

# Schlussbericht vom 04.07.22

---

zu IGF-Vorhaben Nr. 20194 N/1

## Thema

Entwicklung eines Modells zur in-situ Untersuchung der Arzneistoffpenetration mittels konfokaler Raman-Mikrospektroskopie

## Berichtszeitraum

01.09.2018-30.11.2021

## Forschungsvereinigung

Forschungsvereinigung Arzneimittel-Hersteller e.V. - FAH

## Forschungseinrichtung(en)

Eberhard-Karls-Universität Tübingen

Fachbereich Pharmazie und Biochemie

Arbeitsgruppe Pharmazeutische Technologie

Gefördert durch:

## **Gegenüberstellung der durchgeführten Arbeiten und des Ergebnisses mit den Zielen.**

### Arbeitspaket 1: Entwicklung einer unter dem Raman Mikroskop einsetzbaren Penetrationszelle

Ziel: Nach Abschluss des Arbeitspakets steht eine unter dem Objektiv des Raman Mikroskops einsetzbare Penetrationszelle zur Verfügung.

Ergebnis: Es steht eine unter dem Objektiv des Raman Mikroskops einsetzbare Penetrationszelle zur Verfügung. Das Ziel wurde erreicht.

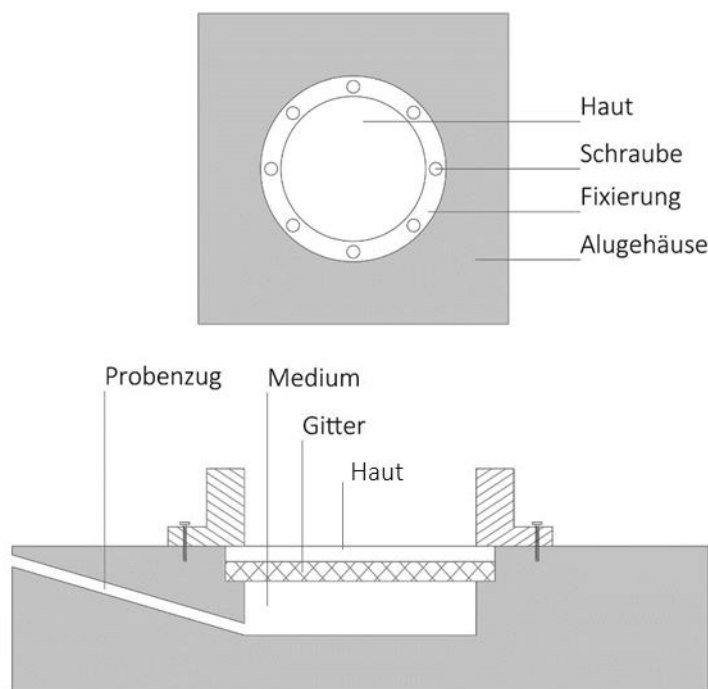


Abbildung1: Schemazeichnung der Penetrationszelle

### Arbeitspaket 2: Entwicklung eines Datenanalyseprotokolls

Ziel: Am Ende von Arbeitspaket 2 steht ein Datenanalysepaket zur Verfügung, welches es ermöglicht, Matrixeffekte bei der Erstellung von Penetrationsprofilen zu eliminieren. Das entwickelte Protokoll zur Datenanalyse wird dann in den nachfolgenden Arbeitspaketen verwendet, um die Penetration verschiedener Stoffe aus unterschiedlichen Formulierungen zu untersuchen. Dabei wird das Datenanalyseprotokoll kontinuierlich optimiert.

Ergebnis: Das Datenanalyseprotokoll besteht aus folgenden Schritten:

- Entfernung von Störpeaks (cosmics)
- Basislinienkorrektur gesamtes Spektrum
- Rauschreduktion
- Hauptkomponentenanalyse (Principal components analysis)
- Optimierung der Messparameter
- Ggf. Basislinienkorrektur Arzneistoffpeak
- Peakflächenberechnung

- Alternativ: Berechnung mit Hauptkomponenten
- Normierung
- Beschneiden (Hautoberfläche)
- Plotten gegen die Tiefe

Das Ziel wurde erreicht.

