

Schlussbericht vom 04.10.22

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:

Zusammenfassung

Für die Wirksamkeit von Dermatika spielt die in die Haut penetrierte Arzneistoffmenge eine entscheidende Rolle. Den Penetrationsverlauf einer Substanz im zeitlichen Verlauf zu bestimmen ist mit konventionellen Methoden sehr zeit- und arbeitsaufwendig. Durch eine kontinuierliche in-situ-Messung wird die Untersuchungszeit auf die reine Inkubationszeit reduziert, wodurch die Entwicklung von Dermatika deutlich beschleunigt wird. Dies ist insbesondere für KMU von großer Bedeutung, da neue Produkte schneller auf den Markt gebracht werden können und so die Wettbewerbsfähigkeit der Unternehmen steigt.

Die konfokale Raman-Mikroskopie ist eine solche Methode. Sie ermöglicht eine kontinuierliche in-situ Messung, da sie chemisch sensitiv und nicht zerstörend ist sowie orts aufgelöste Messungen in kurzer Zeit ermöglicht. Um die Penetration von Arzneistoffen in die Haut zu messen, wird sie im Rahmen des Projekts mit dem konventionellen Versuchsaufbau der Franz-Diffusionszelle kombiniert. Die Haut kann so in der Penetrationszelle direkt unter dem Objektiv des Raman-Mikroskops mit der Formulierung inkubiert werden. Zur Etablierung der Methode wurde die Penetration typischer hydrophiler und lipophiler Markersubstanzen aus Lösungen untersucht. Danach wurde zu realitätsnäheren Formulierungen, wie Gelen und Öl-in-Wasser-Emulsionen übergegangen, um zu evaluieren, ob eine Messung der Penetration möglich ist, sofern die Zubereitung auf der Haut verbleibt. In einem weiteren Schritt wurden Modellformulierungen mit und ohne Penetrationsverbesserer verwendet, um deren Wirkung auf die Penetration sichtbar zu machen. Zudem erfolgte ein Abgleich der erhaltenen Daten mit Daten aus in-vivo-Messungen, um zu zeigen, dass die Methode prinzipiell in der Lage ist, die in-vivo-Situation abzubilden.

Inhaltsverzeichnis

Gegenüberstellung der durchgeführten Arbeiten und des Ergebnisses mit den Zielen.	4
Wissenschaftlich-technische und wirtschaftliche Problemstellung	4
Stand von Forschung und Entwicklung zu Projektbeginn	5
Arbeitshypothese	7
Lösungsweg und Ergebnisse	9
Arbeitspaket 1: Entwicklung einer unter dem Raman Mikroskop einsetzbaren Penetrationszelle	9
Arbeitspaket 2: Entwicklung eines Datenanalyseprotokolls	12
Arbeitspaket 3: Validierung des Modells anhand von Modellsubstanzen aus Lösungen	15
Arbeitspaket 4: konventionelle Penetrationsexperimente	19
Arbeitspaket 5: Untersuchung von Matrixeffekten bei der Hautpenetration von Modellsubstanzen	22
Arbeitspaket 6: Untersuchung der Hautpenetration von Modellsubstanzen aus einer Öl-in-Wasser-Emulsion	27
Arbeitspaket 7: Untersuchung der Leistungsfähigkeit des Modells im Hinblick auf die Untersuchung der Penetrationsbeeinflussung durch die Formulierungszusammensetzung	29
Arbeitspaket 8: In vivo Untersuchungen	30
Arbeitspaket 9: Veröffentlichung der gewonnenen Ergebnisse	35
Arbeitspaket 10: Dokumentation und Bericht	35
Erweiterung des Stands von Wissenschaft und Technik während des Projektzeitraums	35
Fazit	38
Angaben zu den aus der Zuwendung finanzierten Ausgaben	39
Erläuterung der Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit	39
Darstellung des wissenschaftlich-technischen und wirtschaftlichen Nutzens der erzielten Ergebnisse insbesondere für KMU sowie ihres innovativen Beitrags und ihrer industriellen Anwendungsmöglichkeiten	39
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	41
Einschätzung der Realisierbarkeit:	44

Publikationen:	44
Literaturverzeichnis	45

Gegenüberstellung der durchgeführten Arbeiten und des Ergebnisses mit den Zielen.

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 stellen hier eine Ausnahme dar. Auch im Rahmen der Generikazulassung müssen hier Wirksamkeitsprüfungen am Patienten durchgeführt werden. Diese sind zeit- und vor allem äußerst kostenintensiv. Daher müssen die zu prüfenden Formulierungen im Vorfeld sensibel ausgewählt werden, um nicht unnötig hohe Kosten durch eine unnötig hohe Anzahl von in vivo-Untersuchungen zu erzeugen. Als Auswahlkriterium bietet sich bei Formulierungen, die Arzneistoffe enthalten, die in der Haut ihren Wirkort haben an, die Konzentration des Arzneistoffs in der Haut zu bestimmen. Je nach Ausrichtung des Entwicklungsansatzes wird die Einbringung einer bestimmten Menge Arzneistoffs in die Haut angestrebt, wenn z. B. die wirksame Konzentration bereits bekannt ist oder es eine Referenzzubereitung gibt. Oder es wird angestrebt z. B. durch Verwendung von Lösungsmitteln (Cosolventien) oder Penetrationsverbesserern so viel Arzneistoff wie möglich in die Haut einzubringen, um den größtmöglichen Effekt zu erzielen. Es ist aus Zeit-, Kosten- und ethischen Gesichtspunkten nicht möglich in-vivo Wirksamkeitsprüfungen im Rahmen der Formulierungsentwicklung mit einer Vielzahl von Formulierungs-Prototypen durchzuführen. In frühen bis mittleren Entwicklungsphasen erfolgt die Analyse der Arzneistoffaufnahme in die Haut daher ex vivo anhand von Penetrationsuntersuchungen. Generell wird mit Hilfe von Penetrationsuntersuchungen gemessen, wieviel Arzneistoff aus der Formulierung in die Haut aufgenommen wird. Dazu muss nach der Inkubation der Haut mit der Formulierung der Arzneistoff aus der Haut extrahiert und anschließend quantifiziert werden. Es handelt sich daher bezüglich der verwendeten Haut immer um eine zerstörende Prüfung. Dadurch wird notwendigerweise die Anzahl an Wiederholungsmessungen oder Zubereitungen, die miteinander verglichen werden können durch die Fläche der zur Verfügung stehenden Haut begrenzt. Üblicherweise können z. B. drei Formulierungen mit fünf Wiederholungsmessungen und einem Probennahmezeitpunkt verglichen werden. Sofern der zeitliche Verlauf der Arzneistoff-Aufnahme untersucht werden soll, kann entsprechend nur eine begrenzte Anzahl von Messpunkten (Inkubationszeiten) untersucht werden. Wenn es von Interesse ist, wie sich der Arzneistoff in den unterschiedlichen Hautschichten verteilt, muss die Haut zudem vor der Extraktion segmentiert werden. Dies macht die Untersuchungen noch aufwändiger und steigert die Kosten weiter. Konventionelle Penetrationsuntersuchungen sind also aufwändig und in ihrer Aussage limitiert. Hier setzt das vorgeschlagene Forschungsvorhaben an. Die zu entwickelnde Methode strebt eine kontinuierliche in situ Messung der Arzneistoffkonzentration in der Haut per Raman-Mikrospektroskopie in einem ex vivo Versuchsaufbau an. Dadurch wird die Anzahl der möglichen Messzeitpunkte deutlich erhöht, während die benötigte Anzahl Hautproben reduziert werden kann. Die Inkubation der Haut mit der Formulierung erfolgt in einer Penetrationszelle direkt unter dem Objektiv eines Raman-Mikroskops, wo auch die Messung der aufgenommenen Arzneistoffmenge stattfindet. Bei der Raman-mikrospektroskopischen Messung wird das Hautstück nicht beschädigt oder zerstört, so dass für Messungen zu verschiedenen Inkubationszeiten dasselbe Hautstück verwendet werden kann. Zudem sind weitere Schritte, wie

die Segmentierung der Haut, Extraktion und nachfolgende Quantifizierung aufgrund der direkten Konzentrationsbestimmung über die Raman-Mikrospektroskopie nicht notwendig. Dies bedeutet, dass sich die Zeit bis zum Erhalt der Ergebnisse auf die reine Inkubationszeit reduziert. Dadurch können deutlich Zeit und folglich auch Kosten eingespart werden. Die Qualität der Ergebnisse ist dabei den auf konventionellem Weg erhaltenen Ergebnissen sogar überlegen, da durch die Messung der verschiedenen Zeitpunkte am selben Hautstück die Schwankungen, die bei Verwendung verschiedener Hautstücke (konventionelle Methoden) auftreten würden hier nicht in Erscheinung treten. Zusätzlich wird die Erfassung echter kinetischer Daten überhaupt erst möglich gemacht. Ist der zeitliche Verlauf der Arzneistoffaufnahme in die Haut bekannt, können auf dieser Grundlage sinnvolle Untersuchungszeitpunkte für die nachfolgenden in vivo Untersuchungen festgelegt werden. Insgesamt wird eine rationale Entscheidung über die in in-vivo Untersuchungen zu verwendende Formulierung sowie die Messzeitpunkte ermöglicht.

Stand von Forschung und Entwicklung zu Projektbeginn

In der Entwicklung dermalen Arzneimittel werden ex vivo 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.

Die etablierten Methoden zur Untersuchung der Penetration bringen verschiedene Nachteile mit sich, die ihre Aussagekraft in der Untersuchung von Dermatika limitieren. Arzneistoffe zur Therapie chronischer Hauterkrankungen sollen ihre Wirkung üblicherweise in der Haut entfalten. Aus biopharmazeutischen Gesichtspunkten ist die Kenntnis des zeitlichen Verlaufs der Arzneistoffkonzentration (Kinetik) in eben diesem Gewebe von zentraler Bedeutung. Ex vivo Penetrationsuntersuchungen können zwar 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. Kinetische Untersuchungen werden dadurch sehr zeitaufwendig und verbrauchen große Mengen an Ressourcen (Haut). Gleichzeitig limitiert die Menge der vorhandenen Haut pro Spender die Anzahl an Zeitpunkten bzw. Wiederholungsexperimenten, die an ihr durchgeführt werden können. In vivo kann die Arzneistoffkonzentration in der Hornschicht (Stratum corneum) mittels Klebebandabrisstechnik und in den lebenden Schichten der Haut mit Hilfe der Mikrodialyse kontinuierlich gemessen werden, allerdings sind zum einen in vivo Messungen in frühen Entwicklungsstadien nicht zweckmäßig und zum anderen sind auch hier die Ressourcen (also Applikationsstellen pro Proband, an denen man die Penetration untersuchen kann) limitiert. Daneben werden auch konfokale optische Methoden in der Untersuchung der Penetration eingesetzt. Diese umfassen die Fluoreszenzmikroskopie, Abgeschwächte Totalreflexions-Infrarot-Spektroskopie und -Mikroskopie (ATR-IR) und die Raman-Mikrospektroskopie / -Mikroskopie.

Auch die optischen Methoden bringen ihre jeweils spezifischen Limitationen mit sich. Die Fluoreszenzmikroskopie schränkt die Anzahl der untersuchbaren Wirkstoffe deutlich ein, da im Grunde nur fluoreszierende Wirkstoffe untersucht werden können. Eine Kopplung an Fluorophore würde die chemischen und physikalischen Eigenschaften der Moleküle so stark verändern, dass sich auch das Penetrationsverhalten ändern würde. Für die ATR-IR-Mikroskopie ist nur die Oberfläche (Eindringtiefe ca. 2 µm [9]) der Probe zugänglich. Daher können entweder nur die äußersten Schichten des Stratum corneums untersucht werden oder es müssen Gewebsschnitte hergestellt werden. Zusätzlich ist nur eine Ortsauflösung von mehreren Mikrometern erzielbar [9].

In der Raman-Mikrospektroskopie ist eine deutlich bessere Ortsauflösung von unter 1 μm möglich [10]. Auch die Eindringtiefe ist im Gegensatz zur ATR-IR-Spektroskopie höher, es sind daher Messungen bis ca. 40 μm in der Haut möglich [11, 12]. Es sind prinzipiell ex vivo, sowie in vivo Messungen möglich. Die verwendeten Geräte unterscheiden sich insofern, dass mit einem Mikrospektrometer nur eine punktuelle Messung möglich ist, so dass in verschiedenen Tiefen der Haut Spektren aufgenommen werden können, welche dann zu einem Konzentrations-Tiefen-Profil zusammengesetzt werden. Dahingegen erlaubt die konfokale Raman-Mikroskopie Messungen in mehreren Raumrichtungen, so dass die Aufnahme von 2D oder sogar 3D-Verteilungskarten des Arzneistoffs in der Haut möglich sind. Weitere relevante Unterschiede umfassen die verwendeten Anregungswellenlängen, die sich zum einen auf die erzielte Auflösung auswirken (höhere Wellenlänge = geringere Auflösung) zum anderen aber auch die in die Probe eingebrachte Energie bedingen. So wird z. B. durch Verwenden von Licht längerer Wellenlänge der Energieeintrag so gering gehalten, dass von keinem hautschädigenden Effekt auszugehen ist und derartig ausgestattete Systeme somit auch für in vivo Messungen verwendet werden können. Da dies aber auf Kosten der Ortsauflösung geht und auch die Messzeiten deutlich erhöht, sind in der Entwicklung und für ex vivo Untersuchungen Geräte mit höherer Wellenlänge üblich. Diese liefern schnellere und präzisere Ergebnisse. Über die Qualität der gemessenen Spektren entscheiden auch die verwendeten Objektive, die das Licht auf die Haut fokussieren, sowie der konfokale Aufbau des Geräts (z. B. Blenden, optische Lichtleiter). Die Forschungseinrichtung hat bereits umfangreiche Untersuchungen des Einflusses dieser Faktoren auf die Ergebnisse von Hautpenetrationsuntersuchungen durchgeführt, so dass die optimalen Untersuchungsbedingungen inzwischen bekannt sind [13, 14].

Neben verschiedenen Untersuchungen zur Verteilung von hauteigenen Substanzen, wie Carotinoiden, Harnstoff oder Wasser [11, 15-19] umfassen bisherige Untersuchungen mittels konfokaler Raman Mikrospektroskopie die Hautpenetration von verschiedenen lipophilen, wie hydrophilen Stoffen aus meist einfachen Lösungen. 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 aus wässrig-ethanolischer oder öligiger Lösung untersuchten [20, 21]. Daneben wurden von verschiedenen Forschergruppen die Penetration von Metronidazol, Coffein, Resveratrol, Ibuprofen und Salicylsäure aus Lösungen untersucht [12, 22-26]. Außerdem finden sich erste Ansätze zur Untersuchung des Metabolismus von Arzneistoffen in der Haut. So untersuchten Flach et al die Umsetzung eines 5-FU Prodrugs zum wirksamen 5-FU Raman-mikroskopisch [27]. Neuere Untersuchungen befassen sich auch mit dem Einfluss von Penetrationsverbesserern auf die Hautpenetration von Arzneistoffen, wie Flufenaminsäure oder Procain [28, 29]. Obwohl allgemein bekannt ist, dass die Formulierungszusammensetzung einen großen Effekt auf die Hautpenetration ausübt, berücksichtigten bisher allein die Untersuchungen der antragstellenden Forschungseinrichtung an Procain die Penetration aus einer Formulierung, während alle anderen Untersuchungen mit Hilfe von Lösungen durchgeführt wurden [29]. Ebenso gibt es bisher kaum Raman-mikroskopisch erhobene Daten zur Kinetik der Arzneistoffaufnahme bzw. des Arzneistofftransports in der Haut. Einzig Flach und Tfayli untersuchten die Arzneistoffkonzentration in der Haut nach zwei Zeitpunkten, um daraus kinetische Daten abzuleiten [22, 27, 28]. Die Kenntnis der Kinetik der Hautpenetration wäre allerdings ein wichtiger Faktor der genutzt werden könnte, um z. B. geeignete Probennahmezeitpunkte bei späteren diskontinuierlichen Untersuchungen festzulegen, um die Wirkdauer bzw. die Zeit bis zum Wirkeintritt zu bestimmen oder, um zu vergleichen, ob unterschiedliche Formulierungen den Arzneistoff unterschiedlich schnell in die Haut zu transportieren vermögen.

