die Studienergebnisse maßgeblich verzerren könnten, ergeben sich aus den vorliegenden Daten nicht. Dennoch sind weiterführende Untersuchungen mit größeren Kollektiven erforderlich, um diese Beobachtungen zu bestätigen.

5.7 Arbeitspaket 7: Veröffentlichung und Präsentation der gewonnenen Ergebnisse

Ziel:

Nach erfolgreicher Etablierung, Validierung und dem Nachweis der Eignung der CRS-Methode im Vergleich zur Tape-Stripping-Methode sollten die erzielten Ergebnisse systematisch der Fachöffentlichkeit zugänglich gemacht werden. Vorgesehen waren Publikationen in einschlägigen wissenschaftlichen Fachjournals sowie die Präsentation der Resultate auf nationalen und internationalen Fachtagungen in Form von Postern und Vorträgen.

Zwischenfazit Arbeitspaket:

Das Ziel wurde erreicht. Das übergeordnete Projektziel - der Nachweis der Eignung der CRS-Methode für dermale Bioäquivalenzuntersuchungen - konnte insbesondere durch das Erreichen des zentralen Meilensteins einer EMA-konformen in-vivo-Humanstudie erfolgreich umgesetzt werden; diese Ergebnisse wurden bereits publiziert, siehe [48] und „11.2.2 Weitere Veröffentlichungen“.

Darüber hinaus wurden die im Projekt generierten Daten auf zahlreichen wissenschaftlichen Kongressen präsentiert (siehe S.61). Hierzu zählen Präsentationen auf der Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft (2023), der DPhG-Vortragsreihe (2025), dem SkinForum (2024 & 2025), der Jahrestagung der Gesellschaft für Dermopharmazie (2025), der 1st APV Emulsion Experts Conference (2025) sowie dem PBP World Meeting (2026), siehe auch S.61. Zwei der Beiträge wurden von den jeweiligen wissenschaftlichen Komitees der Konferenzen ausgezeichnet, was die fachliche Qualität und Relevanz der Ergebnisse zusätzlich unterstreicht.

Weiterführende Veröffentlichungen sind in Vorbereitung und im Ergebnistransferkonzept verankert (siehe S.65). Diese umfassen unter anderem die detaillierte Darstellung der ex-vivo-Daten zum Reverse-Engineering der Salicylsäure-haltigen Testformulierung einschließlich der Untersuchung relevanter Penetrationsfaktoren, den Vergleich von Tape-Stripping- und CRS-Ergebnissen an Schweine- und Humanhaut für Salicylsäure sowie die ex-vivo-Ergebnisse zu Diclofenac.

Eine Übersicht der bisherigen Publikationen und Kongressbeiträge ist beigefügt (siehe S.61).

5.8 Arbeitspaket 8: Fortlaufende Dokumentation und Berichterstattung

Ziel:

Die Ergebnisse der Versuche wurden fortlaufend protokolliert. Die Ergebnisse wurden jährlich in Form eines Zwischen- bzw. Abschlussberichts zusammengefasst und dem projektbegleitenden Ausschuss vorgelegt. Daneben wurden, wie unter Arbeitspaket „5.7 Arbeitspaket 7: Veröffentlichung und Präsentation der gewonnenen Ergebnisse“ dargestellt, die Ergebnisse der Fachöffentlichkeit zugänglich gemacht. Des Weiteren erfolgte eine halbjährliche Präsentation und Diskussion der Ergebnisse im Rahmen der Treffen des projektbegleitenden Ausschusses.

Zwischenfazit Arbeitspaket:

Die Dokumentation sowie die Berichterstattung wurden wie beschrieben durchgeführt. Das Ziel wurde erreicht.

6. Erweiterung des Stands von Wissenschaft und Technik während des Projektzeitraums

Während des Projektzeitraums wurden sowohl durch unsere Arbeitsgruppe als auch durch andere Forschungsgruppen wesentliche Erkenntnisse zur Hautpenetrationsanalytik und zur Anwendung der konfokalen Raman-Spektroskopie (CRS) für dermale Bioäquivalenzuntersuchungen gewonnen. Diese Ergebnisse sind vor dem Hintergrund der seit April 2025 wirksamen EMA-Leitlinie [2] von besonderer Relevanz.

6.1 Kritik am alten EMA-Leitlinienentwurf

Noch bevor die EMA die aktualisierte Fassung der Leitlinie veröffentlichte, wurde der seit 2018 vorliegende Leitlinienentwurf [1] von Eichner et al. [59] kritisch hinterfragt. In der entsprechenden Publikation wurde das vorgeschlagene IVPT-Studienprotokoll des Entwurfs experimentell überprüft, indem zwei bereits klinisch als bioäquivalent zugelassene Mometasonfuroat-Produkte strikt gemäß den EMA-Vorgaben getestet wurden. Trotz nachgewiesener therapeutischer Äquivalenz konnte mit dem vorgesehenen IVPT-Design keine konsistente statistische Bioäquivalenz gezeigt werden, was grundsätzliche Zweifel an der Eignung des Protokolls zur Ableitung regulatorischer Entscheidungen aufwarf. Kritisch diskutiert wurden insbesondere die wissenschaftlich nicht ausreichend begründete Mindestanzahl von ≥ 12 Hautdonoren sowie die Beschränkung auf lediglich zwei Replikate pro Donor, da die ausgeprägte intraindividuelle Variabilität die statistische Aussagekraft deutlich beeinträchtigte. Darüber hinaus wurde die regulatorisch geforderte Kontrolle als methodisch fragwürdig bewertet. Die stärkere Berücksichtigung des Wirkstoffgehalts am pharmakologischen Wirkort sowie eine klar definierte, statistisch fundierte Studienplanung wurde gewünscht. Insgesamt zeigte die Analyse, dass zentrale Parameter des Entwurfs überarbeitet und wissenschaftlich besser untermauert werden sollten, um eine valide und praktikable Bioäquivalenzbewertung zu gewährleisten.

6.2 Aktualisierung der EMA-Leitlinie zur dermalen Bioäquivalenz

Die aktualisierte Leitlinie [2], welche seit April 2025 in Kraft ist, etabliert erstmals einen klar strukturierten, entscheidungsbaumbasierten Ansatz zur Bioäquivalenzprüfung lokal angewendeter, lokal wirksamer Dermatika.

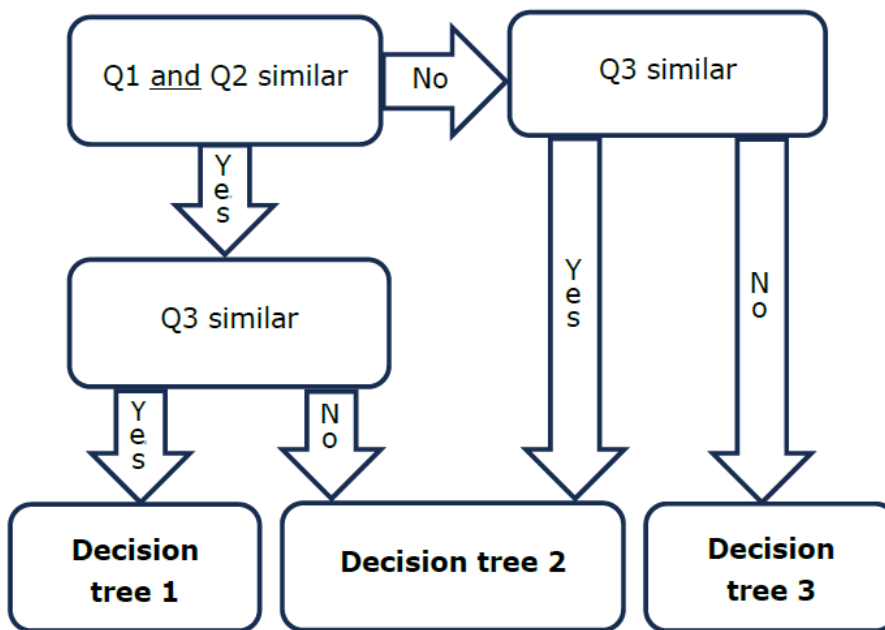


Abb. 21 Neuer Entscheidungsbaum der EMA für das Vorgehen beim Nachweis dermalen Bioäquivalenz, abhängig von der Komplexität der Formulierung [2].

Ziel ist es, abhängig von der Komplexität der jeweiligen Formulierung, einen optionalen regulatorischen Weg zu eröffnen, der es ermöglicht, auf klassische klinische Endpunktstudien zu verzichten und die Äquivalenz stattdessen über wissenschaftlich fundierte, stufenweise Prüfstrategien nachzuweisen. Damit wird ein Paradigmenwechsel eingeleitet: weg von kostenintensiven und oft schwer interpretierbaren klinischen Endpunkten hin zu mechanistisch begründeten, quantitativen Vergleichsmethoden.