#### Arbeitspaket 3: Validierung des Modells anhand von Modellsubstanzen aus Lösungen

Ziel: Somit stehen nach der Durchführung von Arbeitspaket 3 Daten zur Penetration von hydrophilen und lipophilen Markersubstanzen aus einfachen Lösungen zur Verfügung und die prinzipielle Machbarkeit ist gezeigt.

Ergebnis: Die Penetration von Procain, Coffein und Retinol aus Lösungen wurde untersucht. Von Coffein und Retinol konnten zeitabhängige Penetrationsprofile erstellt werden. Im Falle des Procains wurde zudem erkannt, dass die Lösungen zu einer überproportional hohen Quellung der Haut führten. Das Ziel wurde erreicht.

#### Arbeitspaket 4: konventionelle Penetrationsexperimente

Ziel: Dadurch kann die Validität der Raman mikroskopisch generierten Daten überprüft werden. Werden mit den konventionellen Untersuchungen die gleichen Ergebnisse erhalten, wie mit der Raman mikroskopischen Methode, so können die Ergebnisse als valide und die Methode als validiert angesehen werden.

Ergebnis: Die Penetration von Coffein und Retinol aus Lösungen wurde mittels konventioneller Methoden untersucht. Zu Procain waren bereits vorab Daten vorhanden. Die gewonnenen Daten der konventionellen Untersuchungen korrelieren mit denen der konfokalen Raman-Mikroskopie. Es fällt auf, dass die Streuung bei den konventionellen Methoden höher ist. Das Ziel wurde erreicht.

#### Arbeitspaket 5: Untersuchung von Matrixeffekten bei der Hautpenetration von Modellsubstanzen

Ziel: Somit stehen nach der Durchführung von Arbeitspaket 5 Daten zur Penetration von Markersubstanzen aus Hydrogelen zur Verfügung und der Einfluss von Matrixeffekten ist untersucht.

Ergebnis: Die Penetration von Coffein und Procain aus Hydrogelen wurde untersucht. Bei beiden Zubereitungen war eine Raman-mikroskopische Untersuchung möglich. Es erwies sich als vorteilhaft eine infinite Dosierung ( $2 \text{ mg/cm}^2$ ) auf die Haut aufzutragen und diese mit einem Deckglas von Immersionsmedium (Wasser) und Objektiv zu trennen. Ein direktes Eintauchen des Wassertauchobjektivs in die Formulierung resultierte hingegen in qualitativ minderwertigen Spektren. Das Ziel wurde erreicht.

#### Arbeitspaket 6: Untersuchung der Hautpenetration von Modellsubstanzen aus einer Öl-in-Wasser-Emulsion

Ziel: Somit stehen nach der Durchführung von Arbeitspaket 6 Daten zur Penetration der lipophilen Markersubstanz aus einer O/W-Emulsion zur Verfügung und der Einfluss weiterer Matrixeffekte ist untersucht. Es ist somit gezeigt, dass die Methode zum Einsatz der Detektion der Penetration von lipophilen Substanzen aus O/W-Emulsionen geeignet ist. Des Weiteren ist bekannt, wie mit Matrixeffekten umzugehen ist.

Ergebnis: Die Penetration von Retinol aus einer O/W-Emulsion wurde untersucht. Wie bei den Gel-Zubereitungen war eine Raman-mikroskopische Untersuchung möglich. Es erwies sich als vorteilhaft eine infinite Dosierung ( $2 \text{ mg/cm}^2$ ) auf die Haut aufzutragen und diese mit einem

Deckglas von Immersionsmedium (Wasser) und Objektiv zu trennen. Ein direktes Eintauchen des Wassertauchobjektivs in die Formulierung resultierte hingegen in qualitativ minderwertigen Spektren. Das Ziel wurde erreicht.

#### Arbeitspaket 7: Untersuchung der Leistungsfähigkeit des Modells im Hinblick auf die Untersuchung der Penetrationsbeeinflussung durch die Formulierungszusammensetzung

Ziel: Dadurch wird gezeigt, dass die entwickelte Methode zur in-situ kontinuierlichen Penetrationsmessung in der Lage ist, Unterschiede in der Penetration eines Arzneistoffs zu detektieren, die durch die Formulierung (Penetrationsverbesserer) hervorgerufen wurden.