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 praxisrelevanten Formulierungen anstelle von einfachen Lösungen, die bei der tatsächlichen Anwendung keine Rolle spielen. Ebenso fehlt die Möglichkeit einer kontinuierlichen in-situ Messung der Arzneistoffpenetration welche ohne großen Aufwand zusätzliche nützliche Daten liefern würde, welche sonst nur schwer bis gar nicht zugänglich sind.

Arbeitshypothese

Bisher übliche Methoden zur Ermittlung des zeitlichen Verlaufs der Penetration einer Substanz (meist Wirkstoff, ggf. aber auch in der Formulierung enthaltene Hilfsstoffe) weisen folgende Nachteile auf:

- sie erlauben keine kontinuierliche Messung der penetrierten Arzneistoffmenge.
- es handelt sich um zerstörende Prüfungen.
- sie sind zeitaufwendig,
- und dadurch kostenintensiv.

Dies ergibt sich aus dem nachfolgend exemplarisch dargestellten Versuchsablauf: Hautproben werden mit den zu untersuchenden Formulierungen in Franz-Diffusionszellen (oder anderen geeigneten Geräten) inkubiert und nach definierten Zeiten aus diesen entnommen, segmentiert (also zerstört), der Arzneistoff wird extrahiert und anschließend per HPLC oder mittels anderer geeigneter analytischer Verfahren quantifiziert.

Will man in der skizzierten Art und Weise zum Beispiel die ex-vivo Penetration eines Arzneistoffs aus zwei Formulierungen zu fünf Zeitpunkten mit drei Wiederholungsmessungen bestimmen, erfordert dies einen Zeitbedarf von mindestens zwei Wochen. Eine kontinuierliche in-situ Messung, wie sie im beantragten Forschungsvorhaben entwickelt werden soll, könnte die Untersuchungszeit auf die reine Inkubationszeit reduzieren, sodass im obigen Beispiel sich der Zeitbedarf auf zwei mal drei Tage reduziert. D. h., es resultiert eine Zeitersparnis von 40 %, wodurch die Entwicklung von Dermatika signifikant rascher und zusätzlich kosteneffizienter erfolgen kann.

Ein Verfahren, welches die kontinuierliche in-situ Messung ermöglicht, sollte chemisch sensitiv und nicht zerstörend sein sowie orts aufgelöste Messungen innerhalb einer kurzen Zeit (wenige Minuten) ermöglichen. Die konfokale Raman-Mikroskopie ist eine Methode, die all diese Parameter erfüllt. Um die Penetration von Arzneistoffen in die Haut zu messen, kann sie z. B. mit dem konventionellen Versuchsaufbau der Franz-Diffusionszelle kombiniert werden, die international als Referenzmethode akzeptiert ist. Im Rahmen des beantragten Forschungsvorhabens soll systematisch untersucht werden,

- Welchen Einfluss verschiedene Formulierungstypen (Lösung, Gel, Emulsion) auf die kontinuierliche in situ Messung der Penetration haben.
- Wie der Einfluss von Formulierungsbestandteilen (Penetrationsverbesserern) auf die Penetration sichtbar gemacht werden kann.

- Wie stark die Korrelation der Ergebnisse der entwickelten ex vivo-Methode zu Ergebnissen aus in vivo Untersuchungen ist.

Zu diesem Zweck wird im Rahmen des beantragten Forschungsvorhabens eine modifizierte Penetrationszelle entwickelt, in der die Haut direkt unter dem Objektiv des Raman-Mikroskops mit der zu untersuchenden Formulierung inkubiert werden kann. Mit Hilfe dieses Versuchsaufbaus soll eine kontinuierliche Messung der Hautpenetration bei auf der Haut verbleibender Formulierung ermöglicht werden. Dazu werden zunächst die Penetrationszelle sowie ein Protokoll zur Datenanalyse entwickelt. Anschließend wird die Leistungsfähigkeit des Systems anhand von verschiedenen Modellsubstanzen und Modellformulierungen evaluiert. Die ex vivo erhaltenen Ergebnisse werden durch in vivo Untersuchungen validiert.

Lösungsweg und Ergebnisse

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.

Details:

Um die Schweineohrenhaut direkt unter dem Raman-Mikroskop zu inkubieren und in-situ-Daten zu generieren, wurde eine beheizbare Diffusionszelle entwickelt und in Zusammenarbeit mit der mechanischen Werkstatt des Instituts für Pharmazie in Tübingen maßgefertigt. Die Inkubationszelle ist an Franz-Diffusionszellen angelehnt, die häufig für ex-vivo-Hautpenetrationsstudien verwendet werden. Eine schematische Darstellung der Zelle und Bilder der fertigen Zelle sind in Abbildung 1 zu sehen.

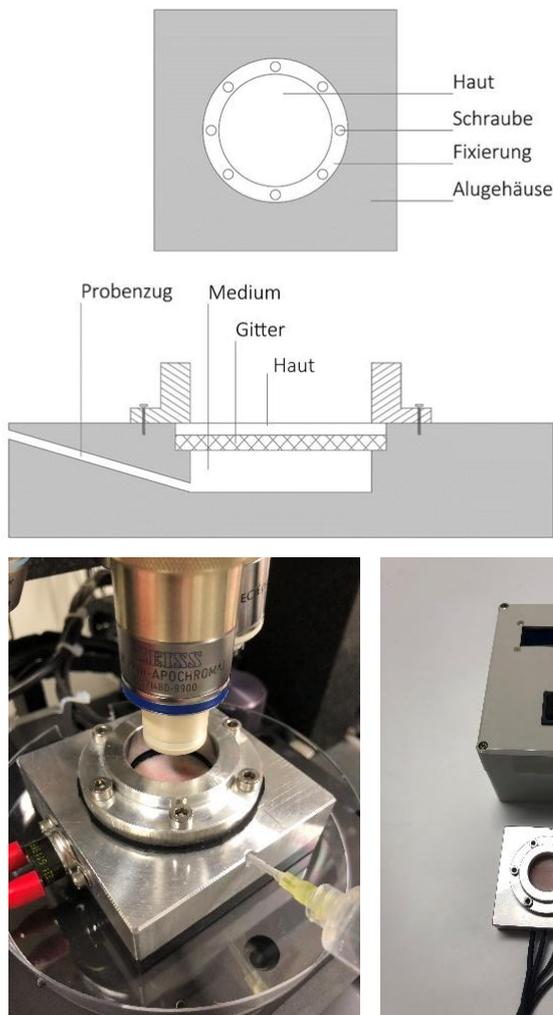


Abbildung 1: Schemazeichnung der Penetrationszelle (oben) und Bilder der Penetrationszelle unter dem Objektiv des Raman-Mikroskops (Unten links) sowie in der Aufsicht mit dem Steuergerät

Sie besteht aus Aluminium und enthält ein Akzeptorkompartiment mit einem Gesamtvolumen von 7 mL, einen Probenzug, einem Gitter zum Auflegen der Haut und einer Donor-Kammer, die über der Haut platziert und mit 6 Schrauben fixiert wird. Zwei Dichtungsringe sorgen dafür, dass die Zelle fest verschlossen ist. Um Wasserverluste während der Inkubationszeit zu vermeiden, wird ein Stück Parafilm um die Spenderkammer und das Objektiv des Raman-Mikroskops gespannt. Die Inkubationszelle wird durch zwei elektrische Thermoelemente beheizt, an denen ein externes Steuergerät angebracht ist, das während der gesamten Inkubationszeit auf 32,0 °C eingestellt ist.

Das Vorgehen bei der Untersuchung der Hautpenetration mit Hilfe dieser Zelle wird in Abbildung 2 beschrieben. Die Haut der Außenseite der Schweineohren wird exzidiert, gewaschen und in passende Stücke geschnitten. Anschließend wird sie bei -32 °C gelagert. Am Tag des Experiments wird das benötigte Hautstück aufgetaut und in die Diffusionszelle eingespannt. Das Akzeptorkompartiment wird mit Puffer (PBS pH 7,4) befüllt und die Zelle mit Hilfe von elektrischen Thermoelementen auf 32 °C temperiert. Anschließend wird die Formulierung in das Donor-Kompartiment eingefüllt, die Zelle unter das Objektiv des Mikroskops gebracht und das Objektiv in die Formulierung eingetaucht. Sodann kann die Messung nach verschiedenen Zeitpunkten erfolgen.

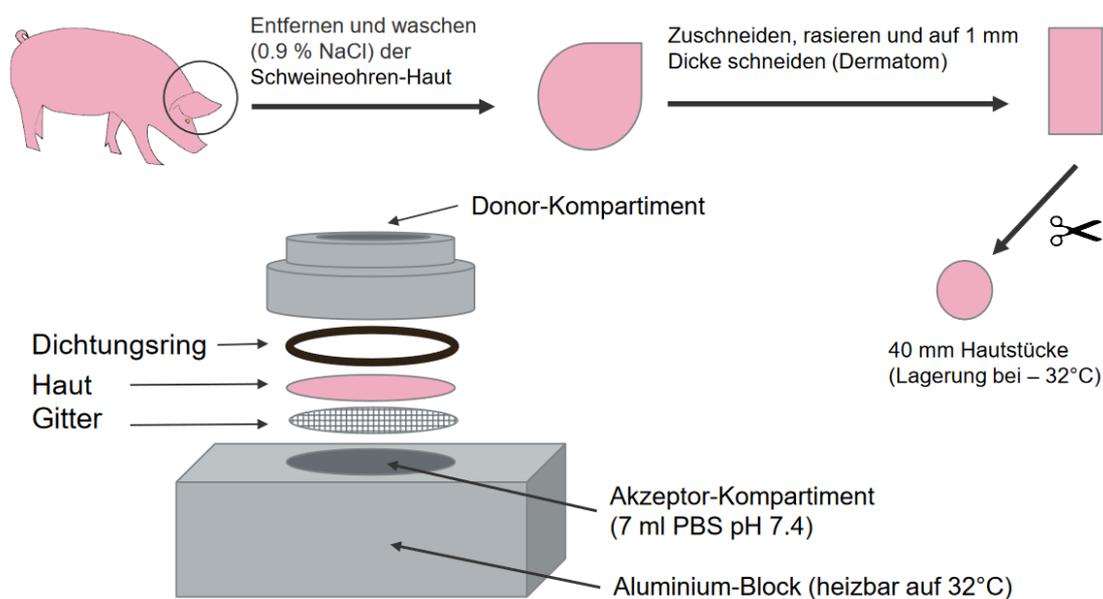


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Versuchsablaufs

Methodik der Raman-Spektroskopie bei der Untersuchung von Lösungen:

Für die In-situ-Messung wurde die Inkubationszelle auf den Scantisch eines konfokalen Raman-Mikroskops alpha 500 R (WITec GmbH, Ulm, Deutschland) gestellt und mit 4 Stiften am Boden der Zelle befestigt. Das Raman-Mikroskop ist mit einem 532-nm-Anregungslaser, einem UHTS 300-Spektrometer, einem DV401-BV-CCD-Detektor und einem 63x-Wasserimmersionsobjektiv mit einer numerischen Apertur von 1,0 (W "Plan-Apochromat" 63/1,0 M27, Carl Zeiss, Jena, Deutschland) ausgestattet. Um ein starkes Signal zu erhalten, ohne die Haut zu schädigen, wurde die Laserintensität auf 25 mW eingestellt, wobei eine Blende (optische Faser) von 50 µm verwendet wurde. Der DV401-BV CCD-Detektor wurde auf -60° C gekühlt und ein

Spektralbereich von 501 cm^{-1} bis 1635 cm^{-1} mit dem spektralen Zentrum von 1100 cm^{-1} durch ein optisches Gitter (1800 g/mm , spektrales Zentrum: 1100 cm^{-1}) aufgenommen. Es wurden zweidimensionale Bildabtastungen mit einer Breite von $5\text{ }\mu\text{m}$ und einer Tiefe von $25\text{ }\mu\text{m}$ durchgeführt, wobei 10 Spektren pro Zeile und 50 Zeilen pro vertikaler Dimension mit einer Integrationszeit von 1,5 s pro Spektrum aufgenommen wurden.

Um die Eignung des Aufbaus für die Tiefenprofilierung sicherzustellen, wurde die Tiefenauflösung gemessen, indem in eine Siliziumdioxidplatte gescannt und die volle Breite bei halbem Maximum des Tiefenprofils bestimmt wurde, das der Intensität der 521 cm^{-1} -Bande entspricht. Außerdem wurde die Dicke einer PET-Folie gemessen, um zu prüfen, ob gültige Tiefenprofile erhalten werden können.

Methodik der Raman-Spektroskopie bei der Untersuchung von Emulsionen:

Bei der Untersuchung der Emulsionen ist es nicht möglich das Objektiv in eine infinite Menge Formulierung einzutauschen, da dies die Spektrenqualität deutlich mindert. Es wurde daher ein leicht verändertes Vorgehen gewählt. Das Rezeptorkompartiment wurde mit 7,0 ml entgaster, vorgewärmter ($32\text{ }^{\circ}\text{C}$) phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) gefüllt, und eine Hautprobe wurde auf das Gitter darüber gelegt, wobei sichergestellt wurde, dass das Gitter vollständig mit PBS getränkt war. Wie bei den Franz-Diffusionszellen wurde das Spenderkompartiment darauf montiert und die Haut 30 Minuten lang bei $32\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperiert, bevor die Formulierung aufgetragen wurde. Zu diesem Zweck wurde ein Plexiglaszylinder verwendet, was zu einer Menge von $0,163\text{ mg/cm}^2$ Retinol pro Hautfläche führte. Da die Messungen mit einem Wasserimmersionsobjektiv durchgeführt wurden, wurde ein Quarzdeckglas auf die Formulierung gelegt, auf das ein Tropfen Wasser (Immersionsflüssigkeit) gegeben wurde, damit das Immersionsmedium die Formulierung nicht verdünnt. Die Inkubationszelle wurde unter dem Raman-Mikroskop befestigt, wobei das Objektiv in das Donorkompartiment ragte. Um die Verdunstung von Wasser während der Inkubationszeit zu verhindern, wurde Parafilm zwischen der Inkubationszelle und dem Objektiv gespannt. Die Spektrenauswertung erfolgte nach dem gleichen Schema, wie bei den Lösungen.

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.

Details:

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, aus dem resultierenden Raman-Spektrum mehrerer Komponenten den Anteil einer bestimmten Substanz zu bestimmen. Mit Hilfe moderner Algorithmen kann ein Datensatz auf verschiedene Komponenten analysiert werden, aus denen ein Spektrum besteht. Außerdem können Referenzspektren verwendet werden, um deren Anteil an einem gemessenen Spektrum zu berechnen. Diese Art der Datenverarbeitung hat den Vorteil, dass jede spektrale Eigenschaft berücksichtigt wird. Andererseits kann dies, insbesondere bei der Arbeit mit Referenzspektren, zu einer Verzerrung führen, da dem Algorithmus bereits vorgegeben ist, was er finden soll.

Eine weitere Möglichkeit, eine Verteilung zu berechnen, ist die Bestimmung der Fläche eines substanzspezifischen Peaks, was natürlich einen Peak voraussetzt, der nicht mit anderen Peaks interferiert. Da alle in diesem Projekt verwendeten Modellsubstanzen den Vorteil hatten, einen markanten Peak aufzuweisen (Abbildung y), der nicht durch Hautsignale gestört wird, wurde die Berechnung der Peakfläche zur Bestimmung der Tiefenprofile verwendet (Abbildung3).