Ausgangspunkt jeder Bewertung sind die Q1-, Q2- und Q3-Kriterien. Q1 beschreibt die qualitative Zusammensetzung (identische Wirk- und Hilfsstoffe), Q2 die quantitative Zusammensetzung (vergleichbare Mengenanteile), sodass bei Erfüllung beider Kriterien pharmazeutische Äquivalenz auf Formulierungsebene vorliegt. Q3 bewertet darüber hinaus die physikochemischen und mikrostrukturellen Eigenschaften - etwa Rheologie, Polymorphie, Viskosität oder die Wirkstoffverteilung in der Matrix. Diese Parameter sind entscheidend, da sie Freisetzung und Hautpenetration unmittelbar beeinflussen. Erst wenn Q1-Q3 ausreichend vergleichbar dokumentiert sind, wird der stufenweise funktionelle Äquivalenznachweis eingeleitet.

Schritt 1 umfasst die Bestätigung der pharmazeutischen Äquivalenz in Kombination mit einem In Vitro Release Test (IVRT). Hier wird untersucht, ob die Wirkstofffreisetzung zwischen Test- und Referenzprodukt

vergleichbar ist. Bei einfachen, homogenen oder einphasigen Systemen kann dieser Nachweis bereits ausreichen, um therapeutische Äquivalenz zu begründen, sodass keine weiteren in-vivo-Untersuchungen erforderlich sind.

Sind die Daten aus Schritt 1 aufgrund erhöhter Formulierungskomplexität - beispielsweise bei multiphasischen Systemen, Einsatz von Penetrationsverbesserern oder relevanten Q3-Unterschieden - nicht ausreichend, folgt Schritt 2 mit permeationskinetischen Untersuchungen. Der In Vitro Permeation Test (IVPT) quantifiziert die Wirkstoffpassage durch ex-vivo Humanhaut und liefert Parameter wie Flux und Gesamtpermeation. Ergänzend oder alternativ kann TS eingesetzt werden. Diese in-vivo-Methode erlaubt die Quantifizierung des Wirkstoffs im SC und damit eine dermato-pharmakokinetische Bewertung der lokalen Exposition. TS wird insbesondere dann relevant, wenn der geplante Wirkort des Dermatikums im SC ist und die Wirkstoffkonzentration in der oberen Hautschicht als Surrogat für die therapeutische Wirkung angesehen wird oder wenn IVPT-Daten allein keine ausreichende regulatorische Sicherheit bieten. Es fungiert somit als Brücke zwischen rein in vitro generierten Daten und klinischer Wirksamkeit.

Allerdings ist die TS-Methode mit einem hohen zeitlichen Aufwand, einer nur begrenzt standardisierbaren Durchführung sowie einem minimalinvasiven Charakter verbunden. Trotz der regulatorischen Akzeptanz seit Inkrafttreten der Leitlinie wurde bislang kein neues bioäquivalentes dermales Generikum ausschließlich auf diesem Weg zugelassen. Gleichwohl besteht seitens der pharmazeutischen Industrie ein erhebliches Interesse an alternativen Methoden, insbesondere vor dem Hintergrund, dass klassische klinische Endpunktstudien häufig sehr große Probandenzahlen und erhebliche Ressourcen erfordern.

Vor diesem Hintergrund gewinnt die konfokale Raman-Spektroskopie zunehmend an Bedeutung. CRS ermöglicht eine nicht invasive, hochauflösende und vergleichsweise schnell durchführbare Quantifizierung von Wirkstoffkonzentrationsprofilen in der Haut bei gleichzeitig guter Standardisierbarkeit. Sollte diese Methodik zukünftig regulatorisch in vergleichbarer Weise wie TS anerkannt werden, könnte sie eine überlegene Alternative für dermale Bioäquivalenzuntersuchungen darstellen. Das im Projekt verfolgte Forschungsprojekt adressiert somit eine hochaktuelle regulatorische Fragestellung und besitzt unmittelbare Relevanz für die industrielle Entwicklung bioäquivalenter topischer Arzneimittel.

6.3 Durchführende Forschungsgruppe zur Vergleichbarkeit von TS und CRS sowie der Anwendung beider Methoden für Bioäquivalenzuntersuchungen

Zentrale neue Beiträge der durchführenden Forschungsgruppe untermauern die Eignung der CRS-Methode für dermale Penetrations- und Bioäquivalenzuntersuchungen, zeigen aber auch bisherige methodische Limitationen in Bezug auf regulatorische Anforderungen auf. In der ersten Publikation von Gaiser und Lunter [50] wurde CRS direkt mit der etablierten TS-Methode verglichen, indem als Arzneimittel zugelassene Ketoprofen-haltige dermatologische Formulierungen nacheinander ex-vivo auf Schweinehaut mittels CRS und TS analysiert wurden. Die Ergebnisse zeigten, dass beide Methoden vergleichbare Mengen an API detektieren und auch vergleichbare Bioäquivalenzbewertungen lieferten, ohne signifikante Unterschiede zwischen den beiden Messmethoden. Dies belegt, dass CRS (zumindest im ex-vivo-Setting) quantitativ valide Penetrationsprofile erfasst und für Bioäquivalenztests geeignet ist.

Eine weitere Publikation von Gaiser und Lunter [46] erweiterte diesen Ansatz um den Modellarzneistoff Koffein und untersuchte zusätzlich den Einfluss eines Penetrationsverstärkers (1,2-Pentanediol). Auch hier korrelierten CRS- und TS-Ergebnisse sehr gut hinsichtlich der detektierten Arzneistoff-Mengen und Bioäquivalenzbewertungen, was die Reproduzierbarkeit von CRS-Messungen unter variierten Formulierungs- und Inkubationsbedingungen bestätigte und die ursprüngliche Publikation von Kourbaj et al. [60] zur Koffein-Penetration erweitert. Darüber hinaus konnte mittels CRS der Wirkmechanismus des Penetrationsverbesserers näher charakterisiert werden, z. B. durch Beobachtungen zu Effekten auf die Lipidstruktur des SC und auf die Wasserbindung in der Haut. Diese Arbeit stützt die Aussage, dass CRS nicht nur ein alternatives Messprinzip darstellt, sondern darüber hinaus mechanistische Einblicke liefern kann.

Trotz dieser positiven CRS-TS-Korrelationsstudien blieben mehrere Fragestellungen bestehen: Beide Arbeiten basieren ausschließlich auf ex-vivo-Versuchen mit Schweinehaut und meist kleinen Stichprobenumfängen, die den Anforderungen der EMA-Leitlinie an in-vivo-Bioäquivalenzstudien mit min. 12 gesunden Probanden nicht genügen. Insbesondere fehlen systematische in-vivo-Daten mit humaner Haut in ausreichender Probandenzahl, um die regulatorischen Vorgaben wirkungsvoll zu adressieren.

Gerade vor diesem Hintergrund gewinnt unser eigenes Projekt an Bedeutung: Durch die Durchführung einer in-vivo-Bioäquivalenzstudie gemäß EMA-Leitlinien [2] mit definierten Messzeitpunkten und der erforderlichen Probandenzahl konnten wir zeigen, dass CRS nicht nur ex-vivo, sondern auch in-vivo valide Penetrationsprofile erfasst und Bioäquivalenzanalysen ermöglicht. Diese Daten sind essentiell, um die bisherigen ex-vivo-Belege in regulatorisch relevanten Kontext zu überführen und CRS als standardisierte, nicht invasive Alternative zur klassischen TS-Methode zu etablieren. Insgesamt demonstrieren die vorliegenden Studien den hohen methodischen Wert von CRS, aber auch die Notwendigkeit, die Methodik im Rahmen repräsentativer in-vivo-Bioäquivalenzstudien weiter zu validieren - ein Ziel, das im eigenen Projekt erfolgreich adressiert wurde.

6.4 Nico et al. zur Verbesserung der quantitativen CRS-Methodik

Das von Caspers etablierte Vorgehen bei der CRS-Kalibrierung zur quantitativen Bestimmung von Wirkstoffkonzentrationen im SC [49] wurde durch die Publikation von Nico et al. [61] entscheidend erweitert. Während Caspers die grundsätzliche in-vivo-Quantifizierbarkeit von penetrierten Substanzen demonstrierte, liefert Nico erstmals eine systematische Bestimmung von Nachweis- (LoD) und Bestimmungsgrenzen (LoQ) für topisch applizierte Wirk- und Hilfsstoffe unter regulatorisch relevanten Bedingungen. Für in einer Gerätebibliothek hinterlegte Substanzen - wie im eingesetzten RiverD-System - stehen damit validierte Detektionsgrenzen zur Verfügung. Dies erhöht die quantitative Sicherheit, verbessert die Reproduzierbarkeit und stärkt die regulatorische Anschlussfähigkeit der CRS als nicht invasive, standardisierbare Alternative für dermale Bioäquivalenzuntersuchungen.