Ergebnis: Es wurden der Einfluss von Penetrationsverbesserern auf die Penetration von Coffein und Procain untersucht. Der Einfluss der Penetrationsverbesserer konnte sichtbar gemacht werden. Das Ziel wurde erreicht.

#### Arbeitspaket 8: In vivo Untersuchungen

Ziel: Durch den Abgleich der ex-vivo erhaltenen Ergebnisse mit den in-vivo-Daten wird geklärt, ob die Methode prinzipiell in der Lage ist, die in-vivo-Situation abzubilden. Hierbei kann auch ein Quervergleich zu den Ergebnissen der konventionellen ex-vivo Untersuchungen gezogen werden, um zu bewerten, ob die Raman-mikroskopische Methode bessere oder vergleichbare Daten liefert. Es wird eine ex-vivo-in-vivo-Korrelation für die verwendeten Arzneistoffe und Formulierungen aufgestellt. Damit wird gezeigt, inwieweit die ex vivo Methode die Ergebnisse von in vivo Untersuchungen valide vorhersagen kann.

Ergebnis: Die Penetration von Coffein und Retinol aus Gelen bzw. aus einer O/W-Emulsion wurde untersucht. Da sich zwischenzeitlich die Gesetzgebung geändert hatte und die Untersuchungen an Procain als Arzneimittelstudie gegolten hätte, welche im Rahmen des Projekts nicht budgetiert war, wurde diese Untersuchung nicht durchgeführt. Alternativ wurde zusätzlich ein Coffeingel mit Penetrationsverbesserer untersucht. Die Ergebnisse der in vivo Untersuchungen korrelieren mit denen der ex vivo Untersuchungen. Es zeigt sich eine hohe Streuung der Daten von Retinol, da eine geringe Probandenanzahl verwendet wurde und Retinol schlecht penetriert. Im Fall von Coffein wurden geringere Streuungen festgestellt. Insgesamt korrelieren in vivo und ex vivo Ergebnisse. Das Ziel wurde erreicht.

#### Arbeitspaket 9: Veröffentlichung der gewonnenen Ergebnisse

Ziel: Nach erfolgreicher Etablierung, Validierung und Nachweis der Leistungsfähigkeit des Systems werden die gewonnenen Ergebnisse der Fachöffentlichkeit zugänglich gemacht. Hierzu sind Publikationen in relevanten Fachjournalen sowie Präsentationen auf Fachtagungen (als Poster oder Vortrag) angedacht.

Ergebnis: Das Ziel wurde erreicht: siehe Plan zum Ergebnistransfer in die Wirtschaft.

#### Arbeitspaket 10: Dokumentation und Bericht

Ziel: Die Ergebnisse der Versuche werden fortlaufend protokolliert. Die Ergebnisse werden jährlich in Form eines Zwischen- bzw. Abschlussberichts zusammengefasst und dem projektbegleitenden Ausschuss vorgelegt. Daneben werden, wie unter Arbeitspaket 9 dargestellt, die Ergebnisse der Fachöffentlichkeit zugänglich gemacht. Des Weiteren erfolgt eine halbjährliche Präsentation und Diskussion der Ergebnisse im Rahmen der Treffen des Projektbegleitenden Ausschusses.

Ergebnis: Dokumentation und Bericht wurden wie beschrieben durchgeführt. Das Ziel wurde erreicht.

## **Angaben zu den aus der Zuwendung finanzierten Ausgaben**

- für Personenmonate des wissenschaftlich-technischen Personals gemäß Beleg über Beschäftigungszeiten (Einzelansatz A.1 des Finanzierungsplans)  
----
- für Geräte (Einzelansatz B des Finanzierungsplans)  
3.786,58 €
- für Leistungen Dritter (Einzelansatz C des Finanzierungsplans)  
29.000,00 €