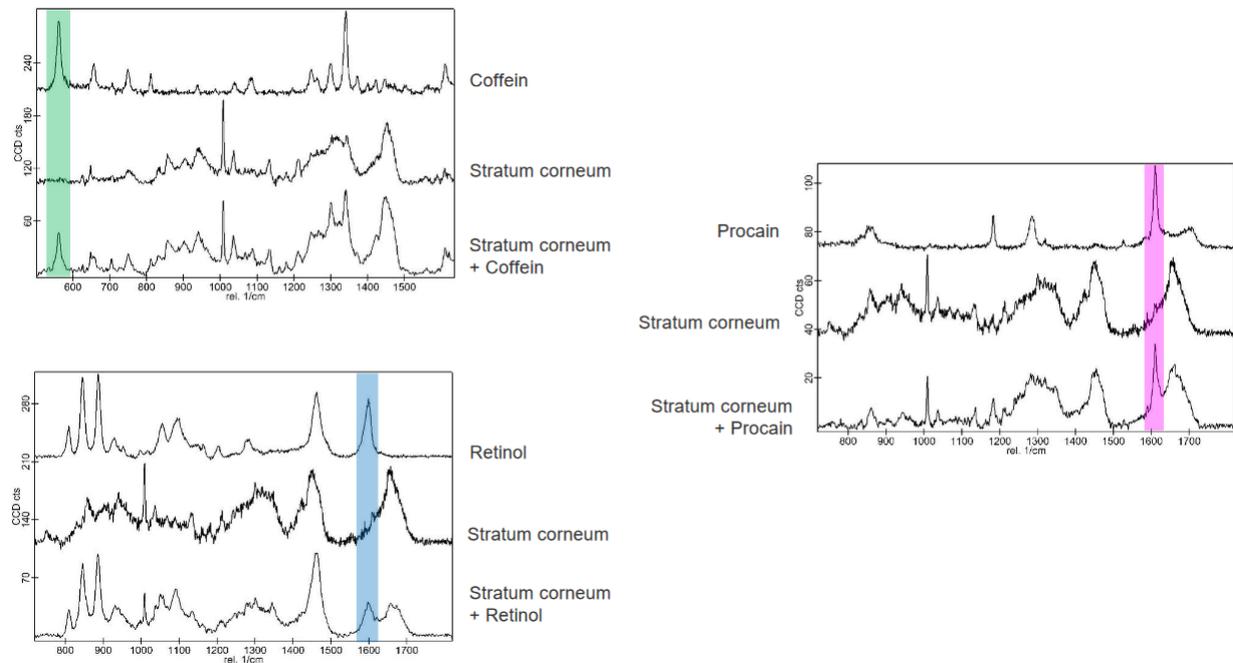


Abbildung 3: Repräsentative Spektren von Modellarzneistoffen (jeweils oberes Spektrum), Haut (jeweils mittleres Spektrum), und Haut, welche mit den Modellarzneistoffen inkubiert wurde (jeweils unteres Spektrum). Die markanten Peaks sind farblich markiert.

Dies ist aufgrund der linearen Abhängigkeit der Raman-Streuung und der Konzentration eines Moleküls möglich. Bei Messungen in der Tiefe tritt das Problem der Signalabschwächung auf, d. h. die lineare Abhängigkeit des Raman-Signals wird durch Absorption, Reflexion und Streuung beeinflusst, was zu einem allgemein schwächeren Signal führt. Daher ist es unumgänglich, diese Signalabschwächung zu kompensieren. Dies kann durch die Bestimmung des Tiefenprofils eines Peaks der Haut erfolgen, der von einer in der Haut homogen verteilten Komponente erzeugt wird. Indem man das Tiefenprofil für jede gemessene Tiefe durch seinen Maximalwert dividiert, erhält man einen Anpassungskoeffizienten für jeden gemessenen Tiefenschritt, mit einem Wert von 1 an der Hautoberfläche und niedrigeren Werten, je tiefer gemessen wurde. Diese Koeffizienten können verwendet werden, um die tiefenabhängige Signalabschwächung anderer Penetrationsprofilen zu kompensieren. Für alle in diesem Projekt ermittelten Tiefenprofile wurde die C-C-Streckschwingung der aromatischen Aminosäuren der Haut im Wellenzahlbereich von $995\text{-}1018\text{ cm}^{-1}$, auch als "ring breathing mode" bezeichnet, zur Kompensation der Signalabschwächung verwendet. Darüber hinaus wurde das Halbmaximum dieses Peaks zur Bestimmung der Hautoberfläche herangezogen, da das Halbmaximum den Übergang vom Immersionsmedium des verwendeten Objektivs zur Haut darstellt, wo exakt die Hälfte des Laserfokus in der Haut liegt.

Die finale Methode zur Spektrenauswertung sieht wie folgt aus: Alle aufgenommenen Spektren wurden mit der Software Project Plus 4 (WiTec GmbH, Ulm, Deutschland) durch Entfernung der kosmischen Strahlung und Hintergrundsubtraktion bearbeitet. Die Hintergrundsubtraktion wurde mit der Option "shape" (Größe: 400) durchgeführt. Zur Rauschunterdrückung wurde für alle Spektren eine Hauptkomponentenanalyse (PCA) durchgeführt, ebenfalls mit der Software Project Plus 4. Die PCA ist eine eigenvektorbasierte multivariate statistische Methode und wird häufig zur Vereinfachung und Strukturierung umfangreicher Datensätze verwendet. Die ersten drei Hauptkomponenten wurden für die Rekonstruktion eines reduzierten Spektrums ausgewählt, das

alle wesentlichen Informationen enthält und geringfügige Abweichungen und Rauschen ausschließt. Die Penetrationsprofile von Koffein wurden durch Berechnung der Fläche unter der Kurve (AUC) der Koffeinbande bei 556 cm^{-1} , die durch den O=C-N-Deformationsschwingung entsteht, bestimmt. Für Retinol wurde die Bande bei 1594 cm^{-1} (C=C Streckschwingung) verwendet. Für Procain wurde die Bande bei 1612 cm^{-1} gewählt. Diese Peaks wurden ausgewählt, weil er nicht von Signalen der Haut überlagert wird. Die Berechnung der AUC wurde ebenfalls mit der Software Project Plus 4 unter Verwendung der Trapez-Methode durchgeführt. Das Halbmaximum des Peaks der aromatischen Aminosäuren bei 1008 cm^{-1} wurde bestimmt, um die Position der Hautoberfläche zu bestimmen. Alle Tiefenprofile wurden auf die Hautoberfläche zugeschnitten, da die Messung etwa $2\text{ }\mu\text{m}$ oberhalb der Haut begonnen wurde. Da es in tieferen Hautregionen zu einer Signalabschwächung und zeitlichen Schwankungen kommt, wurde das arithmetische Mittel des Peaks der aromatischen Aminosäuren bei 1008 cm^{-1} (ring breathing mode) zur Normalisierung des Koffeinsignals verwendet. Aus jedem Imagescan wurden drei Tiefenprofile berechnet und extrahiert, so dass insgesamt 9 Tiefenprofile für jede Lösung verwendet wurden, um das mittlere Penetrationsprofil einer bestimmten Formulierung zu berechnen. Zur Berechnung des enhancement ratios (Penetrations-Verbesserungs-Quotient) wurde die Fläche unter der Kurve der Tiefenprofile nach der Trapezmethode bestimmt und die AUC der Lösung mit Penetrationsverbesserer durch die AUC der Lösung ohne Penetrationsverbesserer geteilt. Das Vorgehen ist schematisch dargestellt in Abbildung 4.

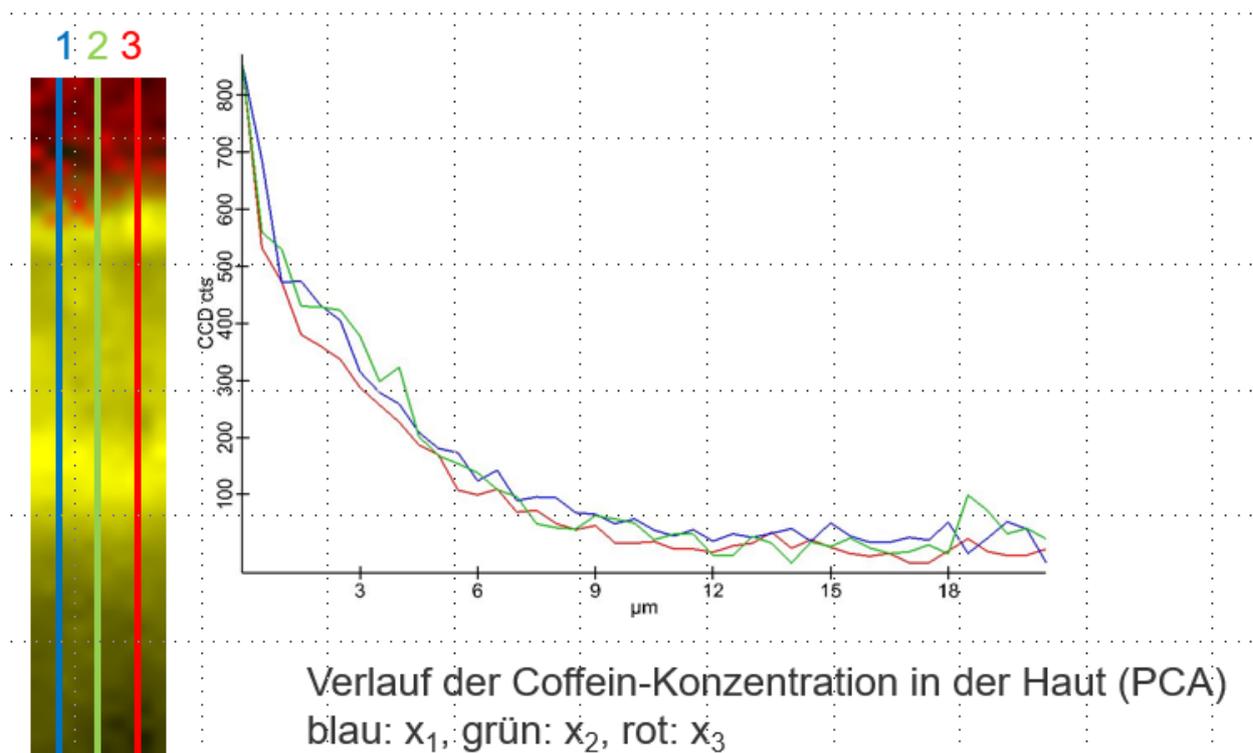


Abbildung 4: schematische Darstellung der Extraktion der Tiefenprofile aus einem image scan.

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.

Details:

Folgende Lösungen wurden untersucht:

- Coffein 2 % in Wasser
- Coffein 2 % in Wasser mit 5 % 1,2-Pentandiol
- Retinol in mittelkettigen Triglyceriden
- Retinol in Ethanol:Propylenglycol 50:50
- Procain 1 % in Wasser
- Procain 1 % in Wasser mit 5 % PEG-23-Laurylether als Penetrationsverbesserer

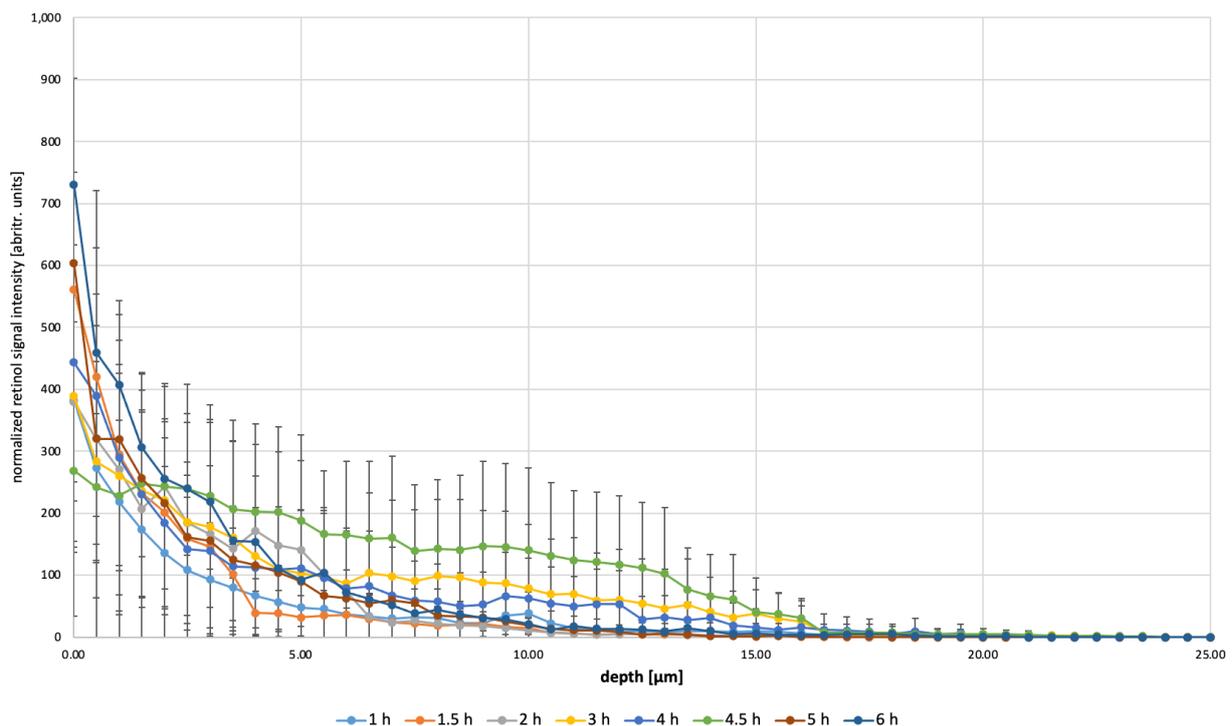


Abbildung 5: Hautpenetrationsprofile von Coffein aus einer 2 % Lösung

Abbildung 5 zeigt die Ergebnisse der In-situ-Messungen der Coffein-Hautpenetration während einer gesamt-Inkubationszeit von 6 Stunden. Die Raman-Intensität des Coffein-Peaks bei 556 cm^{-1} ist als Funktion der Hauttiefe dargestellt, beginnend an der Hautoberfläche. Die

aufgezeichneten Tiefenprofile zeigen deutlich eine kontinuierliche Penetration von Koffein in die Haut über die Inkubationszeit von 6 h. Die Anwesenheit von Coffein im Stratum corneum kann bereits nach 1 h detektiert werden. Insbesondere in den ersten 10 μm ist ein kontinuierlicher Anstieg des Koffeinsignals über die Inkubationszeit zu erkennen. Darüber hinaus steigt die Gesamt-Penetrationstiefe von 5 μm auf 20 μm nach 6 h an. Die gemessenen Penetrationsprofile stimmen mit denen von L. Franzen et. al. für 12,5 ml/mg Koffeinlösungen gemessenen Tiefenprofilen überein, wobei zu berücksichtigen ist, dass die in dieser Arbeit verwendeten Lösungen deutlich höher konzentriert sind [30]. Während der größte Teil des Wirkstoffs innerhalb der ersten 5 Stunden im SC zu finden ist, was auch von Laia Rubio et. al. festgestellt wurde [31], konnte Coffein nach 6 Stunden Inkubation sogar in 20 μm Eindringtiefe gefunden werden.

Abbildung 6 zeigt die Penetrationsprofile von Procain nach 15 min bis zu 38 h. Hier kann eine deutliche Erhöhung der in der Haut befindlichen Menge Procain ab 14 h Inkubationszeit erkannt werden. Die penetrierte Menge ist in allen Hautschichten deutlich erhöht gegenüber den Werten nach 15 min.