6.5 Zusätzliche Studien zur CRS-Anwendung für Bioäquivalenzuntersuchungen

In den jüngsten Untersuchungen zur Anwendung der CRS für dermale Penetrations- und Bioäquivalenzuntersuchungen liefern mehrere Studien wichtige neue Erkenntnisse. Winn et al. [62] zeigten in einer in-vivo-Studie mit Tranexamsäure, dass CRS die Wirkstoffpenetration zu verschiedenen

Aufnahmezeitpunkten zuverlässig erfassen kann. Die Methode ermöglichte die quantitative Analyse der Wirkstoffverteilung im SC und erwies sich als ausreichend empfindlich.

Iliopoulos et al. [63] erweiterten diese Erkenntnisse, indem sie die Bioäquivalenz zweier kommerzieller Ibuprofen-Gele untersuchten. Sowohl IVPT-Experimente mit finiter Dosierung als auch CRS-Analysen zeigten vergleichbare Wirkstoffpermeation und Penetrationswerte im SC für 1 Stunde (uptake) und 2 Stunden nach Applikation (clearance). Diese Ergebnisse bestätigen die Eignung von CRS, quantitative Penetrationsprofile zu liefern und topische Bioäquivalenz in-vivo nachzuweisen. Allerdings wurde die Untersuchung leidlich mit vier Probanden durchgeführt, was nicht den Anforderungen des EMA-Leitlinien-Studiendesigns entspricht und auch der Grund dafür war, dass die Bioäquivalenz der Produkte nicht final bestätigt werden konnte.

Die Arbeiten von Zarmpi und Kollegen erweitern die Perspektive auf CRS weiter. In der ersten Publikation [64] wurde CRS genutzt, um die Aufnahme und Clearance eines Modellpenetranten (4-Cyanophenol) in den lebenden Epidermisschichten unterhalb des SC zu quantifizieren. Die Studie zeigte, dass normalisierte Raman-Signale die Penetration bis 40-80 µm in die Haut messen können und Unterschiede zwischen verschiedenen Vehikeln erkennbar sind. Mit dem zugelassenen Dermatikum Crisaborol konnte die Wirkstoffabgabe in die Hautschichten direkt unterhalb des SC nachgewiesen werden. Diese Arbeit unterstreicht, dass CRS geeignet ist, lokale Verfügbarkeit und potenziell Bioäquivalenz nicht-invasiv zu charakterisieren, wenn angemessene Korrekturverfahren für die tiefenbedingte Signalabschwächung angewendet werden.

In der zweiten Publikation [65] zeigten Zarmpi et al. mit Doxepin als Modellsubstanz, dass selbst bei standardisierten ex-vivo-Schweinehaut Modellen statistische Methoden die Unsicherheiten nur teilweise ausgleichen konnten. Für die Zukunft betonen die Autor:innen daher die Notwendigkeit zusätzlicher, insbesondere in-vivo erhobener Daten, um die zuvor beschriebenen Unsicherheiten weiter zu adressieren und besser charakterisieren zu können.

Schließlich untersuchte Zarmpi et al. [66] die Anwendung von CRS zur Beurteilung der dermalen Bioäquivalenz Metronidazol-haltiger Formulierungen. Zwar war ein endgültiger Bioäquivalenznachweis zwischen den Produkten weiterhin nicht möglich, die Studie verdeutlicht jedoch, dass mit einem angemessen gepowerten Studiendesign in-vivo-Bestätigungen vermutlich realisierbar sind. Gleichzeitig wird betont, dass CRS als nicht-invasive und nicht-destruktive Methode regulatorisch relevante Daten liefern kann, die Entwicklung und Optimierung neuer Formulierungen unterstützen und die Zulassung innovativer oder generischer Produkte beschleunigen könnten.

Diese kumulativen Erkenntnisse bilden die Grundlage für unsere eigene in-vivo-Studie mit Salicylsäure als Wirkstoff. In dieser Studie konnten wir nun erstmals die dermale Bioäquivalenz zwischen Test- und Referenzprodukten erfolgreich nachweisen, unter Einsatz eines Studiendesigns, das den EMA-Leitlinien entspricht. Damit bestätigt unser Projekt die regulatorische Relevanz von CRS für die quantitative Penetrationsanalyse und den Bioäquivalenznachweis topischer Formulierungen, ganz im Sinne des Fazits von Zarmpi et al. [66], dass CRS bei ausreichendem Studiendesign pivotale Daten liefern kann und zudem die Übertragbarkeit von ex-vivo-auf in-vivo Erkenntnisse möglich ist und damit die Zulassung generischer oder optimierter Produkte beschleunigen kann.

6.6 Alternative neuartige Methoden zur Untersuchung der dermalen Bioäquivalenz

Neben der etablierten konfokalen Raman-Spektroskopie (CRS) wurden in den letzten Jahren außerdem mehrere alternative Ansätze untersucht, um die Wirkstoffpenetration in die Haut zu quantifizieren und damit Bioäquivalenz topischer Formulierungen nachzuweisen. Diese Methoden könnten in zukünftigen Aktualisierungen der EMA-Leitlinie [2], ähnlich wie CRS und TS, als ergänzende oder alternative Optionen eingesetzt werden, um teure klinische Endpunktstudien zu ersetzen, abhängig von Komplexität der Formulierung, dem Wirkort und der regulatorischen Fragestellung.

Neben Kuzma et al. [67] untersuchte auch Iliopoulos die Bioäquivalenz von Tazaroten-haltigen Formulierungen mittels Stimulierter Raman-Streuungs-Methode (stimulated Raman scattering; SRS) an ex-vivo Humanhaut. Obwohl Bioäquivalenz zwischen den Produkten gezeigt werden konnte, wurde die Methode noch nicht ausreichend etabliert: Es handelt sich um die erste Studie ihrer Art, jedoch mit ex-vivo Hautproben. Außerdem bedarf es laut Autor weiterer Validierungen über unterschiedliche Wirkstoffe und Formulierungen hinweg. Der Geräteeinsatz ist deutlich aufwendiger als bei herkömmlicher CRS. Die Studie zeigt jedoch die Machbarkeit und legt methodische Grundlagen für die zukünftige Implementierung von SRS in dermalen Bioäquivalenzuntersuchungen.

In der Studie von Moore et al. [68] wurde die Revers-Iontophorese-Methode (RI) vergleichend mit der TS-Methode eingesetzt, um die topische Wirkstoffverfügbarkeit für Salicylsäure und Nikotin zu analysieren. Ex-vivo-Experimente erfolgten an Schweinehaut über 24 h bzw. 8 h, während in-vivo-Messungen am Menschen für 4 h durchgeführt wurden. Die Methode erlaubt die Untersuchung der Wirkstoffpenetration sowohl im Stratum corneum als auch im tieferen lebendigen Hautgewebe. RI zeigt damit großes Potenzial für die Quantifizierung dermalen Bioverfügbarkeit, ist aber bislang nicht standardisiert und benötigt weitere Validierungen, bevor sie für regulatorische Zwecke eingesetzt werden kann.

Tiffner et al. [69] zeigten, dass die Open Flow Mikroperfusion (OFM) Wirkstoffkonzentrationen direkt in tieferen Hautschichten, insbesondere der Dermis, messen kann, beispielhaft demonstriert an Lidocain- und Prilocain-Produkten. Die Methode konnte in der Humanstudie mit 20 Probanden die Bioäquivalenz topischer Produkte nachweisen, ist jedoch invasiv und damit für Probanden unangenehm. OFM bietet Potenzial für zukünftige Studien, ist aber derzeit nur eingeschränkt praxisnah für routinemäßige Bioäquivalenzprüfungen geeignet. Dies liegt insbesondere an der bislang begrenzten Anzahl vergleichender Studien, der als relativ hoch einzustufenden Invasivität sowie der derzeit noch fehlenden regulatorischen Anerkennung der Methode.

Diese alternativen Ansätze ergänzen CRS und TS und würden das methodische Spektrum für dermale Bioäquivalenzuntersuchungen erweitern. Jede Methode hat spezifische Stärken: SRS und CRS erlauben hochauflösende, nicht-invasive Quantifizierung der Wirkstoffpenetration; RI kann Wirkstoffdisposition in tieferen Hautabschnitten über die Zeit messen, während OFM direkte Konzentrationsmessungen in der Dermis ermöglicht. Einschränkungen bestehen jeweils in der Probandenzahl, Standardisierung, technischen Komplexität oder invasiven Charakter. In zukünftigen EMA-Leitlinien könnten solche Methoden situativ als Surrogat für teure klinische Endpunktstudien genutzt werden, insbesondere bei Formulierungen, bei denen in-vitro-Tests allein nicht ausreichend sind.