## **Erläuterung der Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit**

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

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

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 [1]. Davon entfallen 13,8 Mrd USD auf den Bereich Dermatika [2]. Die Umsätze auf dem deutschen Pharma-Gesamtmarkt beliefen sich 2020 auf 49,5 Mrd Euro [3]. Deutschland liegt somit auf Platz vier hinter den USA, China und Japan [4]. Die deutsche pharmazeutische Industrie stellte 2019 Produkte im Wert von 31,1 Mrd Euro her [5]. Immer noch ist der Großteil der deutschen pharmazeutischen Unternehmen, nämlich 67 % den kleinen und mittelständischen Unternehmen zuzuordnen obgleich der Anteil rückläufig ist [6]. 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 [7] [8]. Gerade hier kann das vorgeschlagene Projekt eine Hilfe sein, da es sich um eine Schrittinnovation im Bereich der Analytik handelt. Nachdem die Methode nun etabliert ist, 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. Weitere Nutzer der Projektergebnisse sind Unternehmen der Kosmetikindustrie, die die Aufnahme von kosmetisch

aktiven Substanzen in die Haut genauso verfolgen können, wie pharmazeutische Unternehmen die Penetration von Arzneistoffen. Die Unternehmen können entweder selbst die Technologie erwerben und eigene Messungen durchführen oder spezialisierte Firmen mit einer solchen Untersuchung beauftragen. Dies erlaubt die kosmetische Wirksamkeit verschiedenster Substanzen mit wissenschaftlichen Daten zu ihrer Aufnahme in die Haut zu unterfüttern. Dadurch können sich die beteiligten Unternehmen am Markt von anderen abheben, die keine derartigen Untersuchungen durchführen. Sie sichern sich dadurch einen Wettbewerbsvorteil. Des Weiteren profitieren Labore, welche ex vivo Untersuchungen der Penetration von Arznei-, Hilfs- oder kosmetischen Aktivstoffen durchführen, 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 Pharma- oder Kosmetikunternehmen dies nicht leisten. Diese werden derartige Messungen an spezialisierte Labore vergeben. Die Daten, wie Versuchsprotokolle, Validierungsergebnisse etc. sind publiziert und stehen somit den Laboren zur Nutzung zur Verfügung. Dadurch können diese die Methode übernehmen und nutzen, um Aufträge von Pharma- oder Kosmetikunternehmen zu generieren. Die Anwendung der konfokalen Ramanmikrospektroskopie zur Untersuchung der Hautpenetration wird derzeit im Rahmen von Richtlinien der Europäischen Arzneimittelbehörde EMA stark diskutiert. Es ist daher in den nächsten Jahren mit einem deutlich erhöhten Interesse und einer verstärkten Anwendung der im Projekt entwickelten Methode zu rechnen.

**Fortschreibung des mit dem Antrag vorgelegten Plans zum Ergebnistransfer in die Wirtschaft (in tabellarischer Form mit Zeitangaben bzw. Zeithorizont), ergänzt um eine Einschätzung der Realisierbarkeit dieses Transferkonzepts, das auch alle Arbeiten enthält, die im Zusammenhang mit dem Vorhaben veröffentlicht wurden oder in Kürze veröffentlicht werden sollen**

Mit dem Antrag vorgelegter Plan zum Ergebnistransfer in die Wirtschaft:

Maßnahme	Ziel	Ort/Rahmen	Datum/ Zeitraum	Durchführung
1. PA-Sitzung (Starttreffen)	Vorstellung der Projektziele, Formulierung von Wünschen und Anforderungen seitens der KMU	Diskussion mit den im PA vertretenen KMU	3. Quartal 2018	24.10.2018 Tübingen
2. PA-Sitzung	Vorstellung der Zwischenergebnisse, weitere Versuchsplanung in Abstimmung mit den KMU	Diskussion mit den im PA vertretenen KMU	3. Quartal 2019	28.10.2019, Bad Boll
Publikation	Darstellung der Ergebnisse „Etablierung eines Modells zur dynamischen Raman-mikrospektroskopischen Untersuchung der Hautpenetration hydrophiler und lipophiler Substanzen aus Lösungen“	Fachzeitschriften zB EJPS, SPP, JRS, PharmInd	3. Quartal 2019/1. Quartal 2020	01/2020 Weitere Publikation geplant 06/2022
APV World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology	Vorstellung der Ergebnisse auf einem der größten Kongresse der Pharmazeutischen Technologie, an der Mitglieder aus Industrie und Universität teilnehmen.	Vortrag oder Poster	1. od. 2. Quartal 2020	Aufgrund der Pandemie ausgefallen.
Skin Forum	Vorstellung der Ergebnisse auf einem Kongress, Pharmazeuten, Dermatologen und dermatologisch orientierte pharmazeutische Industrie zusammenbringt.	Vortrag oder Poster	2. Quartal 2020	Aufgrund der Pandemie ausgefallen.