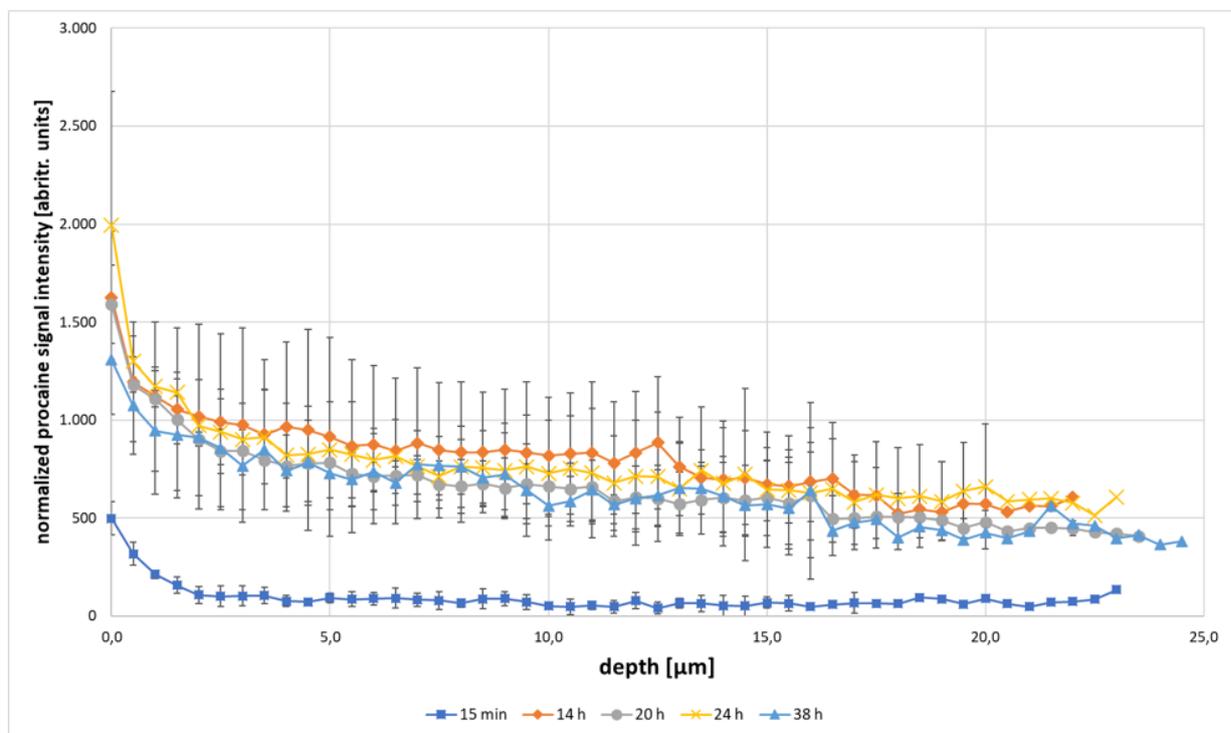


Abbildung 6: Hautpenetrationsprofile von Procain aus einer 1 % Lösung

Die Ergebnisse der Penetration aus der Lösung mit dem Penetrationsverbesserer PEG-23-larylether sind in Abbildung 7 dargestellt. Hier ist zu erkennen, dass es bei verlängerten Inkubationszeiten zu extremen Schwankungen in der detektierten Procain-Menge kommt. Als Grund hierfür wurde eine extreme Quellung des Stratum corneum, bis hin zum Ablösen von einzelnen Stratum corneum Schichten von der darunter liegenden Haut erkannt. Dies zeigt das Falschfarbenbild auf der rechten Seite. Hier ist ein zweidimensionales Falschfarbenbild der Haut während der Inkubation zu sehen. Die Haut ist in gelb-orange dargestellt, das wässrige Vehikel in blau. Es ist zu erkennen, dass sich im Laufe von 24 h große wassergefüllte Bereiche knapp unter der Hautoberfläche bilden. Dies sind stark gequollene Keratinozyten. In der Folge lösen sich diese z. T. von der Haut ab. Durch die Quellung und die Ablösung werden die Messergebnisse verfälscht. Daher wurde auf eine weitere Untersuchung der Penetration von Procain aus der

Lösung mit Penetrationsverbesserer verzichtet. Procain wurde in späteren Untersuchungen aus einem Gel untersucht. Dort kam es zu keiner übermäßigen Quellung (siehe Arbeitspaket 5) und die Penetration konnte erfolgreich charakterisiert werden.

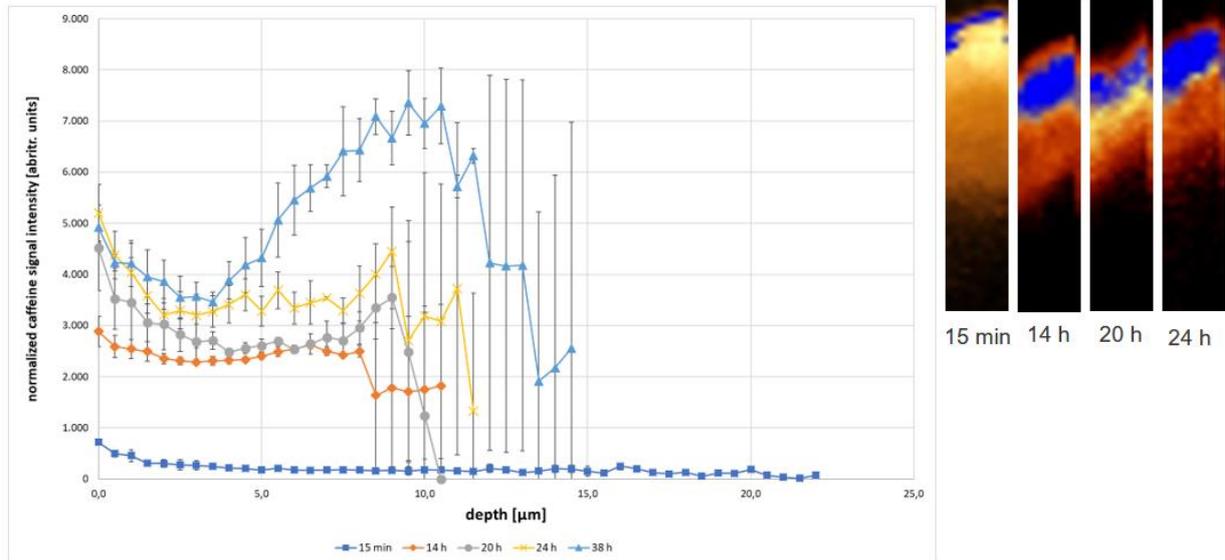


Abbildung 7: Hautpenetrationsprofile von Procain aus einer 1 % Lösung mit PEG-23-Laurylether (links) und die zugehörigen Falschfarbenbilder (Image Scans) der inkubierten Haut (Haut: gelb-orange; Wasser: blau)

Retinol ist nicht wasserlöslich, daher wurde seine Penetration aus einer Lösung in mittelkettigen Triglyceriden und einer Lösung in Ethanol und Propylenglycol im Verhältnis 50:50 untersucht. Diese beiden Lösungsmittel wurden gewählt wie sie unterschiedliche Hydrophilie/Lipophilie aufweisen und so ein unterschiedliches Penetrationsverhalten erwartet wurde. Die Ergebnisse sind in den nachfolgenden Abbildungen 8 & 9 zu sehen.

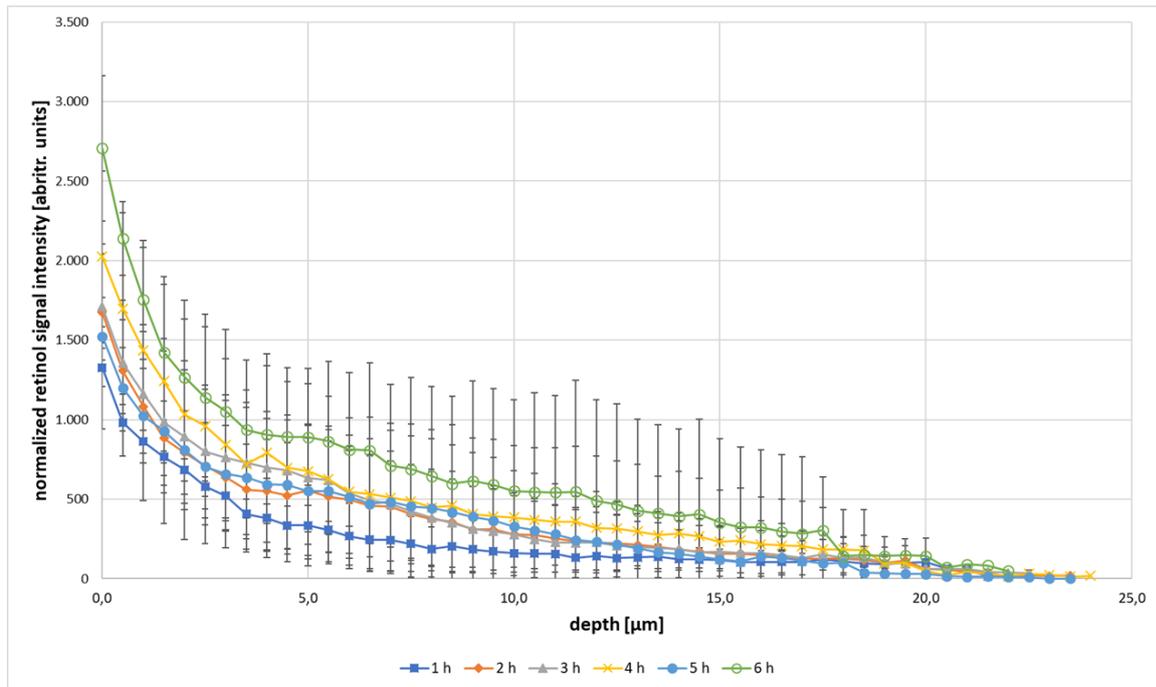


Abbildung 8: Penetrationsprofile von Retinol aus einer Lösung in Ethanol und Propylenglycol im Verhältnis 50:50

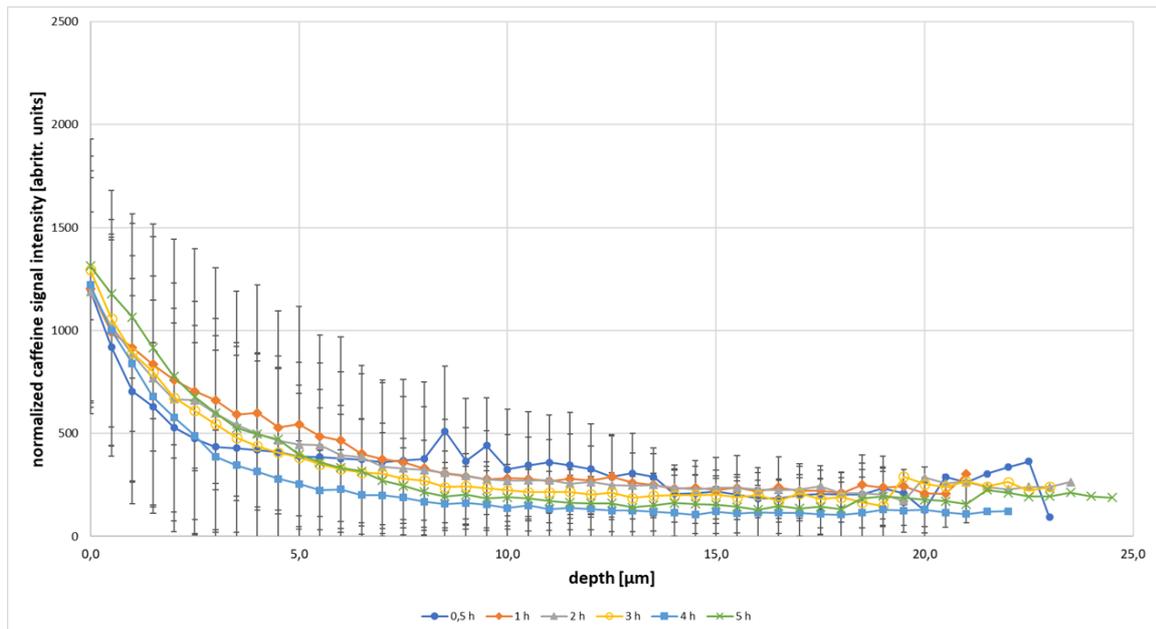


Abbildung 9: Penetrationsprofile von Retinol aus einer Lösung in mittelkettigen Triglyceriden

Die Penetration von Retinol wurde über insgesamt 6 Stunden beobachtet. Die penetrierte Menge ist jeweils an der Hautoberfläche am größten und nimmt zu tieferen Schichten hin ab. Penetriert Retinol aus Ethanol-Propylenglycol, so nimmt die penetrierte Menge in allen Tiefen über die Inkubationszeit zu. Nach 6 Stunden werden die höchsten Retinolemengen an der Hautoberfläche und in der Tiefe der Haut gemessen. Penetriert Retinol aus mittelkettigen Triglyceriden, so werden ebenfalls die größten Mengen an der Hautoberfläche gefunden und die Mengen nehmen über die Tiefe ab. Es ist jedoch kaum ein Unterschied zwischen den verschiedenen Messzeitpunkten gegeben. D. h. die Penetration nimmt über 6 Stunden nicht zu. Dieses

Verhalten lässt sich mit der Lipophilie von Retinol erklären. Das Ethanol-Propylenglycol-Vehikel ist hydrophil, während Retinol und das Stratum corneum lipophil sind. Daher verteilt sich Retinol bevorzugt in das Stratum corneum. Mittelkettige Triglyceride hingegen sind lipophil. Retinol verbleibt daher im Vehikel, das die Treibende Kraft für eine Umverteilung in das Stratum corneum fehlt.

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.

Details:

Da die Haut durch 12 Klebebänder segmentiert wird, führt dies zu 12 Datenpunkten für jedes Tiefenprofil. Die entsprechende Hauttiefe wird als Klassenmittelpunkt der von jedem Klebeband entfernten Hautschichten angezeigt, da die Menge der entfernten Haut und damit die berechnete Hauttiefe für jedes verwendete Klebeband variiert. Da die Coffein-Menge in jedem Klebeband quantifiziert wird (μg), ist die Darstellung der Coffein-Menge als Funktion der Tiefe mit den Ergebnissen der Klebebandabrisse vergleichbar. Zur besseren Vergleichbarkeit mit den Ergebnissen der CRM-Messungen wird hier in den Tiefenprofilen die Koffeinmenge pro Hautvolumen (Konzentration; mg/cm^3) als Funktion der Hauttiefe dargestellt. Bei CRM-Messungen wird die Menge des Wirkstoffs innerhalb eines Volumens (des Laserfokusvolumens) nachgewiesen, was eine Konzentration ergibt; daher wurde die Coffein-Konzentration in der Haut auch für alle Klebebandabrissergebnisse berechnet. Abbildung 10 zeigt die Hautpenetrationsprofile von Coffein während einer Gesamtinkubationszeit von 3 Stunden, die durch HPLC-Analyse von Hautproben gewonnen wurden, die mittels Klebebandabrisstechnik segmentiert wurden.

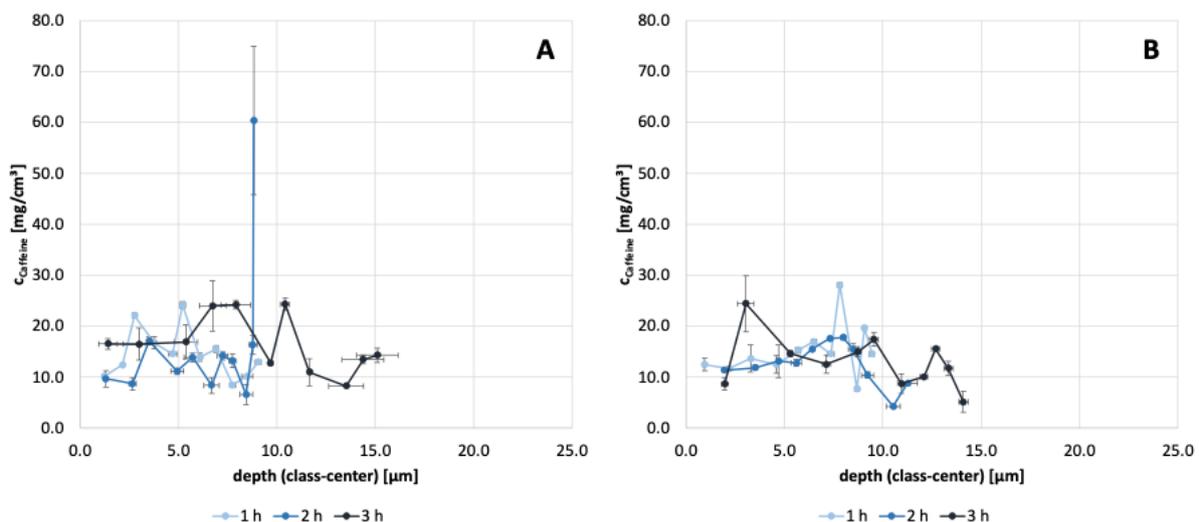
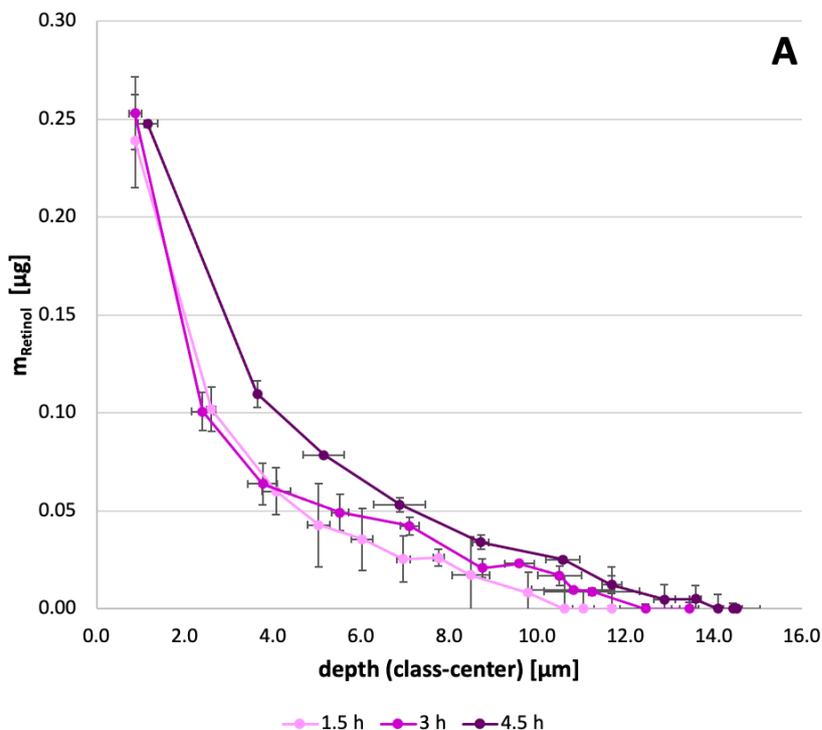


Abbildung 10: Hautpenetrationsprofile von Coffein über 3 h aus einem 2 % Hydrogel (A) und einem 2 % Hydrogel + 5 % 1,2-Pentandiol.