7. Fazit

Die im Rahmen des IGF-Projekts mit der Nr.: 22947 N/1 durchgeführten Arbeiten leisten einen wesentlichen Beitrag zum aktuellen Stand von Wissenschaft und Technik im Bereich der dermalen Bioäquivalenzprüfung. Die im Voraus geplanten Arbeitspakete wurden alle bearbeitet und das übergeordnete Ziel des Forschungsprojektes mit dem Thema „Nachweis der Eignung der konfokalen Raman-Mikrospektroskopie zur Durchführung von Bioäquivalenzuntersuchungen von Dermatika“ konnte erreicht werden:

Aufbauend auf den umfangreichen Vorarbeiten der eigenen und internationaler Forschungsgruppen konnte im Projekt ein entscheidender nächster Schritt realisiert werden: Erstmals wurde eine in-vivo-Humanstudie publiziert, in der unter EMA-konformen Bedingungen und mit einer ausreichenden Anzahl gesunder Probanden die dermale Bioäquivalenz mittels konfokaler Raman-Spektroskopie gezeigt werden konnte [48]. Damit wird die bislang überwiegend ex-vivo oder explorativ untersuchte Methodik in einen klar regulatorisch relevanten Kontext überführt. Besonders bedeutsam ist der direkte Vergleich zwischen TS und CRS für die Wirkstoffe Salicylsäure und Diclofenac. In beiden Fällen zeigte sich eine sehr gute Übereinstimmung hinsichtlich der quantifizierten Wirkstoffmengen im SC sowie in der daraus abgeleiteten Bioäquivalenzbewertung. Diese Ergebnisse bestätigen nicht nur die quantitative Leistungsfähigkeit von CRS, sondern auch deren Vergleichbarkeit mit der derzeit regulatorisch akzeptierten Referenzmethode. Gleichzeitig unterstreichen die Ergebnisse das Potenzial von CRS als nicht-invasive, ressourcenschonende und hochauflösende Methode zur Bestimmung der Wirkstoffverteilung im SC [58]. Im Vergleich zum etablierten TS kann CRS eine höhere Standardisierbarkeit [57] sowie eine effizientere Datenerhebung ermöglichen, sofern der jeweilige Wirkstoff Raman-aktive Eigenschaften besitzt. Darüber hinaus könnte der Einsatz von CRS perspektivisch dazu beitragen, kostenintensive klinische Wirksamkeitsstudien mit häufig schwer quantifizierbaren Endpunkten bei der Bioäquivalenzbewertung topischer Arzneimittel zu reduzieren [70-72]. Vor dem Hintergrund der zahlreichen internationalen Publikationen, die in den vergangenen Jahren die methodische Validität, die quantitative Auswertbarkeit und die Anwendbarkeit von CRS für unterschiedliche Wirkstoffe aufgezeigt haben, gewinnen die hier erzielten Ergebnisse besondere Relevanz. Während frühere Arbeiten die wissenschaftliche Machbarkeit überzeugend belegt haben, fehlte bislang der formale Nachweis in einem EMA-konformen in-vivo-Studiendesign mit ausreichend gesunden menschlichen Probanden und entsprechender Bioäquivalenzbewertung. Diese Lücke konnte nun geschlossen werden.

Insgesamt tragen die durchgeführten Untersuchungen wesentlich dazu bei, CRS nicht nur als innovatives Forschungswerkzeug, sondern als realistische Option für regulatorische Bioäquivalenzstudien zu positionieren. Vor dem Hintergrund der aktuellen EMA-Leitlinie [2] und des wachsenden Interesses der Industrie an alternativen, standardisierbaren und nicht-invasiven Methoden erscheint eine zukünftige regulatorische Berücksichtigung der CRS-Methode deutlich wahrscheinlicher als noch vor wenigen Jahren. Kleine und mittelständische Unternehmen könnten bei Aufnahme der CRS-Methode in eine zukünftige aktualisierte Leitlinie aufgrund ihrer vergleichsweise guten Standardisierbarkeit kostengünstiger bioäquivalente Dermatika zur Zulassung bringen und damit zu einer finanziellen Entlastung der Gesundheitssysteme beitragen.

8. Verwendung der Zuwendung

Im Folgenden werden die im Rahmen der Zuwendung angefallenen und finanzierten Ausgaben entsprechend des Finanzierungsplans aufgelistet:

- für Personenmonate des wissenschaftlich-technischen Personals gemäß Beleg über Beschäftigungszeiten (Einzelansatz A.1 des Finanzierungsplans): 16 PM
- für Leistungen Dritter (Einzelansatz C des Finanzierungsplans), in-vivo Raman-Messungen

Alle aus der Zuwendung finanzierten Ausgaben wurden zielgerichtet eingesetzt, um die Durchführung, das erfolgreiche Gelingen sowie den Abschluss des IGF-Projekts mit der Nr. 22947 N/1 und dem Thema „Nachweis der Eignung der konfokalen Raman-Mikrospektroskopie zur Durchführung von Bioäquivalenzuntersuchungen von Dermatika“ sicherzustellen und die im Projekt definierten wissenschaftlichen und technischen Ziele zu erreichen.

9. Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit

Im Rahmen des IGF-Vorhabens Nr. 22947 N/1 mit dem Titel „Nachweis der Eignung der konfokalen Raman-Mikrospektroskopie zur Durchführung von Bioäquivalenzuntersuchungen von Dermatika“ wurden die geplanten Arbeiten in Anlehnung an den Projektantrag durchgeführt und innerhalb des vorgesehenen Zeitrahmens abgeschlossen. Die durchgeführten Untersuchungen waren sowohl notwendig als auch in Umfang und Methodik angemessen, um die bestehende wissenschaftliche und regulatorische Lücke zu schließen.

Ausgangspunkt des Projektes war die Situation, dass trotz zahlreicher internationaler Publikationen zur methodischen Validität und quantitativen Auswertbarkeit der konfokalen Raman-Mikrospektroskopie (CRS) bislang keine pivotalen Daten vorlagen, die den regulatorischen Anforderungen der EMA entsprechen. Insbesondere fehlte der formale Nachweis in einem strikt EMA-konformen in-vivo-Studiendesign mit einer ausreichenden Anzahl gesunder Probanden sowie einer systematischen Bioäquivalenzbewertung. Vor diesem Hintergrund bestand ein klarer Bedarf, die wissenschaftlich bereits vielversprechende Methode in einen regulatorisch belastbaren Kontext zu überführen. Ohne solche Daten ist eine zukünftige Aufnahme der CRS-Methode in eine aktualisierte EMA-Leitlinie nicht realistisch.

Parallel dazu ist die Relevanz des Themas durch die seit April 2025 geltende EMA-Leitlinie [2] weiter gestiegen. Mit der Anerkennung der TS-Methode als Alternative zu klinischen Endpunktstudien wurde ein wichtiger Schritt hin zu standardisierbaren und weniger aufwändigen und ressourcenschonenden Bioäquivalenznachweisen vollzogen. Die CRS-Methode ist jedoch aufgrund der bislang begrenzten Datenlage weiterhin lediglich unterstützend vorgesehen. Genau hier setzte das Projekt an.

Die CRS-Ergebnisse wurden systematisch mit den parallel erhobenen TS-Daten als Goldstandard verglichen, wodurch die Eignung der Methode auch quantitativ belegt werden konnte. Die Untersuchungen umfassten ex-vivo-Studien an Schweine- und Humanhaut sowie eine in-vivo-Studie an gesunden Probanden. Für Salicylsäure wurde ein Testprodukt mittels Reverse-Engineering entwickelt; für beide Wirkstoffe (Salicylsäure und Diclofenac) konnte an identischen Hautproben Bioäquivalenz gezeigt und die diskriminatorische Aussagekraft der Methode bestätigt werden.

Ein wesentlicher Meilenstein war die EMA-konforme in-vivo-Humanstudie zur Bioäquivalenz von Salicylsäure-haltigen Kosmetika, mit der erstmals systematische und regulatorisch verwertbare Daten in einem entsprechenden Studiendesign generiert wurden [48].

Zusammenfassend war die geleistete Arbeit notwendig, um die Diskrepanz zwischen wissenschaftlicher Machbarkeit und regulatorischer Anerkennung zu überbrücken. Sie war angemessen, da sämtliche methodischen Schritte, d.h. von der Etablierung des Goldstandards über die Validierung der neuartigen CRS-Methode an verschiedenen Hautmodellen und mit zwei Wirkstoffen bis hin zur EMA-konformen in-vivo-Studie, konsequent auf das übergeordnete Ziel (Nachweis der Eignung der CRS-Methode) ausgerichtet waren.

Die Arbeiten wurden wie im Projektantrag dargelegt durchgeführt und lagen im vorgesehenen Zeitplan. Die Arbeiten waren notwendig und angemessen.