3. PA. -Sitzung	Vorstellung der Zwischenergebnisse, weitere Versuchsplanung in Abstimmung mit den KMU	Diskussion mit den im PA vertretenen KMU	3. Quartal 2020	29.10.2020, online
International Federation of Societies of Cosmetic Chemists Meeting	Vorstellung der Ergebnisse auf einem Kongress, Pharmazeuten, Dermatologen und kosmetisch orientierte pharmazeutische Industrie zusammenbringt.	Vortrag oder Poster	3. Quartal 2020	Aufgrund der Pandemie ausgefallen.
Publikation	Darstellung der Ergebnisse „Raman-mikrospektroskopische Untersuchung der Hautpenetration hydrophiler und lipophiler Substanzen aus Dermatika (Hydrogele und Emulsionen)“	Fachzeitschriften zB EJPS, SPP, JRS, PharmInd	3. Quartal 2020	Emulsionen: 02/2022 Eingereicht Hydrogele: 05/2022 eingereicht
4. PA. -Sitzung	Vorstellung der Endergebnisse, Beratung über mögliche industrielle Umsetzung	Diskussion mit den im PA vertretenen KMU	1. Quartal 2021	30.11.2021, online
Projektveranstaltung der FAH	Vorstellung der Projektergebnisse	Veranstaltung für industrielles Publikum in Bonn	1. Quartal 2021	30.11.2021, online
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	

### Ergebnistransfer nach Abschluss des Vorhabens

Die mit dem Antrag eingereichten, geplanten Vorhaben zum Ergebnistransfer nach Abschluss der Vorhabens umfassen die in der folgenden Tabelle aufgeführten Maßnahmen und werden wie geplant durchgeführt werden.

Maßnahme	Ziel	Ort/Rahmen	Datum/Zeitraum	Durchführung
Publikation	Darstellung der Ergebnisse „Raman-mikrospektroskopische Untersuchung der Hautpenetration hydrophiler und lipophiler Substanzen aus Dermatika (Einfluss von Penetrationsverbesserern)“	Fachzeitschriften, zB EJPS, SPP, JRS, PharmInd	1. Quartal 2021	01/2021
FAH Internetseite	Vorstellung von Projekt und Ergebnissen	Internetseite	Laufend ab Projektstart	
Einbindung in akademische Lehre	Darstellung der Möglichkeiten zur Untersuchung der Hautpenetration per Raman Mikrospektrometrie	Masterstudiengang Pharmaceutical Sciences and Technologies	Sommersemester 2021	Ab SS 2021 erfolgt



#### Einschätzung der Realisierbarkeit:

Die Durchführbarkeit des Transferkonzepts wird als sehr gut eingeschätzt. Die vorgesehenen drei Publikationen werden voraussichtlich um eine weitere ergänzt.

#### Publikationen:

Die Ergebnisse der Arbeiten zu Coffein wurden in „Molecules“ publiziert:

- o „A New Method for In-Situ Skin Penetration Analysis by Confocal Raman Microscopy“

Eine weitere Arbeit zu Procain wurde im Januar 2021 zur Publikation in „Pharmaceutics“ angenommen:

- o “In-Line and Off-Line Monitoring of Skin Penetration Profiles Using Confocal Raman Spectroscopy”

Die Ergebnisse der ex vivo und in vivo Untersuchungen von Retinol aus einer Emulsion wurden im Februar 2022 zur Publikation im International Journal of Cosmetic Science eingereicht und zur Publikation angenommen.

- o “Ex vivo – in vivo correlation of Retinol skin penetration studies by confocal Raman microspectroscopy and tape stripping”

Die Ergebnisse der ex vivo und in vivo Untersuchungen von Coffein aus Hydrogelen wurden im Juni 2022 zur Publikation im Experimental Dermatology eingereicht.

- o “Ex vivo – in vivo correlation of Retinol skin penetration studies by confocal Raman microspectroscopy and tape stripping”

Die Ergebnisse werden/wurden außerdem in 2022 auf zwei internationalen Kongressen in Form eines Posters oder Vortrags vorgestellt.

- o APV World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, März 2022, Rotterdam
- o Skin Forum, Juni 2022, Malmö, Schweden