Nach 1-stündiger Inkubation mit Gel 1 kann Coffein innerhalb der ersten 10 µm nachgewiesen werden. Da mit den Klebestreifen nur wenig Haut entfernt wurde, befinden sich alle 12 Datenpunkte innerhalb der ersten 10 µm der Hauttiefe. Dies ist auch nach 2 Stunden Inkubationszeit der Fall, nur der letzte Datenpunkt zeigt einen signifikanten Anstieg, der auf eine Konzentration von über 60 mg/cm³ hinweist. Das bedeutet, dass der letzte extrahierte Streifen nur eine geringe Massendifferenz aufwies, was zu diesem hohen Konzentrationswert führt, da die angezeigte Koffeinkonzentration aus der extrahierten Coffein-Menge und dem Stratum corneum-Volumen, bestimmt durch die Massendifferenz des Klebebands vor und nach dem Abziehen, berechnet wurde. Nach 3 Stunden Inkubationszeit nimmt die Gesamtpenetrationstiefe zu, Koffein kann sogar unterhalb von 15 µm Hauttiefe nachgewiesen werden. Mit dem Zusatz von 5 % (w/w) 1,2-Pentandiol kann Koffein nach 2 h Inkubationszeit unterhalb von 10 µm nachgewiesen werden, während der Verlauf nach 1 h ähnliche Penetrationseigenschaften aufweist, wie nach der Inkubation mit Gel 1. Trotz des Penetrationsverstärkers kann nach einer Inkubationszeit von 3 h kein Koffein unterhalb von 15 µm nachgewiesen werden.

Die Ergebnisse zu Koffein wurden publiziert als: Krombholz, R, Fressle, S, Nikolić, I, et al. ex vivo–in vivo comparison of drug penetration analysis by confocal Raman microspectroscopy and tape stripping. *Exp Dermatol.* **00** 1- 12 (2022)

Abbildung 11 zeigt die Hautpenetrationsprofile von Retinol während einer Gesamtinkubationszeit von 4,5 Stunden, die durch HPLC-Analyse von Hautproben gewonnen wurden, die mittels Klebebandabrisstechnik segmentiert wurden.



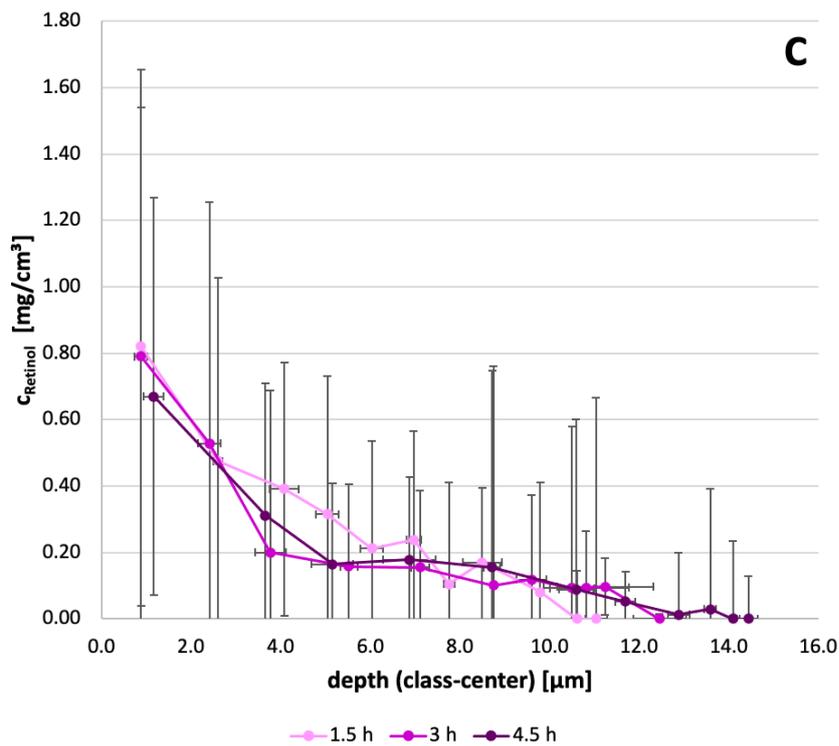
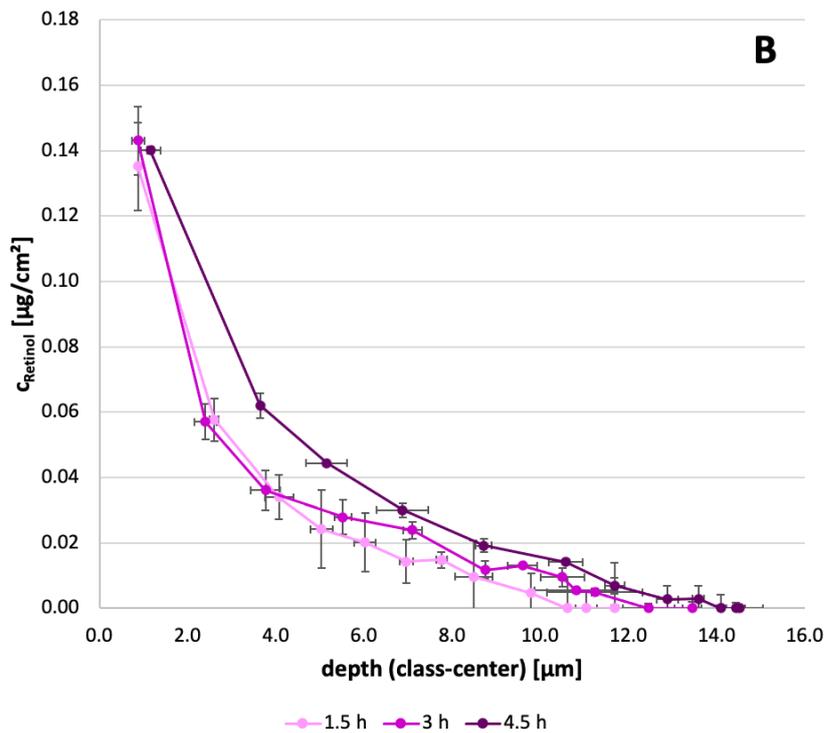


Abbildung 11: Hautpenetrationsprofile von Retinol aus einer 0,25 % Emulsion

Da für jeden Versuch 12 Klebebänder verwendet wurden, besteht jedes Tiefenprofil aus 12 Datenpunkten. Die in jedem Klebeband detektierte Retinol-Menge kann als Medianwert dargestellt werden (Abbildung 11 A). Für die entsprechende Hauttiefe wird die Klassenmitte der von den entsprechenden Klebebändern entfernten Hautschichten dargestellt, da die Menge der von jedem Klebeband entfernten Haut und damit die Hauttiefe bei jedem Klebeband stark variiert.

Bei den Klebebandabriss-Experimenten wird die absolute Menge, die aus jedem Klebeband extrahierten Retinols ermittelt. Die Penetrationsprofile, welche die Menge im Verhältnis zur entsprechenden Hauttiefe zeigen, sind in Abbildung 11 dargestellt. Zur besseren Vergleichbarkeit mit den CRM-Ergebnissen werden die Tiefenprofile auch als Funktion der Retinol-Menge pro Hautfläche ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) über die Tiefe dargestellt, da bei den Franz-Zell-Experimenten und den CRM-Messungen aus technischen Gründen unterschiedliche Applikations-Flächen untersucht wurden (Abbildung 11 B). Da man bei CRM die Menge einer Substanz innerhalb eines Volumens (das des Laserfokusvolumens) misst, gibt es die Retinol-Konzentration in der Haut an. Daher sind die Ergebnisse der Klebebandabrisstechnik auch als Funktion der Retinol-Konzentration in der Haut (mg/cm^3) dargestellt (Abbildung 11 C). Die höchsten Mengen/Konzentrationen werden innerhalb der ersten $5\ \mu\text{m}$ des Stratum corneum erreicht und die Gesamt-Penetrationstiefe liegt unter $15\ \mu\text{m}$. Die Tiefenprofile zeigen einen leichten Anstieg der Retinol-Konzentration in der Haut im Laufe der Inkubationszeit. Wie erwartet, sind die höchsten Retinol-Mengen in der Haut nach 4,5 Stunden Inkubationszeit zu finden.

Die Diagramme, die die Menge/Fläche gegen die Tiefe darstellen, zeigen die gleichen Kurvenverläufe wie das Diagramm, das die Menge gegen die Tiefe darstellt, während die absoluten Werte um den Faktor zwei abnehmen. Dies war zu erwarten, da die ermittelte Menge nur von einer Fläche von $2\ \text{cm}^2$ (Penetrationsfläche in den Franz-Zellen) auf eine Fläche von $1\ \text{cm}^2$ normalisiert wurde. Bei der Darstellung als Retinol-Menge pro Hautvolumen, wie in Abbildung 6 B dargestellt, liegen die Konzentrationen zwischen 0 und $0,82\ \text{mg}/\text{cm}^3$.

Die Ergebnisse zu Retinol wurden publiziert als: Krombholz, R. Fressle, S. & Lunter, D, Ex vivo— In vivo correlation of retinol stratum corneum penetration studies by confocal Raman microspectroscopy and tape stripping. *Int J Cosmet Sci.* **44** 299– 308 (2022).

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 ($2\ \text{mg}/\text{cm}^2$) 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.

Details:

Es wurden folgende Formulierungen untersucht:

- Coffein-Gel 2%
- Coffein-Gel 2% mit 5 % 1,2-Pentandiol als Penetrationsverbesserer
- Procain-Gel 1 %
- Procain-Gel 1 % mit 5 % PEG-23-Laurylether als Penetrationsverbesserer

Die Herstellung der Gele ist nachfolgend beschrieben.

Tabelle 1 zeigt die Zusammensetzung der verwendeten Kaffeingele. Kaffeingele wurden mit einem Labormischer (Unguator, Gako International GmbH, München, Deutschland) unter Verwendung des Gelprogramms hergestellt.

Tabelle 1: Zusammensetzung der Koffein-Gele

	Gel 1 [%]	Gel 2 [%]
Koffein	2.0	2.0
1,2-Pentandiol	-	5.0
Carbomer	0.5	0.5
NaOH-Lösung (5 %)	3.0	3.0
Wasser	94.5	89.5

Die HPMC-Poloxamer-Gele wurden nach der folgenden Methode hergestellt: Die Formulierung ohne Penetrationsverstärker enthielt 1 g Procain-HCl, 0,2 g Hydroxypropyl-Methylcellulose (HPMC), und 2 g Poloxamer 407 in 6,8 g Wasser. Die Formulierung mit Penetrationsverstärker enthielt zusätzlich 0,5 g PEG-23-Laurylether. Der Wassergehalt wurde damit auf 6,3 g reduziert. Die Inhaltsstoffe der Formulierung sind in Tabelle 2 detailliert beschrieben.

Tabelle 2: Zusammensetzung der Procain-Gele

	Gel 1 [%]	Gel 2 [%]
Procain-HCl	1,0	1,0
PEG-23-Laurylether	-	0,5
HPMC	0,2	0,2
Poloxamer	2,0	2,0
Wasser	6,8	6,3

Abbildung 12 zeigt die Ergebnisse der ex-vivo-CRM-Messungen der Coffein-Hautpenetration während einer Inkubationszeit von 3 Stunden mit zwei verschiedenen Coffein-Gele (A: 2 % Coffein, B: 2 % Coffein + 5 % 1,2-Pentandiol).

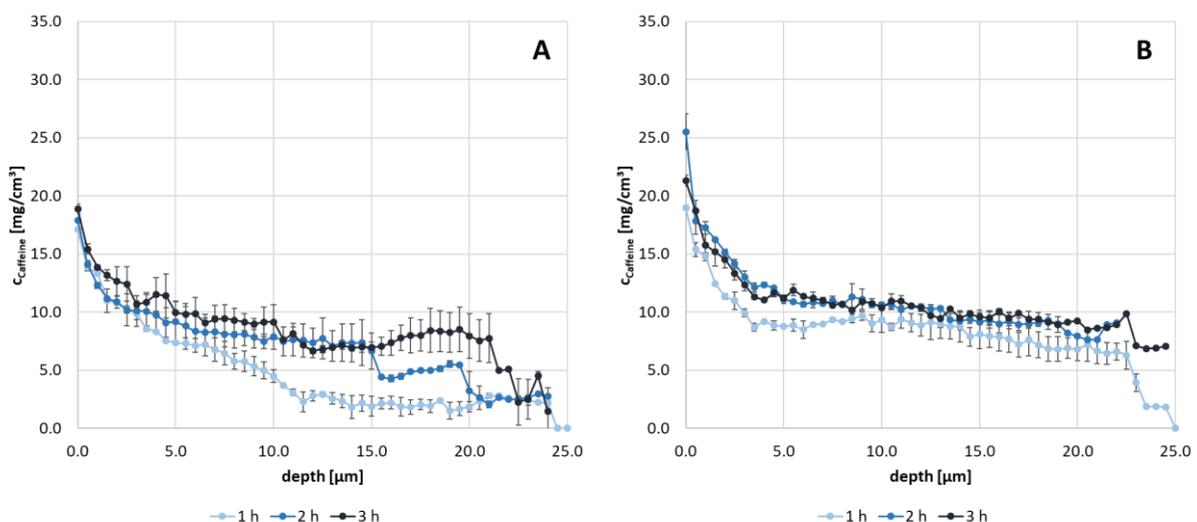


Abbildung 12: Hautpenetrationsprofile von Coffein über 3 h aus einem 2 % Hydrogel (A) und einem 2 % Hydrogel + 5 % 1,2-Pentandiol.

Ausgehend von der Hautoberfläche ist die Coffein-Menge pro Hautvolumen als Funktion der Tiefe dargestellt. Über die Inkubationszeit von 3 Stunden mit Gel 1 ist ein stetiger Anstieg der Coffeinkonzentration in der Haut über die Zeit zu erkennen. Nach der ersten Stunde befindet sich der größte Teil des Coffeins innerhalb der ersten 10 µm der Hauttiefe und erreicht eine Gesamtpenetrationstiefe von etwa 15 µm. Diese Gesamtpenetrationstiefe nimmt auch in den folgenden zwei Stunden der Inkubationszeit stetig zu. Insbesondere zwischen 15 und 20 µm Hauttiefe nimmt die Koffeinkonzentration mit der Zeit deutlich zu. Der Zusatz von 5 % (m/m) 1,2-Pentandiol als Penetrationsverstärker führt zu einer erhöhten Koffeinkonzentration in der Haut für alle drei Zeitpunkte. Nach 1 Stunde zeigt das Penetrationsprofil ähnliche Eigenschaften wie das Penetrationsprofil nach 3-stündiger Inkubation mit Gel 1, bei dem Coffein sogar unterhalb von 20 µm Hauttiefe gefunden werden kann. Im Vergleich zur Inkubation mit Gel 1 werden die erhöhten Coffein-Konzentrationen in tieferen SC-Tiefen früher erreicht.