10. Darstellung des wissenschaftlich-technischen und wirtschaftlichen Nutzens der erzielten Ergebnisse insbesondere für KMU sowie ihres innovativen Beitrags und ihrer industriellen Anwendungsmöglichkeiten

Die im Rahmen des IGF-Vorhabens Nr. 22947 N/1 erzielten Ergebnisse besitzen sowohl wissenschaftlich-technisch als auch wirtschaftlich eine hohe Relevanz. Erstmals konnte die CRS-Methode in einem strikt EMA-konformen Studiendesign mit in-vivo-Probanden systematisch untersucht und im direkten Vergleich mit der Tape-Stripping-Methode als Goldstandard bewertet werden. Damit wurde eine bislang bestehende regulatorische Lücke geschlossen: Während die CRS-Methode in der Literatur vielfach als wissenschaftlich valide beschrieben wurde, fehlten bislang pivotal erhobene, regulatorisch belastbare Daten. Durch die im Projekt generierten Ergebnisse wurde die Grundlage geschaffen, CRS künftig nicht nur als Forschungsinstrument, sondern als potenziell regulatorisch einsetzbare Methode zur dermalen Bioäquivalenzprüfung zu positionieren.

Der innovative Beitrag des Projektes liegt insbesondere in der Überführung einer etablierten analytischen Technologie in einen regulatorisch relevanten Anwendungskontext. Es handelt sich dabei um eine Schritttinnovation im Bereich der Analytik, die geeignet ist, bestehende Entwicklungs- und Zulassungsprozesse für Dermatika perspektivisch effizienter, standardisierbarer und weniger invasiv zu gestalten. Die erfolgreiche Validierung an Human- und Schweinehaut als geeignete Hautmodelle, die Untersuchung zweier Wirkstoffe (Salicylsäure und Diclofenac) sowie die Durchführung einer EMA-konformen in-vivo-Studie [48] stellen wesentliche Meilensteine dar und erhöhen die industrielle Anschlussfähigkeit der Methode deutlich.

Die wirtschaftliche Bedeutung für kleine und mittlere Unternehmen (KMU) ist vor dem Hintergrund der Marktsituation besonders hervorzuheben: Der weltweite Umsatz der pharmazeutischen Industrie wird auf 115,24 Mrd. USD beziffert [3], wovon 13,8 Mrd. USD auf Dermatika entfallen [4]. Der deutsche Pharmamarkt erreichte 2020 ein Volumen von 49,5 Mrd. Euro; Deutschland liegt damit international auf Rang vier hinter den USA, China und Japan [5]. Die deutsche pharmazeutische Industrie produzierte 2019 Waren im Wert von 31,1 Mrd. Euro [7]. Trotz rückläufiger Tendenz sind weiterhin rund 67 % der pharmazeutischen Unternehmen in Deutschland dem KMU-Sektor zuzuordnen [8].

Gerade diese mittelständischen Unternehmen stehen laut Bundesverband der Pharmazeutischen Industrie (BPI) unter erheblichem Wettbewerbs- und Regulierungsdruck. Sie behaupten sich häufig durch Spezialisierung auf Nischenmärkte und bestimmte Indikationsgebiete - hierzu zählen auch Dermatika - sowie durch gezielte Schritttinnovationen [9, 10]. Die im Projekt etablierte CRS-Methodik bietet hier konkrete Ansatzpunkte: Unternehmen können auf validierte Protokolle, publizierte Daten und etablierte Vergleichsmaßstäbe (insbesondere den Abgleich mit der Tape-Stripping-Methode) zurückgreifen.

Dies ermöglicht es, Entwicklungsprojekte - sowohl Neuentwicklungen als auch Weiterentwicklungen bestehender Produkte - effizienter zu gestalten und frühzeitig belastbare Penetrationsdaten zu generieren.

Insbesondere im Kontext der aktuellen EMA-Leitlinie zur Äquivalenz und Qualität kutaner Produkte [2] und der wachsenden regulatorischen Diskussion um alternative, nicht-invasive Methoden ist mit einem anhaltend steigenden Interesse an CRS-basierten Untersuchungen zu rechnen. Tatsächlich erreichen uns seit der Publikation unserer in-vivo-Studie vermehrt Anfragen aus der pharmazeutischen Industrie betreffend der

Durchführung von CRS-Bioäquivalenzuntersuchungen. Sollte die Methode künftig regulatorisch breiter anerkannt werden, könnten KMU bioäquivalente Dermatika potenziell kostengünstiger entwickeln und zur Zulassung bringen. Dies würde nicht nur ihre Wettbewerbsfähigkeit stärken, sondern mittel- bis langfristig auch zu einer Entlastung der Gesundheitssysteme beitragen.

Darüber hinaus ergeben sich industrielle Anwendungsmöglichkeiten auch für Unternehmen der Kosmetikindustrie, die die Penetration kosmetisch aktiver Substanzen wissenschaftlich belegen möchten. Ebenso profitieren spezialisierte Auftragslabore: Da die Anschaffung und Etablierung eines konfokalen Raman-Mikroskops mit hohen Investitionen verbunden ist, werden viele KMU entsprechende Untersuchungen extern vergeben. Die im Projekt entwickelten und publizierten Versuchsprotokolle sowie Validierungsdaten erleichtern diesen Laboren die Implementierung der Methode und schaffen eine belastbare Grundlage für Dienstleistungsangebote im Bereich dermalen Penetrations- und Bioäquivalenzstudien.

Insgesamt leisten die Projektergebnisse damit einen substanziellen Beitrag zur methodischen Weiterentwicklung regulatorisch relevanter Analytik, stärken die Innovationsfähigkeit insbesondere kleiner und mittelständischer Unternehmen und eröffnen konkrete industrielle Anwendungsperspektiven in Pharma- und Kosmetikindustrie.

11. Wissenstransfer in die Wirtschaft

Nachstehend sind sämtliche Aktivitäten aufgeführt, die über die turnusmäßigen halbjährlichen Projektausschusssitzungen sowie die Zwischen- und Jahresberichte hinaus dazu beigetragen haben, die im Projekt erzielten Ergebnisse im Rahmen des IGF Vorhabens Nr.: 22947 N/1 in die Wirtschaft und die Öffentlichkeit zu tragen:

11.1 Konferenzen

Die Ergebnisse wurden/werden auf mehreren internationalen Kongressen in Form von Postern und Vorträgen präsentiert. Zu den Teilnehmenden zählten neben führenden Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftlern auf diesem Forschungsgebiet insbesondere Vertreterinnen und Vertreter kleiner und mittelständischer Unternehmen aus der Pharma- und Kosmetikindustrie:

- 10/2023: DPhG-Jahrestagung, Tübingen - Posterbeitrag: Application of confocal Raman spectroscopy (CRS) for bioequivalence studies of topical products
- 06/2024: 19th SkinForum - Annual Meeting, London, 06/2024 - Posterbeitrag: Feasibility of Confocal Raman Spectroscopy (CRS) for Penetration and Bioequivalence Studies of Topical Products
- 06/2025: 20th SkinForum - Annual Meeting, Berlin - Posterbeitrag & Präsentation: A Pivotal, Dermal, In-Vivo Bioequivalence Study performed by Confocal Raman Spectroscopy (CRS)

(Best Oral Presentation Award)

- 09/2025: 26. GD-Jahrestagung, Tübingen - Posterbeitrag & Präsentation: Confocal Raman Spectroscopy (CRS) as a Key Method: Proof of Suitability for Dermal In-Vivo Bioequivalence Studies

(Hans-Christian-Korting-Nachwuchspreis für Dermopharmazie)

- 02/2026: 1st APV EEC, Frankfurt - Präsentation: Confocal Raman Microscopy (CRM) for Characterization of Cutaneous Emulsions and Semisolids

(Invited Speaker)

- 03/2026: 15th PBP World Meeting on Pharmaceuticals, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, Prag - Posterbeitrag: Demonstrating the Regulatory Suitability of Confocal Raman Spectroscopy (CRS) for In-Vivo Bioequivalence Studies of Topical Products

Vorgesehene Konferenzen:

- 06/2026: 21st SkinForum - Annual Meeting, Malmö – Zwei Posterbeiträge: Advancing Confocal Raman Spectroscopy-Based Assessment of Dermal Bioequivalence: Insights from Two Skin Models in Ex-Vivo Experiments with Salicylic Acid & Ex-Vivo Diclofenac Studies Strengthen CRS-Based Dermal Bioequivalence Assessment
- 09/2026: 27. GD-Jahrestagung, Berlin

11.2 Publikationen

11.2.1 In Fachzeitschriften

Die zentralen und richtungsweisenden Ergebnisse des Projekts, die den wesentlichen Teil des geplanten Projektziels, nämlich die Durchführung einer in-vivo Bioäquivalenzstudie unter Anwendung der neuartigen CRS-Methode, betreffen, wurden bereits publiziert [48]. Die veröffentlichten Daten belegen die Eignung der Methode und stellen zugleich die ersten Ergebnisse dieser Art dar, die im Einklang mit der seit April 2025 geltenden „Guideline on Quality and Equivalence of Locally Applied, Locally Acting Cutaneous Products“ der EMA [2] durchgeführt wurden.