Die Ergebnisse zu Koffein wurden publiziert als: Krombholz, R, Fressle, S, Nikolić, I, et al. *ex vivo*–*in vivo* comparison of drug penetration analysis by confocal Raman microspectroscopy and tape stripping. *Exp Dermatol.* **00** 1- 12 (2022)

Zur Untersuchung der Penetration von Procain wurde ein HPMC-Poloxamer-Hydrogel verwendet. PEG-23-Laurylether (L23) wurde der Formulierung als Penetrationsverstärker zugesetzt. Nach Inkubationszeiten von 14, 20 und 24 Stunden wurden die Hautpenetrationsprofile bewertet. Bei der Untersuchung der Penetration von Procain aus Gelen wurden die Ergebnisse der *in-situ*-Methode (*in-line*-Messungen) mit Ergebnissen verglichen, bei denen die Haut zunächst in Franz-Diffusionszellen inkubiert und anschließend mit dem Raman-Mikroskop untersucht wurden (*offline*-Messungen). Unser Ziel war es, die Unterschiede zwischen der Verwendung von *In-line*- und *Offline*-Geräten zur Überwachung des Eindringens von Arzneimitteln in die Haut zu vergleichen. Abbildung 13 zeigt die Ergebnisse der *In-situ*-Messungen der Hautpenetration von Procain-HCl aus einem Hydrogel (grün: 10 % Procain-HCl; rot: 10 % Procain-HCl + 5 % PEG-23-Laurylether) während einer Inkubationszeit von insgesamt 24 Stunden (A: 14 h; B: 20 h; C: 24 h). Es sind jeweils die Penetrationsprofile mit und ohne Penetrationsverbesserer gegenübergestellt.

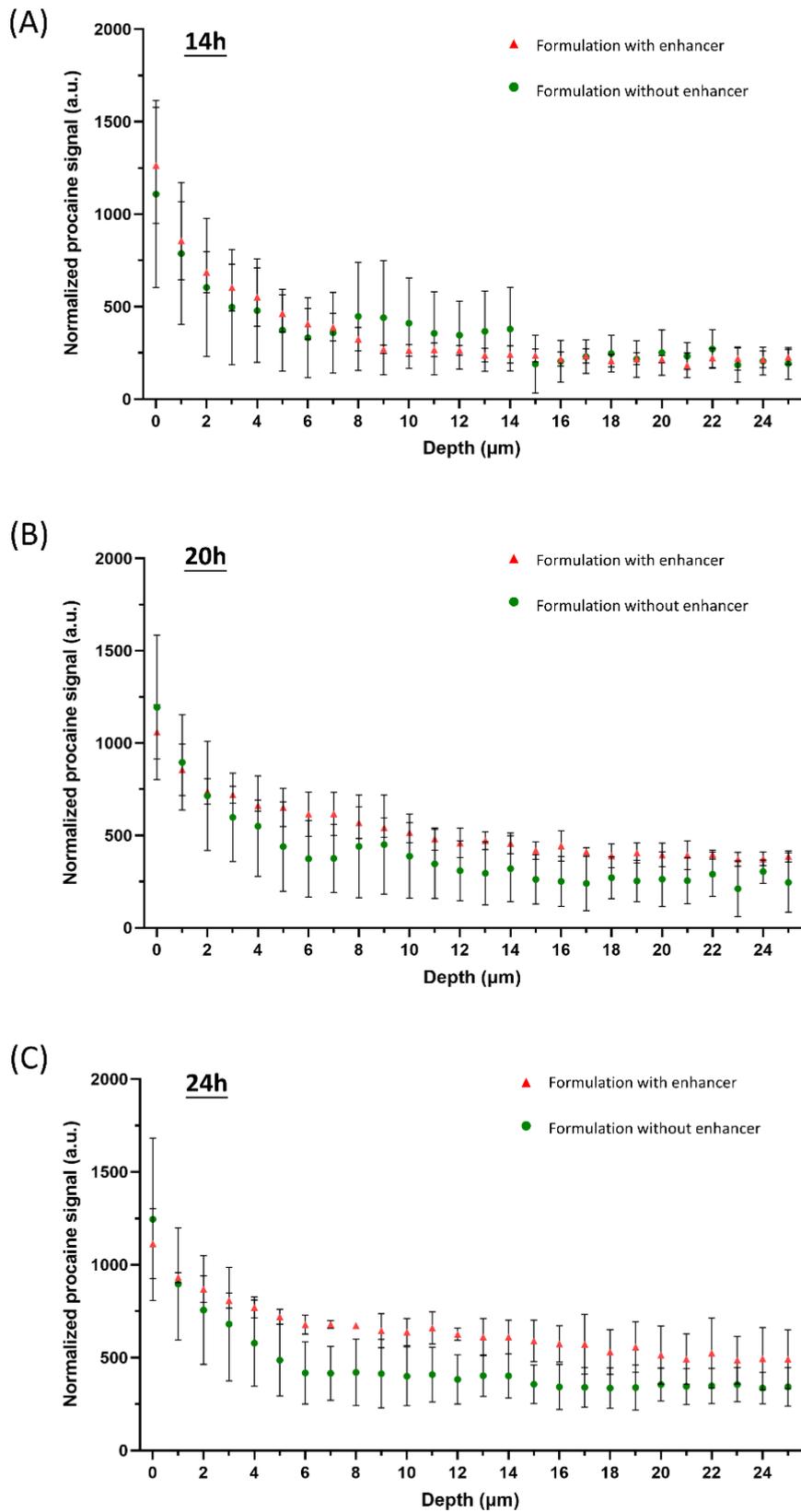


Abbildung 13: Hautpenetrationsprofile von Procain-HCl aus einem 10 % Hydrogel (grün) und einem 10 % Hydrogel + 5 % PEG-23-Laurylether (rot) über 24 h.

Bei beiden Formulierungen konnte Procain nach 14 Stunden in 20 μm Hauttiefe und sogar noch tiefer gefunden werden (Abbildung 5A), obwohl der größte Teil des Wirkstoffs innerhalb der ersten 10 μm der Haut nachgewiesen wurde. Wie erwartet, zeigt das Penetrationsprofil der Formulierung mit dem Penetrationsverstärker ein höheres Procain-Signal innerhalb der ersten 7 μm des Stratum corneum. Nach 20 Stunden Inkubationszeit ist der Verstärkungseffekt von PEG-23-Laurylether deutlich sichtbar. Die höchste Procain-Menge wurde bei beiden Formulierungen in den ersten 10 μm des Stratum corneum gefunden. Während das Procain-Signal der Referenzformulierung nach 5 μm deutlich abnahm, zeigt das Profil der Formulierung mit Penetrationsverstärker einen flacheren Verlauf, mit einem deutlichen Procain-Signal auch unterhalb von 20 μm Hauttiefe. Der Verstärkungseffekt ist nach 24 Stunden noch ausgeprägter. Wie Abbildung 5C zeigt, ist die Procain-Menge im Stratum corneum nach Inkubation mit PEG-23-Laurylether als Penetrationsverstärker deutlich höher. Die größte Procain-Menge findet sich bei beiden Formulierungen in den ersten 10 μm der Hauttiefe, obwohl die Abnahme des Procain-Signals bei der Referenzformulierung deutlicher ist. Unterhalb von 20 μm Hauttiefe konnte Procain für beide Formulierungen nachgewiesen werden, wobei das Signal in beiden Fällen im Vergleich zu den vorherigen Zeitpunkten deutlich stärker war. Nach 14 Stunden befindet sich Procain hauptsächlich in den ersten 10 μm des Stratum corneum. Unterhalb von 10 μm der Haut zeigen beide Formulierungen die gleichen Merkmale, da der Verlauf flacher wird. In 20 μm Hauttiefe ist jedoch immer noch ein Signal des Wirkstoffs vorhanden. Abbildung 14 zeigt die Flächen unter den Kurven (AUCs) als Maß für die gesamte penetrierte Menge Procain. Insgesamt wurden vergleichbare Ergebnisse zwischen Offline- und Inline-Messungen erzielt. Die penetrierte Menge nimmt über den Zeitraum von 24 h zu. Durch den Penetrationsverbesserer wird mehr Procain in die Haut eingebracht. Ein leichter Unterschied der penetrierten Menge im Vergleich der inline- mit der offline-Messung ist nach 14 Stunden Inkubationszeit festzustellen, was auf Unterschiede in der Methodik und der Hauteigenschaften der verwendeten Hautproben zurückzuführen sein könnte. Insgesamt könnten Inline-Messungen eine zeit- und arbeitssparende Alternative zu Offline-Messungen in ex-vivo-Studien darstellen. Korrelierende Penetrationseigenschaften wurden auch von L. Binder et al. [33] in ihrer Interlab-Vergleichsstudie beschrieben, wo die gleichen Hydrogele verwendet wurden. Da in der genannten Studie zwei verschiedene CRM-Geräte verglichen wurden, wurde der Einfluss des entsprechenden experimentellen-Set-ups bereits beschrieben.

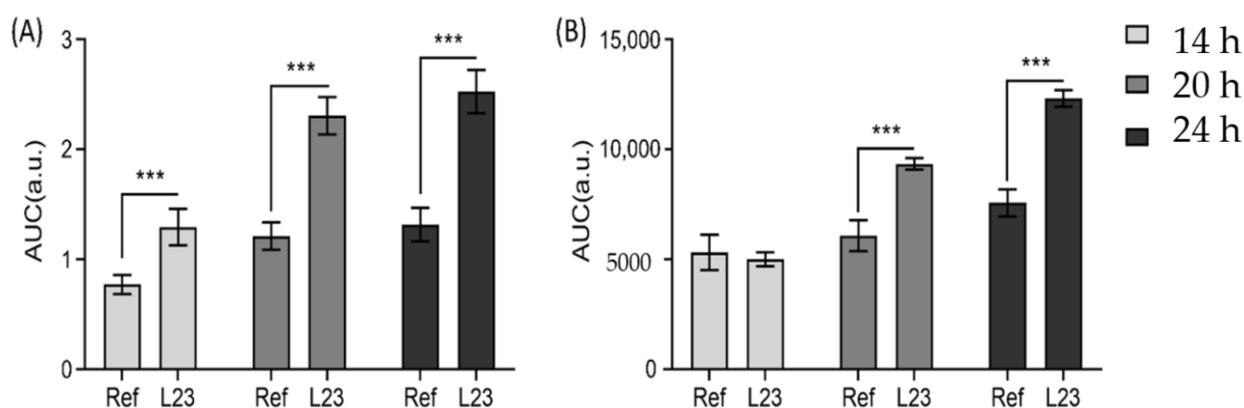


Abbildung 14: Vergleich der Flächen unter den Kurven (AUC) von Offline- (A) und Inline- (B) Messungen zwischen der Formulierung mit Penetrationsverbesserer (L23) und Formulierung ohne Penetrationsverbesserer (Ref) zu verschiedenen Zeitpunkten (14, 20 und 24 h).

Die Ergebnisse zu Procain wurden veröffentlicht als: Yali Liu, Richard Krombholz, Dominique Jasmin Lunter, Critical parameters for accurate monitoring of caffeine penetration in porcine skin using confocal Raman spectroscopy, International Journal of Pharmaceutics, **607**, p. 121055 (2021)

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 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.

Details:

Verwendete Formulierung:

- Öl-in-Wasser-Emulsion mit 0,25% Retinol

Retinol wurde als HPMC-stabilisierte Emulsion formuliert. Zu diesem Zweck wurde HPMC in heißem Wasser ($80 \text{ }^\circ\text{C}$) dispergiert, auf dem Magnetrührer gerührt und anschließend über Nacht bei $8 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert, bis eine klare Lösung entstand. Retinol wurde in mittelkettigen Triglyceriden gelöst, bevor die HPMC-Lösung zugegeben wurde, und die Mischung wurde 5 Minuten lang (9500 U/min) mit einem Ultra-Turrax T25 (IKA Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland) homogenisiert.

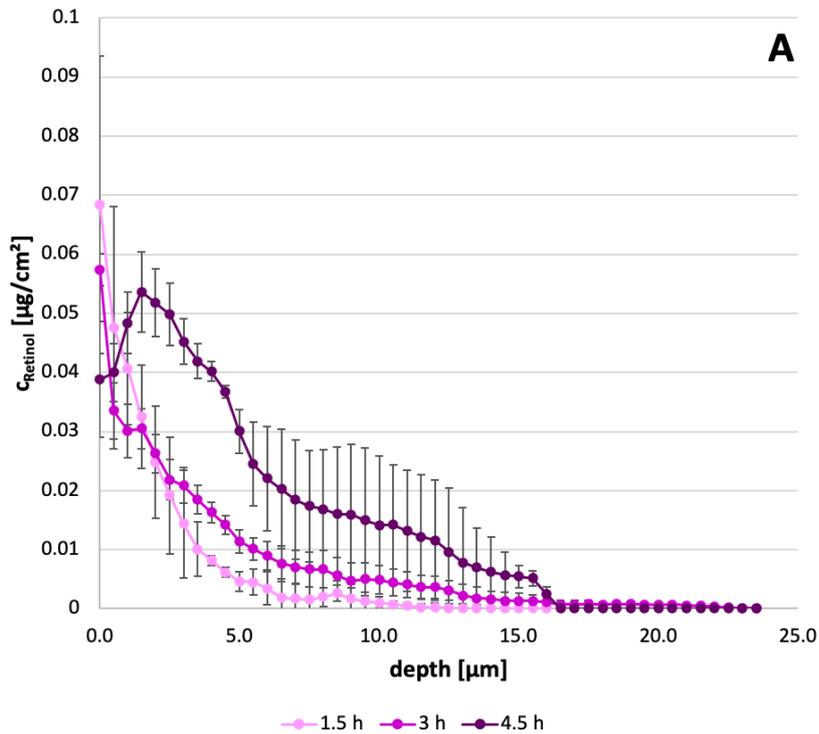
Zur Quantifizierung der durch CRM in der Haut gemessenen Retinol-Menge wurde eine Methode von Caspers et. al. verwendet [32]. Hierbei wurden Lösungen von Retinol in Ethanol mit Massenverhältnissen von 0,01, 0,5, 1, 5 und 10 mg/g (Retinol:Ethanol) hergestellt. Außerdem wurden Lösungen von Ethanol und Wasser mit Massenverhältnissen von 10, 20, 30, 40 und 50 mg/g (Ethanol:Wasser) sowie Lösungen von bovinem Serum Albumin (BSA) in Wasser mit Massenverhältnissen von 20, 40, 60, 80 und 100 mg/g (BSA:Wasser) hergestellt. Die Raman-Signalintensitätsverhältnisse von Material und Lösungsmittel wurden für jede Lösung berechnet. Die Raman-Signalintensitätsverhältnisse werden als Funktion der entsprechenden Massenverhältnisse aufgetragen, und die Proportionalitätskonstante c (Material zu Lösungsmittel) wurde als Steigung der linearen Regression berechnet (Bestimmtheitsmaß für alle Regressionen $R^2 > 0,99$). Gleichung (1) zeigt die Korrelation zwischen den Proportionalitätskonstanten und dem Raman-Signalverhältnis, aus dem das Retinol/Protein-Massenverhältnis berechnet werden kann.

$$\frac{m_{retinol}}{m_{protein}} = c_{BSA:protein}^{-1} \cdot c_{BSA:water} \cdot c_{ethanol:water}^{-1} \cdot c_{retinol:ethanol}^{-1} \cdot \frac{R_{retinol}}{R_{protein}}$$

(1)

Auf diese Weise ist es möglich, Retinol-Hautpenetrationsprofile, die mittels CRM gemessen wurden als Funktion der Retinol-Menge oder -Konzentration als Funktion der Hauttiefe darzustellen.

Abbildung 15 zeigt die Ergebnisse der in-situ-CRM-Messungen der Hautpenetration von Retinol während einer 4,5-stündigen Inkubation mit einer 0,25 % Retinol-haltigen Emulsion.



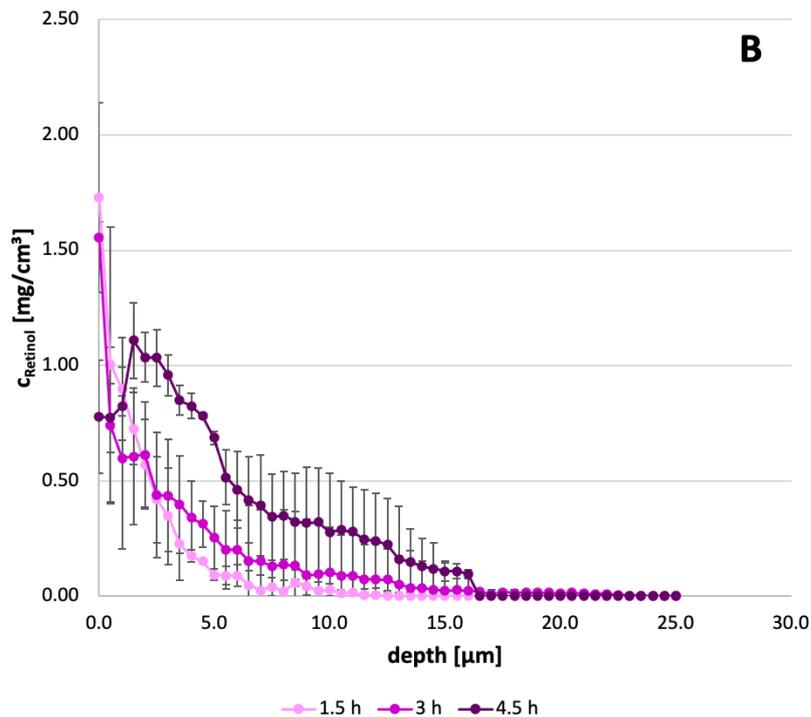


Abbildung 15: Hautpenetrationsprofile von Retinol aus einer 0,25 % Emulsion

Ausgehend von der Hautoberfläche wird die Retinol-Menge pro Hautfläche (A) sowie die Retinol-Menge pro Hautvolumen (B) als Funktion der Tiefe dargestellt. Hier sind die Kurvenverläufe der unterschiedlichen Darstellungen gleich, die absoluten Werte weichen jedoch ab, da die tatsächliche Penetrationsfläche von 7,1 cm² zur besseren Vergleichbarkeit mit den Klebebandabriss-Ergebnissen auf 1 cm² normiert wurde. Nach 1,5 Stunden Inkubationszeit ist Retinol fast ausschließlich in den ersten 5 μm der Haut zu finden, zwischen 5 und 10 μm ist die Retinol-Konzentration sehr gering und unterhalb von 10 μm ist kein Retinol mehr nachweisbar. Die Retinol-Konzentration in der Haut steigt erwartungsgemäß nach 3 h Inkubationszeit an, selbst in 10 μm Hauttiefe ist es noch deutlich nachweisbar, während die höchsten Konzentrationen noch in den ersten 5 μm zu finden sind. Nach 4,5 Stunden ist eine weitere Verschiebung in tiefere Hautregionen zu erkennen, aber es gibt keine weitere Zunahme der Gesamtpenetrationstiefe im Vergleich zum 3-Stunden-Tiefenprofil. Nur vernachlässigbare Retinol-Konzentrationen werden tiefer als 16 μm in der Haut gefunden. Während die ersten beiden Zeitpunkte nur Konzentrationen unter 0,2 mg/cm³ unterhalb von 5 μm Hauttiefe aufweisen, ist die Retinol-Konzentration in der Haut für den 4,5-Stunden-Zeitpunkt bemerkenswert höher und zeigt Konzentrationen über 0,2 mg/cm³ bis in 10 μm Hauttiefe.

Die Ergebnisse zu Retinol wurden publiziert als: Krombholz, R. Fressle, S. & Lunter, D, Ex vivo— In vivo correlation of retinol stratum corneum penetration studies by confocal Raman microspectroscopy and tape stripping. *Int J Cosmet Sci.* **44** 299– 308 (2022).

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.

Details:

Es wurden folgende Formulierungen untersucht:

- Coffein-Lösung 2%
- Coffein-Lösung 2% mit 5 % 1,2-Pentandiol als Penetrationsverbesserer
- Coffein-Gel 2%
- Coffein-Gel 2% mit 5 % 1,2-Pentandiol als Penetrationsverbesserer
- Procain-Gel 1 %
- Procain-Gel 1 % mit 5 % PEG-23-Laurylether als Penetrationsverbesserer

Die Ergebnisse wurden bereits in den vorhergehenden Kapiteln besprochen. Auf eine weitere Diskussion wird an dieser Stelle verzichtet.

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.

Details:

Die folgenden Formulierungen wurden untersucht:

- Coffein-Gel 2%
- Coffein-Gel 2% mit 5 % 1,2-Pentandiol als Penetrationsverbesserer
- Öl-in-Wasser-Emulsion mit 0,25 % Retinol.

Auf eine Untersuchung von Procain-haltigen Gelen wurde verzichtet, da es sich um einen Arzneistoff handelt und eine in-vivo Untersuchung mit unnötig hohen Kosten verbunden gewesen wären.

Die In-vivo-Studien wurden jeweils an drei gesunden Probanden (männlich und weiblich, BMI<30, Hauttypen I-III nach Fitzpatrick, keine Verwendung von topischen Arzneimitteln innerhalb der letzten 14 Tage, keine Tätowierungen am Studienort) durchgeführt, nachdem von jedem Probanden die schriftliche Einwilligung nach Aufklärung eingeholt worden war. Diese nicht-medizinische Studie an gesunden menschlichen Probanden wurde gemäß den grundsätzlichen Anforderungen der Deklaration von Helsinki und gemäß den Hauptprinzipien der Guten Klinischen Praxis (GCP) durchgeführt. Die Studien wurden unter kontrollierten Klimabedingungen (22 ± 2 °C und $50 \pm 7,5$ % relative Luftfeuchtigkeit) durchgeführt. Nach einer 30-minütigen Akklimatisierungsphase wurden die Messungen in einem anderen klimatisierten Untersuchungsraum mit derselben Temperatur und relativen Luftfeuchtigkeit durchgeführt. Drei Testbereiche für jeden verschiedenen Messzeitpunkt (1, 2 und 3 Stunden für Coffein und 1,5, 3 und 4,5 Stunden für Retinol) wurden den volaren Unterarmen jeder Testperson zugewiesen (Abbildung 16).

Assignment of Test Areas

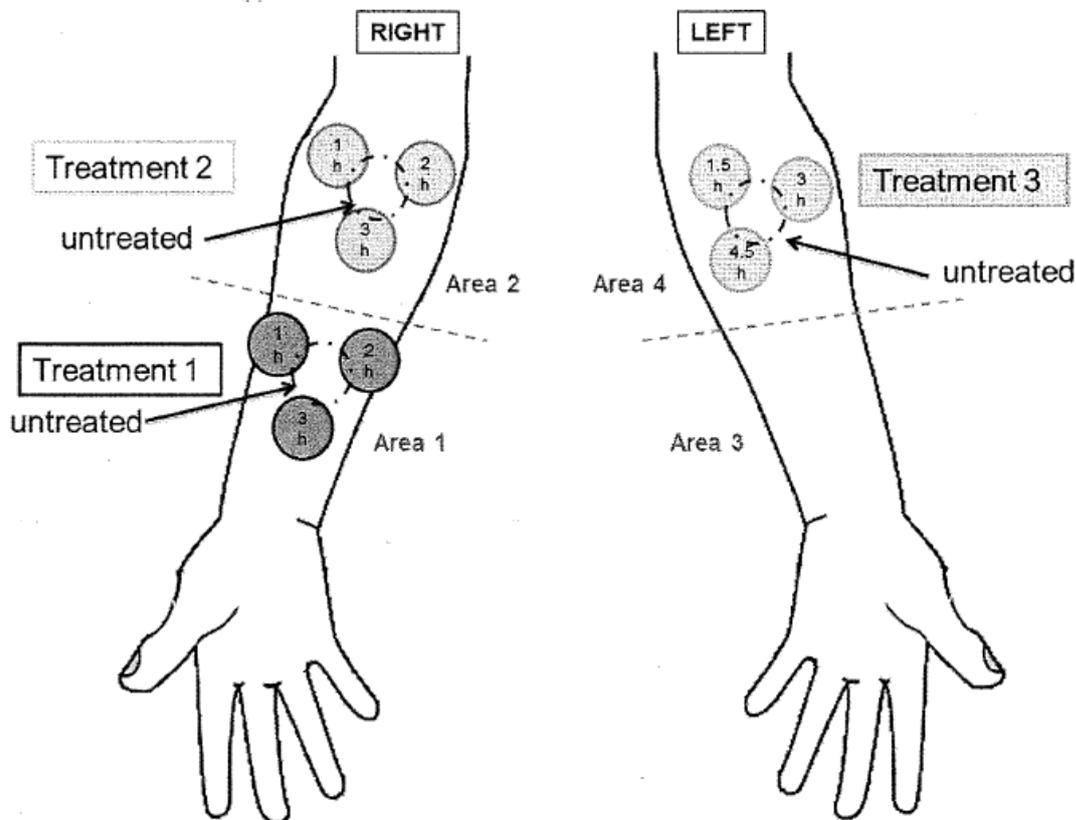


Abbildung 16: Zuweisung der Testbereiche auf den Unterarmen der Probanden. Die Proben wurden randomisiert den Arealen zugewiesen.

Abbildung 17 zeigt die Ergebnisse der in-vivo-CRM-Messungen der Hautpenetration von Coffein während einer Inkubationszeit von 3 Stunden mit zwei verschiedenen Coffeingelen (A: 2 % Coffein, B: 2 % Coffein + 5 % 1,2-Pentandiol). Ausgehend von der Hautoberfläche ist die Coffeinkonzentration als Funktion der Hauttiefe dargestellt. Nach 1 h Inkubation mit Gel 1 kann Coffein in den ersten 12 µm der Hauttiefe nachgewiesen werden. Nach 2 Stunden sind bereits höhere Koffeinkonzentrationen in der Haut nachweisbar, die nach 3 Stunden nur noch geringfügig ansteigen. Die Gesamt-Eindringtiefe liegt unter 20 µm, obwohl sie ebenfalls stetig zunimmt. Der Einfluss von 1,2-Pentandiol auf die Penetration von Coffein in die Haut zeigt sich nach 1 h Inkubation mit Gel 2. Innerhalb der ersten 16 µm der Hauttiefe kann Coffein nachgewiesen werden. Dies ist 4 µm tiefer als ohne Penetrationsverstärker. Nach 2 Stunden Inkubation steigt die Koffeinkonzentration in der Haut leicht an und nimmt nach 3 Stunden Inkubationszeit noch stärker zu. Auch hier dringt das Coffein bis zu einer Gesamttiefe von etwa 20 µm ein. Die gemessenen Coffein-Hautpenetrationsprofile zeigen ähnliche Verläufe, wie die gemessenen Ex-vivo Verläufe und es konnten Coffein-Konzentrationen in gleichen Konzentrationsbereichen detektiert werden. Wie erwartet, konnte ein positiver Effekt von 1,2-Pentandiol auf die Hautpenetration von Koffein nachgewiesen werden.

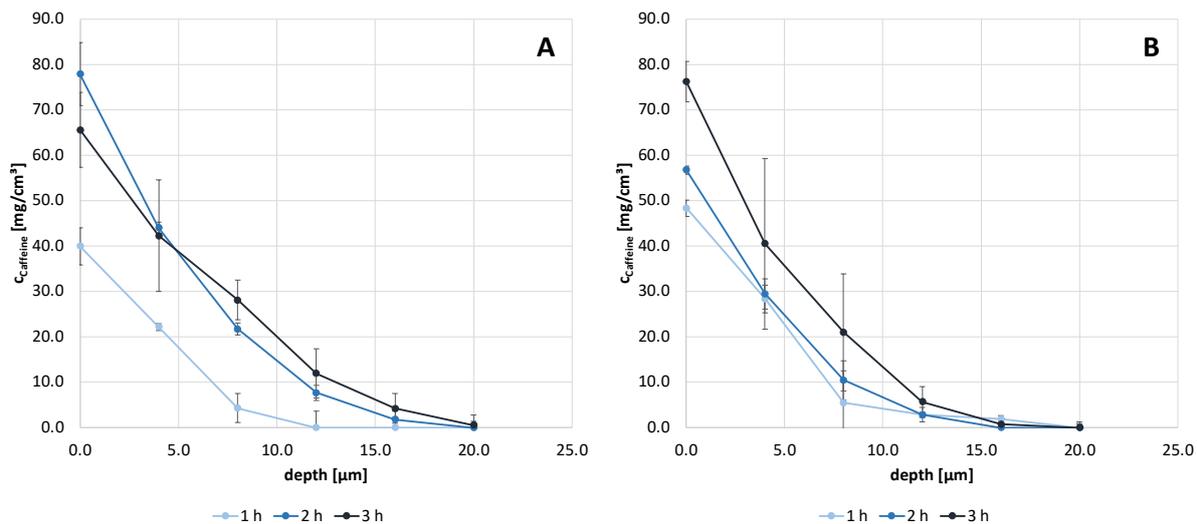


Abbildung 17: Hautpenetrationsprofile von Coffein über 3 h aus einem 2 % Hydrogel (A) und einem 2 % Hydrogel + 5 % 1,2-Pentandiol.

Die Ergebnisse zu Koffein wurden publiziert als: Krombholz, R, Fressle, S, Nikolić, I, et al. ex vivo–in vivo comparison of drug penetration analysis by confocal Raman microspectroscopy and tape stripping. *Exp Dermatol.* **00** 1- 12 (2022)

Abbildung 18 zeigt die Ergebnisse der In-vivo-CRM-Messungen der Hautpenetration von Retinol während einer 4,5-stündigen Inkubation mit einer 0,25 % Retinol-haltigen Emulsion.