Diese publizierten Daten und Methoden können von der Industrie zur Charakterisierung sowie zur Entwicklung bioäquivalenter Dermatika genutzt werden und somit zur finanziellen Entlastung des Gesundheitssystems beitragen. Im Falle einer Aufnahme der Methode in die nächste Leitlinie könnte deren Anwendung zudem im Rahmen von Zulassungsverfahren regulatorische Relevanz erlangen.

J. Link, C. Heusel, D.J. Lunter: A pivotal, dermal, in-vivo bioequivalence study performed by confocal Raman spectroscopy (CRS), European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, Volume 217, December 2025, <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2025.114891>.

Weitere Publikationen, in denen die im Rahmen des Projekts gewonnenen ergänzenden Daten aufgearbeitet und dargestellt werden, befinden sich in Planung.

11.2.2 Weitere Veröffentlichungen

J. Link, D. Lunter: Feasibility of confocal Raman spectroscopy (CRS) for penetration and bioequivalence studies of topical products, **Poster Abstract Book**, 19th SkinForum - Annual Meeting, London, UK, 2024.

J. Link, C. Heusel, D. Lunter: Konfokale Raman-Spektroskopie (CRS) als Schlüsselmethode - Nachweis der Eignung für dermale In-vivo-Bioäquivalenzstudien, **Abstractband** der 26. GD-Jahrestagung, Tübingen, Deutschland, 2025.

12. Plan zum Ergebnistransfer in die Wirtschaft

12.1 Durchgeführte Transfermaßnahmen (vom Projektstart bis zum Projektende)

Die für den Ergebnistransfer relevanten Maßnahmen während des Vorhabens in Anlehnung an den mit den Antrag eingereichten Plan umfassen die in Tab. 4 aufgeführten Maßnahmen und wurden wie folgt durchgeführt:

Tab. 4 Bearbeiteter Ergebnistransfer in die Wirtschaft während des Vorhabens.

Maßnahme	Ziel	Ort/Rahmen	Zeitraum/Datum
FAH Internetseite	Vorstellung von Projekt und Ergebnissen	Projektvorstellung für die Öffentlichkeit	Laufend ab Projektstart
FAH Geschäftsbericht	Vorstellung von Projekt und Ergebnissen	Projektvorstellung für die FAH-Mitglieder	Laufend ab Projektstart
1. PA-Sitzung (Starttreffen)	Vorstellung der Projektziele, Formulierung von Wünschen und Anforderungen seitens der KMU	Online Diskussion mit den im PA vertretenen KMU	2. Quartal 2023 20.06.2023
DPhG-Jahrestagung, Tübingen (Deutsche Pharmazeutische Gesellschaft)	Vorstellung der Ergebnisse auf einem Kongress, der Pharmazeuten und die pharmazeutische Industrie zusammenbringt.	Posterbeitrag Tübingen	3. Quartal 2023 07. - 10.10.2023
2. PA-Sitzung	Vorstellung der Zwischenergebnisse, weitere Versuchsplanung in Abstimmung mit den KMU	Online Diskussion mit den im PA vertretenen KMU	4. Quartal 2023 13.12.2023
3. PA. -Sitzung	Vorstellung der Zwischenergebnisse, weitere Versuchsplanung in Abstimmung mit den KMU, Führung durch die Forschungsräumlichkeiten, Mittagessen mit Austausch	Vor Ort, Institut für Pharmazie, Tübingen Diskussion mit den im PA vertretenen KMU	2. Quartal 2024 04.06.2024
19th SkinForum - Annual Meeting, London	Vorstellung der Ergebnisse auf einem Kongress, Pharmazeuten, Dermatologen und dermatologisch orientierte pharmazeutische Industrie zusammenbringt.	Posterbeitrag London	2. Quartal 2024 25. - 26.06.2024
4. PA. -Sitzung	Vorstellung der Zwischenergebnisse, weitere Versuchsplanung in Abstimmung mit den KMU	Online Diskussion mit den im PA vertretenen KMU	4. Quartal 2024 09.12.2024
20th SkinForum - Annual Meeting, Berlin	Vorstellung der Ergebnisse auf einem Kongress, Pharmazeuten, Dermatologen und dermatologisch orientierte pharmazeutische Industrie zusammenbringt.	Vortrag & Posterbeitrag Berlin Prämierung	2. Quartal 2025 24. - 25.06.2025
5. PA. -Sitzung	Vorstellung der Zwischenergebnisse, weitere	Online	3. Quartal 2025 09.07.2025

	Versuchsplanung in Abstimmung mit den KMU	Diskussion mit den im PA vertretenen KMU	
26. GD-Jahrestagung (Gesellschaft für Dermopharmazie)	Vorstellung der Ergebnisse auf einem Kongress, der Pharmazeuten, Juristen, Dermatologen und dermatologisch orientierte pharmazeutische sowie kosmetische Industrie zusammenbringt.	Vortrag & Posterbeitrag Tübingen Prämierung	3. Quartal 2025 24. - 25.09.2025
Publikation	Darstellung der Ergebnisse "A pivotal, dermal, in-vivo bioequivalence study performed by confocal Raman spectroscopy (CRS)" zur durchgeführten in-vivo Humanstudie mit dem zentralen Nachweis der Eignung der CRS-Methode	Fachzeitschrift: EJPB (European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics)	4. Quartal 2025 10.10.2025
6. PA. -Sitzung	Abschließende Vorstellung und Zusammenfassung der Projektergebnisse, weitere Diskussion und Interessensgespräche mit KMU, Update zur FAH, Vorträge zur durchführenden Forschungsgruppe, Mittagessen mit Austausch	Vor Ort, Institut für Pharmazie, Tübingen Diskussion mit den im PA vertretenen KMU	4. Quartal 2025 17.12.2025
1st APV EEC (Emulsions Expert Conference), Frankfurt	Vorstellung der Ergebnisse auf einem Kongress, Pharmazeuten, Dermatologen und dermatologisch orientierte pharmazeutische sowie kosmetische Industrie zusammenbringt.	Vortrag Frankfurt	1. Quartal 2026 25. - 26.02.2026
15th PBP World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, Prag	Vorstellung der Ergebnisse auf einem großen internationalen Kongress, der Pharmazeuten und die pharmazeutische Industrie aus aller Welt zusammenbringt.	Posterbeitrag Prag	1. Quartal 2026 23. - 26.03.2026

Die PA-Sitzungen wurden durch erstellte Ergebnisnotizen sowie durch Zwischen- und Jahresberichte komplementiert.

12.2 Geplante Transfermaßnahmen (nach Projektende)

Die für den Ergebnistransfer relevanten Maßnahmen nach Abschluss des Vorhabens sind in Tab. 5 aufgeführt und werden wie geplant durchgeführt werden. Zwei Publikationen, deren Einreichung ursprünglich während der Projektlaufzeit geplant waren, werden in Kürze, d.h. kurz nach Ende der Projektlaufzeit eingereicht. Die Publikation zur in-vivo-Untersuchung der Bioäquivalenz mittels CRS, die ursprünglich nach Ende des Projektzeitraums geplant war, wurde innerhalb des Projektzeitraums publiziert. Alle geplanten Publikationen werden somit eingereicht werden. Es hat sich ausschließlich die Reihenfolge der Einreichung geändert.

Tab. 5 Fortgeschriebener Ergebnistransfer in die Wirtschaft nach Abschluss des Vorhabens.

Maßnahme	Ziel	Ort/Rahmen	Zeitraum/Datum
FAH Internetseite	Vorstellung von Projekt und Schlussbericht	Projektvorstellung für die Öffentlichkeit	Nach Abschluss
Uni Tübingen Internetseite	Vorstellung von Projekt und Schlussbericht	Projektvorstellung für die Öffentlichkeit	Nach Abschluss
Einbindung in akademische Lehre	Darstellung der Möglichkeiten zur Untersuchung der Hautpenetration und dermalen Bioäquivalenz per CRS-Methode	Masterstudiengang Pharmaceutical Sciences and Technologies	Kontinuierlich seit Projektstart
Publikation	Darstellung der innerhalb des Projektes erhobenen ex-vivo Daten zu Bioäquivalenzbestimmung mittels ex-vivo Permeations-, und Penetrationsuntersuchungen: Vergleich konventioneller und CRS-Ergebnisse am Beispiel von Diclofenac-haltigen Fertigarzneimittel	Fachzeitschriften z.B. EJPS, SPP, JRS, JCR, EJPB, PharmInd	Q2 2026
Publikation	Darstellung der Ergebnisse mittels ex-vivo Permeations-, und Penetrationsuntersuchungen: Vergleich konventioneller und CRS-Ergebnisse am Beispiel von Salicylsäure-haltigen Produkten		Q3 2026
Zusätzliche Publikationen	Darstellung der innerhalb des Projektes erhobenen ex-vivo Daten zum Reverse-Engineering der Salicylsäure-haltigen Formulierung einschließlich der Untersuchung der Penetrationsfaktoren	Fachzeitschriften z.B. EJPS, SPP, JRS, JCR, EJPB, PharmInd	Q2 2026
SkinForum	Die weiterführenden generierten Ergebnisse sollen zusätzlich auf	Poster oder Vortrag Malmö	Q2 2026

	dem 21st SkinForum (Malmö) präsentiert werden		
GD-Jahrestagung	Die weiterführenden generierten Ergebnisse sollen zusätzlich bei der 27. GD-Jahrestagung (Berlin) präsentiert werden	Poster oder Vortrag Berlin	Q3 2026
Durchführung einer in-vivo Korrelationsstudie	Nachstellung der im Projekt durchgeführten Humanstudie, um die Reproduzierbarkeit der Bioäquivalenz-Daten und die Eignung der CRS-Methode weiter zu etablieren. Auch diese Daten sollen publiziert werden.	Universität Wien	09/10 2026
EMA-Anfrage für CHMP-Empfehlung	Durch weitere Folgestudien in enger Absprache mit dem CHMP-Ausschuss könnte bei ausreichender Datenlage eine CHMP-Empfehlung für die Aufnahme der neuartigen CRS-Methode in die zukünftige Leitlinienaktualisierung angestoßen werden. Mit einer entsprechenden Aufnahme in die Leitlinie stünde KMU künftig eine wissenschaftlich validierte und regulatorisch anerkannte Methode zur Verfügung, um die Generikazulassung von Dermatika zu vereinfachen.		ausstehend
FAH homepage	Einbindung des Schlussberichts		Q2 2026

13. Einschätzung der Realisierbarkeit

Die Durchführbarkeit des vorgesehenen Transferkonzepts wird als sehr gut eingeschätzt. Die vorgesehenen drei Publikationen werden voraussichtlich um weitere ergänzt. Die geplanten Publikationen zu den erhobenen ex-vivo Ergebnissen stellen eine belastbare Grundlage für die weitere wissenschaftliche und regulatorische Etablierung der Methode dar.

Darüber hinaus ist eine methodisch identische Wiederholung der in-vivo-Studie mit Salicylsäure gemeinsam mit der Universität Wien im Sinne einer Korrelationsstudie geplant. Diese Untersuchung ist regulatorisch von besonderem Interesse, da sie die Reproduzierbarkeit, Robustheit und die Übertragbarkeit der Methode weiter absichern und somit die Evidenzbasis für eine mögliche regulatorische Anerkennung stärken soll. Auch diese Ergebnisse sind zur Publikation vorgesehen.

Aufbauend auf der dann erweiterten Datenlage kann perspektivisch eine Anfrage bei der EMA mit dem Ziel einer CHMP-Empfehlung zur zukünftigen Berücksichtigung der CRS-Methode einer nachfolgenden Aktualisierung der Leitlinie gestellt werden. Mit einer entsprechenden Aufnahme in die Leitlinie stünde KMU künftig eine wissenschaftlich validierte und regulatorisch anerkannte Methode zur Verfügung, um die Generikazulassung von Dermatika zu vereinfachen. Die wissenschaftliche Grundlage hierfür wird aufgrund der bereits generierten und geplanten Daten als tragfähig eingeschätzt. Für die formale Umsetzung dieses regulatorischen Schrittes sind jedoch zusätzliche Folgestudien sowie eine enge Abstimmung mit den zuständigen EMA-Vertretern erforderlich. Aufgrund des damit verbundenen organisatorischen und vor allem auch finanziellen Aufwands wird die Einbindung geeigneter Kooperationspartner als sinnvoll und wahrscheinlich notwendig angesehen.

14. Literaturverzeichnis

1. EMA, *Draft guideline on quality and equivalence of topical products*. European Medicines Agency, 2018.
2. EMA, *Guideline on quality and equivalence of locally applied, locally acting cutaneous products*. European Medicines Agency, 2024.
3. Statista, *Umsatz auf dem Weltpharmamarkt in den Jahren 2001 bis 2019*. 2021.
4. Statista, *Weltweiter Arzneimittelumsatz nach Therapiegebiet im Jahr 2019 und Prognose für das Jahr 2026*. 2021.
5. Statista, *Umsatz auf dem deutschen Pharma-Gesamtmarkt von 2006 bis 2020 (in Milliarden Euro)*. 2021.
6. Statista, *Umsatz der Top 10 Pharmamärkte weltweit in den Jahren 2015 bis 2019*. 2021.
7. Statista, *Wert der pharmazeutischen Produktion in Deutschland in den Jahren 1995 bis 2019*. 2021.
8. Statista, *Anteile der Größenklassen deutscher Pharmaunternehmen nach Mitarbeiterzahl in den Jahren 2007 bis 2018*. 2021.
9. BPI, *Studie zur aktuellen Situation der Pharmazeutischen Industrie in Deutschland 2005*. Bundesverband der Pharmazeutischen Industrie, 2005.
10. BPI, *Pharmamittelstand - neue Wege zum Erfolg mit Biotechnologie?* Industrie, B.d.P. Mittelständische Pharmaindustrie Neue Wege zum Erfolg mit Biotechnologie. 2002., 2002.
11. Caspers, P.J., et al., *Automated depth-scanning confocal Raman microspectrometer for rapid in vivo determination of water concentration profiles in human skin*. Journal of Raman Spectroscopy, 2000. **31**(8-9): p. 813-818.
12. Caspers, P.J., et al., *In vivo confocal Raman microspectroscopy of the skin: noninvasive determination of molecular concentration profiles*. J Invest Dermatol, 2001. **116**(3): p. 434-42.
13. Wascotte, V., et al., *Assessment of the "skin reservoir" of urea by confocal Raman microspectroscopy and reverse iontophoresis in vivo*. Pharm Res, 2007. **24**(10): p. 1897-901.
14. Alber, C., et al., *Effects of water gradients and use of urea on skin ultrastructure evaluated by confocal Raman microspectroscopy*. Biochim Biophys Acta, 2013. **1828**(11): p. 2470-8.
15. Ashtikar, M., et al., *Non-invasive depth profile imaging of the stratum corneum using confocal Raman microscopy: first insights into the method*. Eur J Pharm Sci, 2013. **50**(5): p. 601-8.
16. Mahrhauser, D.S., et al., *Assessment of Raman spectroscopy as a fast and non-invasive method for total stratum corneum thickness determination of pig skin*. Int J Pharm, 2015. **495**(1): p. 482-484.
17. Melot, M., et al., *Studying the effectiveness of penetration enhancers to deliver retinol through the stratum corneum by in vivo confocal Raman spectroscopy*. J Control Release, 2009. **138**(1): p. 32-9.
18. Pudney, P.D.A., et al., *An In Vivo Confocal Raman Study of the Delivery of Trans-Retinol to the Skin*. Applied Spectroscopy, 2007. **61**(8): p. 804 - 811.
19. Tfayli, A., et al., *Follow-up of drug permeation through excised human skin with confocal Raman microspectroscopy*. Eur Biophys J, 2007. **36**(8): p. 1049-58.
20. Franzen, L., J. Anderski, and M. Windbergs, *Quantitative detection of caffeine in human skin by confocal Raman spectroscopy--A systematic in vitro validation study*. Eur J Pharm Biopharm, 2015. **95**(Pt A): p. 110-6.
21. Mujica Ascencio, S., et al., *Confocal Raman microscopy and multivariate statistical analysis for determination of different penetration abilities of caffeine and propylene glycol applied simultaneously in a mixture on porcine skin ex vivo*. Eur J Pharm Biopharm, 2016. **104**: p. 51-8.
22. Tfayli, S., et al., *Monitoring caffeine and resveratrol cutaneous permeation by confocal Raman microspectroscopy*. J Biophotonics, 2014. **7**(9): p. 676-81.
23. Mateus, R., et al., *A new paradigm in dermatopharmacokinetics - Confocal Raman spectroscopy*. Int J Pharm, 2013. **444**(1-2): p. 106-8.

24. Mateus, R., et al., *Percutaneous absorption of salicylic acid--in vitro and in vivo studies*. Int J Pharm, 2014. **475**(1-2): p. 471-4.
25. Bakonyi, M., et al., *Following-up skin penetration of lidocaine from different vehicles by Raman spectroscopic mapping*. J Pharm Biomed Anal, 2018. **154**: p. 1-6.
26. Binder, L., et al., *Penetration monitoring of drugs and additives by ATR-FTIR spectroscopy/tape stripping and confocal Raman spectroscopy - A comparative study*. Eur J Pharm Biopharm, 2018. **130**: p. 214-223.
27. Pyatski, Y., et al., *Effects of permeation enhancers on flufenamic acid delivery in Ex vivo human skin by confocal Raman microscopy*. Int J Pharm, 2016. **505**(1-2): p. 319-28.
28. Staubach, P. and D.J. Lunter, *[Basic or maintenance therapy in dermatology. Appropriate vehicles, possibilities and limitations]*. Hautarzt, 2014. **65**(1): p. 63-72; quiz 73-4.
29. Iliopoulos, F., et al., *Franz Cell Diffusion Testing and Quantitative Confocal Raman Spectroscopy: In Vitro-In Vivo Correlation*. Pharmaceutics, 2020. **12**(9).
30. Binder, L., C. Valenta, and D.J. Lunter, *Determination of skin penetration profiles by confocal Raman microspectroscopy: Evaluation of interindividual variability and interlab comparability*. Journal of Raman Spectroscopy, 2020. **51**(7): p. 1037-1043.
31. Krombholz, R. and D.J. Lunter, *A New Method for In-Situ Skin Penetration Analysis by Confocal Raman Microscopy*. Molecules, 2020. **25**(18).
32. Lunter, D.J., *How Confocal Is Confocal Raman Microspectroscopy on the Skin? Impact of Microscope Configuration and Sample Preparation on Penetration Depth Profiles*. Skin Pharmacol Physiol, 2016. **29**(2): p. 92-101.
33. Lunter, D.J., *Determination of skin penetration profiles by confocal Raman microspectroscopy: statistical evaluation of optimal microscope configuration*. Journal of Raman Spectroscopy, 2017. **48**(2): p. 152-160.
34. Liu, Y. and D.J. Lunter, *Profiling skin penetration using PEGylated emulsifiers as penetration enhancers via confocal Raman spectroscopy and fluorescence spectroscopy*. Eur J Pharm Biopharm, 2021. **166**: p. 1-9.
35. Krombholz, R., Y. Liu, and D.J. Lunter, *In-Line and Off-Line Monitoring of Skin Penetration Profiles Using Confocal Raman Spectroscopy*. Pharmaceutics, 2021. **13**(1).
36. Krombholz, R., S. Fressle, and D.J. Lunter, *Ex vivo-In vivo correlation of retinol stratum corneum penetration studies by confocal Raman microspectroscopy and tape stripping*. Int J Cosmet Sci, 2022. **44**(3): p. 299-308.
37. Krombholz, R., et al., *ex vivo-in vivo comparison of drug penetration analysis by confocal raman microspectroscopy and tape stripping*. Experimental Dermatology, 2022. **31**(12): p. 1908-1919.
38. Stella, A., et al., *Raman mapping coupled to self-modelling MCR-ALS analysis to estimate active cosmetic ingredient penetration profile in skin*. J Biophotonics, 2020. **13**(11): p. e202000136.
39. Zhang, G., et al., *Imaging the prodrug-to-drug transformation of a 5-fluorouracil derivative in skin by confocal Raman microscopy*. J Invest Dermatol, 2007. **127**(5): p. 1205-9.
40. Praca, F.S.G., et al., *Evaluation of critical parameters for in vitro skin permeation and penetration studies using animal skin models*. Eur J Pharm Sci, 2018. **111**: p. 121-132.
41. FDA, *In Vitro Permeation Test Studies for Topical Drug Products Submitted in ANDAs Guidance for Industry - Draft Guidance*. Food and Drug Administration, 2022.
42. Herbig, M.E., et al., *Rational Design of Topical Semi-Solid Dosage Forms-How Far Are We?* Pharmaceutics, 2023. **15**(7).
43. Dong, L., et al., *The effect of rheological behavior and microstructure of the emulgels on the release and permeation profiles of Terpinen-4-ol*. Eur J Pharm Sci, 2015. **78**: p. 140-50.
44. Binder, L., et al., *The role of viscosity on skin penetration from cellulose ether-based hydrogels*. Skin Res Technol, 2019. **25**(5): p. 725-734.
45. Dewdney, N., M. Dennis, and J. Parker, *Patent: WO2020072044A1 - Emulsion-based personal care compositions and methods for the same*. Colgate Palmolive Co, 2018.

46. Gaiser, A. and D. Lunter, *Advanced investigation of the suitability of confocal Raman spectroscopy for dermatological bioequivalence assessments using caffeine and 1,2-pentanediol*. Eur J Pharm Sci, 2025. **215**: p. 107324.
47. DAC/NRF, *Rezepturhinweis: Ultraschallkontaktgel (entfallene NRF 13.2.)*. Deutsche Arzneimittel-Codex / Neues Rezeptur-Formularium.
48. Link, J., C. Heusel, and D.J. Lunter, *A pivotal, dermal, in-vivo bioequivalence study performed by confocal Raman spectroscopy (CRS)*. Eur J Pharm Biopharm, 2025. **217**: p. 114891.
49. Caspers, P.J., et al., *Method to quantify the in vivo skin penetration of topically applied materials based on confocal Raman spectroscopy*. Translational Biophotonics, 2019. **1**(1-2).
50. Gaiser, A. and D.J. Lunter, *Investigation of the suitability of confocal Raman spectroscopy for the demonstration of bioequivalence of topical products*. Int J Pharm, 2025. **671**: p. 125214.
51. Schoenfelder, H., et al., *Ceramide Profiling of Porcine Skin and Systematic Investigation of the Impact of Sorbitan Esters (SEs) on the Barrier Function of the Skin*. Mol Pharm, 2025.
52. C+K, *Brochure: Invitro Tewameter VT 310*. Courage+Khazaka electronic GmbH.
53. Schmook, F.P., J.G. Meingassner, and A. Billich, *Comparison of human skin or epidermis models with human and animal skin in in-vitro percutaneous absorption*. Int J Pharm, 2001. **215**(1-2): p. 51-6.
54. Herbig, M.E., et al., *A custom tailored model to investigate skin penetration in porcine skin and its comparison with human skin*. Eur J Pharm Biopharm, 2015. **95**(Pt A): p. 99-109.
55. Bodenlenz, M., et al., *Variability of Skin Pharmacokinetic Data: Insights from a Topical Bioequivalence Study Using Dermal Open Flow Microperfusion*. Pharm Res, 2020. **37**(10): p. 204.
56. EMA, *Guideline on the investigation of bioequivalence*. European Medicines Agency, 2010.
57. Forster, M., et al., *Confocal Raman microspectroscopy for evaluating the stratum corneum removal by 3 standard methods*. Skin Pharmacol Physiol, 2011. **24**(2): p. 103-12.
58. Lunter, D.J., et al., *Novel aspects of Raman spectroscopy in skin research*. Exp Dermatol, 2022. **31**(9): p. 1311-1329.
59. Eichner, A., et al., *Discussion of EMA Draft Guideline on Quality and Equivalence of Topical Products Based on Comparison of Approved Mometasone Furoate Drugs*. Dermatol Ther (Heidelb), 2024. **14**(8): p. 2153-2169.
60. Kourbaj, G., et al., *Assessment of penetration and permeation of caffeine by confocal Raman spectroscopy in vivo and ex vivo by tape stripping*. International Journal of Cosmetic Science, 2023. **45**(1): p. 14-28.
61. Nico, C., et al., *Limits of Detection of Topically Applied Products in the Skin Using In Vivo Raman Spectroscopy*. Pharmaceutics, 2024. **16**(3).
62. Winn, D., et al., *Evaluation of the In Vivo Skin Penetration of TXVector by Confocal Raman Spectroscopy*. J Cosmet Dermatol, 2025. **24**(2): p. e16696.
63. Iliopoulos, F., et al., *Confocal Raman Spectroscopy for Assessing Bioequivalence of Topical Formulations*. Pharmaceutics, 2023. **15**(4).
64. Zarmpi, P., et al., *Confocal Raman Spectroscopic Characterization of Dermatopharmacokinetics Ex Vivo*. Mol Pharm, 2023. **20**(11): p. 5910-5920.
65. Zarmpi, P., et al., *Raman-assessed cutaneous pharmacokinetics of doxepin topical products*. Int J Pharm, 2026. **693**: p. 126680.
66. Zarmpi, P., et al., *Raman spectroscopy as a tool to accelerate development of complex medicinal products*. J Control Release, 2025. **387**: p. 114190.
67. Kuzma, B.A., et al., *Instantaneous topical drug quantification using a 3D printed microfluidic device and coherent Raman imaging*. OpenNano, 2023. **12**.
68. Moore, K., et al., *Reverse Iontophoresis: Noninvasive Assessment of Topical Drug Bioavailability*. Mol Pharm, 2024. **21**(1): p. 234-244.
69. Tiffner, K.I., et al., *Cutaneous pharmacokinetics-based bioequivalence: A clinical dermal open flow microperfusion verification study using lidocaine and prilocaine combination topical products*. Eur J Pharm Sci, 2024. **200**: p. 106827.

70. Lunter, D.J., et al., *Progress in Topical and Transdermal Drug Delivery Research-Focus on Nanoformulations*. Pharmaceutics, 2024. **16**(6).
71. Bielfeldt, S., et al., *Monitoring dermal penetration and permeation kinetics of topical products; the role of Raman microspectroscopy*. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2022. **156**.
72. Lunter, D., et al., *Reflection paper on the APV workshop on in vitro performance testing of topically applied and topically acting substances*. Eur J Pharm Biopharm, 2026. **220**: p. 114971.