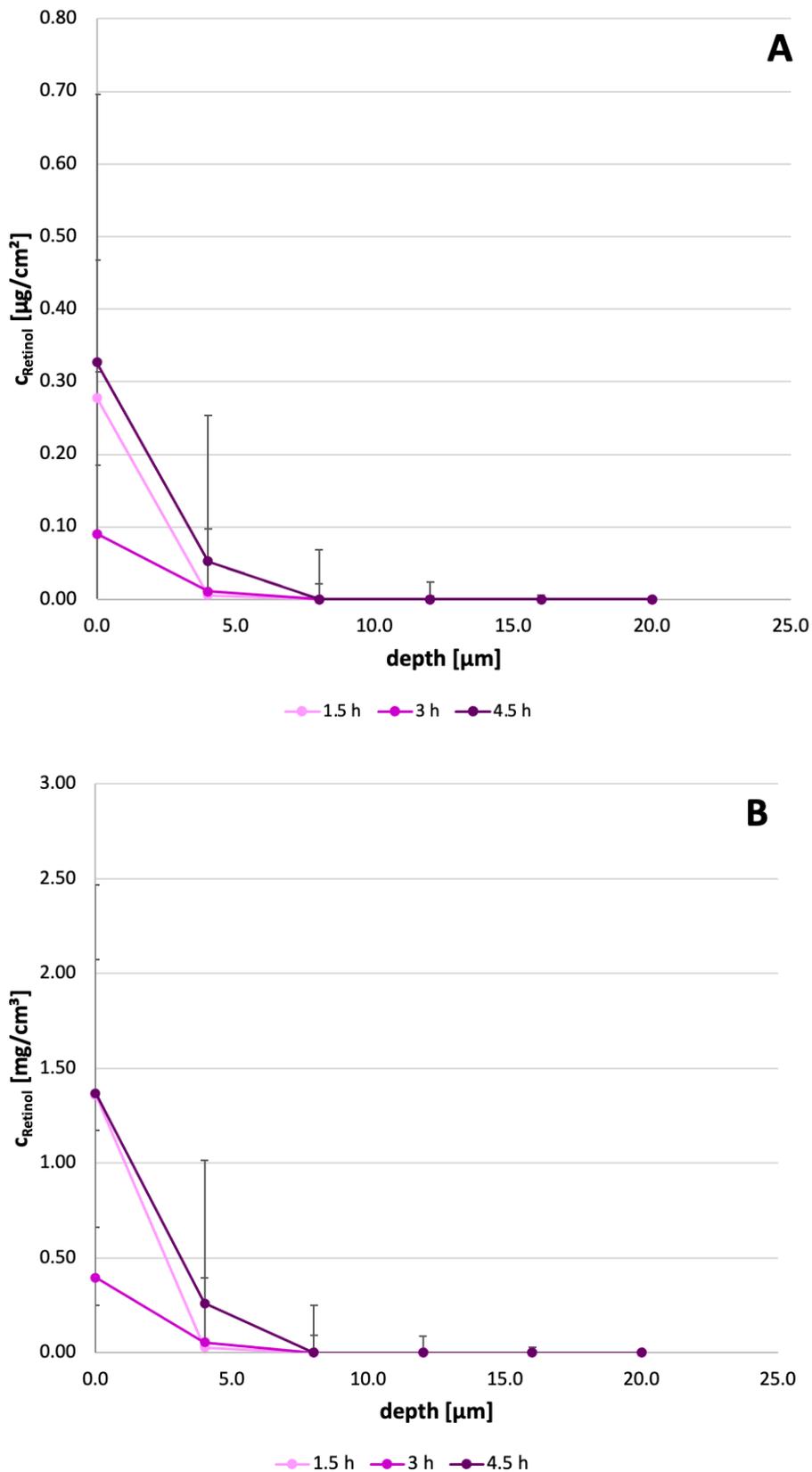


Abbildung 18: Hautpenetrationsprofile von Retinol aus einer 0,25 % Emulsion

Ausgehend von der Hautoberfläche wird die Retinol-Menge pro Hautfläche (A) sowie die Retinol-Menge pro Hautvolumen (B) als Funktion der Hauttiefe dargestellt. Dies dient wiederum dem besseren Vergleich mit Ex-vivo-Messungen, die mit unterschiedlichen Penetrationsflächen durchgeführt wurden. Nach 1,5 Stunden Inkubationszeit ist der größte Teil des Retinols in den ersten 10 µm der Haut zu finden und nimmt weiter ab bis zu einer maximalen Eindringtiefe von 16 µm. Die Gesamtmenge an Retinol in der Haut nimmt nach 3 Stunden Inkubationszeit wieder ab, der größte Teil kann fast ausschließlich in den ersten 10 µm der Haut nachgewiesen werden. Da mehrere Messungen im Applikationsbereich bei allen drei Probanden keine Retinol-Konzentration detektieren konnten, ist der Median deutlich kleiner als bei den anderen beiden Zeitpunkten. Nach 4,5 Stunden steigt die in der Haut gefundene Retinol-Menge wieder auf ähnliche Werte wie nach 1,5 Stunden. Während die ex-vivo gemessenen Penetrationsprofile Retinol-Konzentrationen zwischen 0,25 und 0,50 µg/cm² zwischen 5 und 10 µm Hauttiefe zeigen, sind die Konzentrationen in diesen Hautregionen in vivo deutlich geringer. Andererseits sind die auf der Hautoberfläche nachgewiesenen Retinol-Mengen zu jedem Zeitpunkt deutlich höher als in den Ex-vivo-Studien. Bei den Ex-vivo-CRM-Messungen könnten aufgrund der Okklusion durch das verwendete Deckgläschen stärker hydratisiert gewesen sein. Bei In-vivo-CRM-Messungen wurde die Haut nur für kurze Zeit auf das Messfenster gelegt, so dass die höhere Hydratation bei In-vivo-Experimenten keine Rolle gespielt haben dürfte. Bei den Klebebandabriss-Experimenten wurde die Haut vor dem Klebeband-Abreißen zunächst 30 Minuten lang "getrocknet" (d. h. der Luft ausgesetzt), da Vorversuche gezeigt hatten, dass beim Segmentieren des Stratum corneum direkt nach dem Ende der Inkubationszeit in den Franz-Zellen das Wiegen der abgezogenen Klebebänder aufgrund der Wasserverdunstung unmöglich war. Indem die Hautproben vor dem Wiegen 30 Minuten lang der Luft ausgesetzt wurden, konnte dieses Problem gelöst werden, da die Hydratation der SC auf normale/gleichgewichtige Werte zurückging. Dies könnte die Unterschiede in den Kurvenverläufen des Penetrationsprofils zwischen Ex-vivo- und In-vivo-Experimenten erklären. Die In-vivo-Experimente zeigten die höchsten Standardabweichungen unter den drei verwendeten Methoden. Dies ist auf die interindividuelle Variabilität zurückzuführen, die stärker berücksichtigt wird, da an der In-vivo-Studie drei Probanden teilnahmen, während bei den Ex-vivo-Experimenten alle Versuche an der Haut desselben Tieres durchgeführt wurden. Dass die eingedrungene Retinol-Menge nach 3 Stunden abnimmt, aber nach 4,5 Stunden wieder ansteigt, ist recht merkwürdig. Es ist anzumerken, dass nach 3 Stunden eine große Anzahl von "0"-Werten erhalten wurde, was vermutlich der Grund für die festgestellte Abnahme der eingedrungenen Menge ist. Es wird angenommen, dass es sich hierbei um ein Artefakt handelt, das darauf zurückzuführen ist, dass für die drei Inkubationszeiten unterschiedliche Probenbereiche verwendet wurden. Es scheint, dass zufällig Bereiche mit geringerer Penetration für den 3-Stunden-Zeitpunkt ausgewählt wurden. Auf der Hautoberfläche ist die Retinol-Konzentration nach 4,5 Stunden mit 1,37 mg/cm³ bzw. 0,83 µg/cm² deutlich höher als bei den Ergebnissen der beiden Ex-vivo-Methoden.

Die Ergebnisse zu Retinol wurden publiziert als: Krombholz, R. Fressle, S. & Lunter, D, Ex vivo— In vivo correlation of retinol stratum corneum penetration studies by confocal Raman microspectroscopy and tape stripping. *Int J Cosmet Sci.* **44** 299– 308 (2022).

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. Eine Liste der Publikationen ist angehängt, die Publikationen wurden beigefügt.

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.

Erweiterung des Stands von Wissenschaft und Technik während des Projektzeitraums

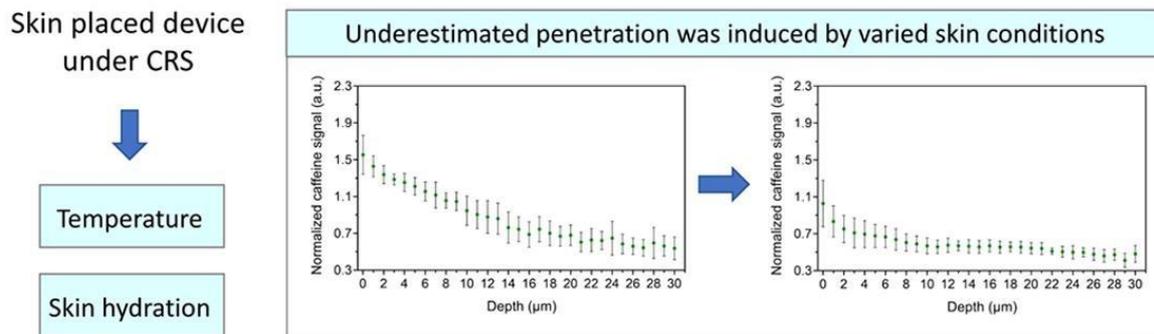
Während des Projektzeitraums wurden auch von anderen Gruppen Forschungsergebnisse zur Hautpenetrationsuntersuchung mittels konfokaler Raman-Spektroskopie erzielt. Diese werden nachfolgend im Zusammenhang mit den eigenen Ergebnissen diskutiert.

Goh et al. Untersuchten die Kristallisation von Arzneistoffen nach topischer Applikation mittels konfokaler Raman Spektroskopie [34].

Die Kristallisation von Arzneimitteln nach der Anwendung von transdermalen und topischen Formulierungen kann die Abgabe von Arzneimitteln an die Haut beeinträchtigen. In vorherigen Berichten wurde festgestellt, dass dieses Phänomen auf die oberflächlichen Schichten des Stratum corneum (~7 µm) beschränkt ist und zur Untersuchung des Phänomens ein Abziehen der Hautproben mittels Klebebandabrissen erforderlich war. Die Kristallisation von Arzneimitteln in situ zu erfassen, ohne die Hautproben zu beschädigen stellt daher nach wie vor eine Herausforderung dar. In dieser Arbeit wird über den gemeinsamen Einsatz von Synchrotron-SAXS/WAXS-Analyse und konfokaler Raman-Spektroskopie (CRS) zur Untersuchung der Arzneimittelverteilung in der Haut berichtet, mit dem Ziel die Arzneistoffkristallisation zu charakterisieren. Nach dem Auftragen von gesättigten Arzneistofflösungen (Ibuprofen, Diclofenacsäure und Salze) bestätigten CRS-Tiefenprofile, dass die Arzneistoffe im Allgemeinen bis zu einer Tiefe von ~15-20 µm in die Haut penetrierten. Dies wurde durch die WAXS-Profile bestätigt.

In unseren eigenen Untersuchungen haben wir die Kristallisation von Coffein als Lösungen in der Haut mittels CRS untersucht (Abbildung 19) [38].

Critical parameters affecting the caffeine penetration profiles via CRS



Characterization of caffeine crystals in/on skin for verifying assumption

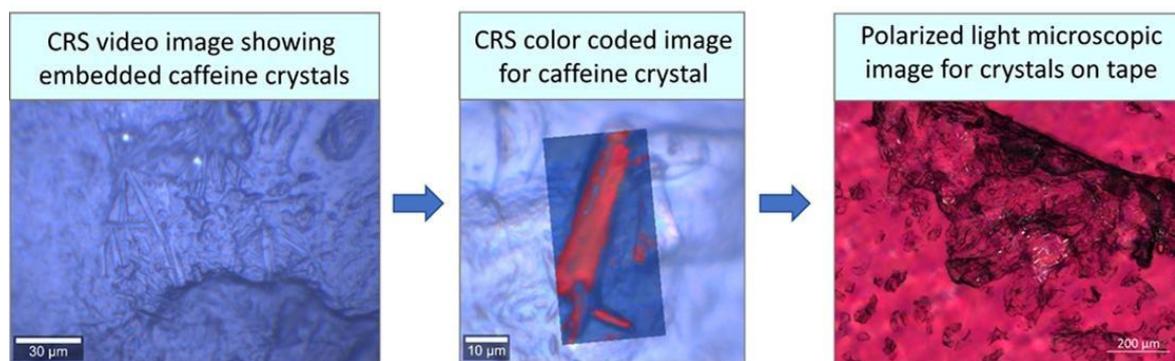


Abbildung 19: Grafische Zusammenfassung der Publikation „Critical parameters for accurate monitoring of caffeine penetration in porcine skin using confocal Raman spectroscopy“, gezeigt sind Penetrationsprofile (oben), die bei Messung bei Raumtemperatur geringer ausfallen als bei 32 °C. Grund hierfür ist die Auskristallisation von Coffein, gezeigt anhand von Polarisationsmikroskopischen- und CRS-Bildern (unten)

Unsere Ergebnisse zeigten, dass insbesondere die Temperatur bei der Versuchsdurchführung und während der CRS-Analyse einen Einfluss auf die Kristallisation von Koffein zeigt. Werden die Hautproben nach der Inkubation (32 °C) bei Raumtemperatur gelagert und analysiert, so kommt es zu einer Kristallisation des Coffeins. Wird die Temperatur von 32 °C aufrecht erhalten, so erfolgt keine Kristallisation. Unsere Ergebnisse sind also kongruent mit denen von Goh et al., wobei unsere und ihre Untersuchungen das Problem von unterschiedlichen Seiten angreifen und somit komplementäre Ergebnisse zum Stand von Wissenschaft und Technik beitragen.

Zu Beginn des Projekts war es nicht möglich echte quantitative Daten mittels konfokaler Raman Spektroskopie zu ermitteln. Es wurden semi-quantitative Daten erhalten und die Fähigkeit einer Formulierung einen Arzneistoff in die Haut einzubringen wurde anhand von Vergleichsmessungen mit anderen Formulierungen bewertet. Es war zwar bereits eine Methode publiziert, die eine Art Kalibrierung beschrieb, diese war jedoch extrem aufwendig und lief daher dem großen Vorteil der Raman-Spektroskopie, nämlich der Schnelligkeit der Daten-Generierung zuwider. Erst 2019 wurde von Caspers et al. eine Methode publiziert, bei der anhand einer mehrstufigen aber relativ wenig aufwendigen Kalibrierung echte quantitative Daten erhalten

werden konnten [32]. In ihrem Artikel beschreiben sie eine einzigartige nichtinvasive Möglichkeit zur Bestimmung der Konzentration (in mg/cm^3) und der Gesamtmenge topisch applizierter Substanzen in der Haut (in $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ der Hautoberfläche). Die Methode basiert auf der Berechnung eines Konzentrationsverhältnisses aus einem Raman-Spektrum eines Stoffes in einem Medium, das ein Lösungsmittel oder eine andere Matrix, wie die Haut, sein kann. Anschließend wurde die praktische Umsetzung der Methode zusammen mit einer Erläuterung der verwendeten Annahmen vorgestellt und auf eine quantitative Analyse der in-vivo-Hautpenetration von Trans-Retinol und Propylenglykol (PG) angewendet. Es wurde ein Vergleich zwischen den Konzentrationsprofilen von Retinol und PG in der Haut und den aufgetragenen Konzentrationen durchgeführt. Die Bestimmung der Menge dieser Stoffe in der Haut zu verschiedenen Zeitpunkten nach der topischen Anwendung ermöglichte auch eine unkomplizierte Berechnung des Fluxes in die Haut (in $\mu\text{g cm}^{-2} \text{ h}$).

Die hier beschriebene Methode haben wir anschließend in unseren eigenen Untersuchungen verwendet, um die Penetration von Retinol und Coffein in die Haut zu quantifizieren. Damit haben wir zum Einen gezeigt, dass die Methode auch für andere Raman-Mikroskope anwendbar ist und zum Anderen haben wir sie auf einen weiteren Stoff angewendet, der andere physiko-chemische Eigenschaften zeigt und für den die zur Kalibrierung notwendigen Berechnungen und Messungen angepasst werden mussten. Die trägt dazu bei, die Validität der Methode zur Quantifizierung zu untermauern.

Iliopoulos et al untersuchten die in-vitro-in-vivo-Korrelation von Ergebnissen zur Hautpenetration [35]. Sie untersuchten die Permeation von Niacinamid (NIA) aus verschiedenen Formulierungen in die menschliche Haut in vitro mit herkömmlichen Franz-Zellen und in vivo mit einer quantitativen CRS-Methode unter finiten Dosisbedingungen. Die Auswahl von NIA basierte auf seiner breiten Verwendung in pharmazeutischen und Körperpflegeformulierungen seit vielen Jahren. Es handelt sich um die erste vollständig quantitative Studie zum Vergleich dieser Methoden. Bei den untersuchten Vehikeln handelte es sich um reines Transcutol® P (TC), binäre Kombinationen von Propylenglykol (PG) mit Propylenglykolmonolaurat (PGML) und ternäre Mischungen aus PG, PGML und Isopropylmyristat (IPM). Diese Lösungsmittel wurden so ausgewählt, dass sie unterschiedliche physikochemische Eigenschaften (Hydrophilie/Lipophilie) aufweisen. Die NIA-Permeation war bei allen Formulierungen in vitro und in vivo nachweisbar. Die Vehikel PG:PGML und PG:PGML:IPM lieferten in vitro nach 24 Stunden vergleichbare Mengen über die Haut ($100,3\text{-}106,7 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, $p > 0,05$), die im Vergleich zu denen von TC ($1,3 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, $p < 0,05$) deutlich höher waren. Eine ausgezeichnete in vitro in vivo Korrelation ($R^2 = 0,98$) ergab sich aus der linearen Regression der kumulativen Mengen an NIA, die in vitro permeierten, und den mit CRS gemessenen Mengen an NIA in $2 \mu\text{m}$ in der Haut. Es wurde auch eine sehr gute Korrelation zwischen der kumulativen Permeation von NIA in vitro und der Gesamtmenge an NIA, die das Stratum corneum (SC) pro Oberflächeneinheit ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) in vivo durchdrungen hat, mit einem Korrelationskoeffizienten (R^2) von $0,94$ festgestellt. Die Ergebnisse unterstützen die Verwendung von CRS für die quantitative Messung von Wirkstoffen, die in vivo an die Haut abgegeben werden.

Die gleiche Gruppe ging in einer Folgearbeit näher auf die Rolle von Hilfsstoffen ein, um Aufschluss über die Mechanismen zu erhalten, durch die Hilfsstoffe die Permeation fördern, und die Entwicklung wirksamer und sicherer Produkte erleichtern [36]. Dabei wurde wiederum die quantitative konfokale Raman-Spektroskopie (CRS) zur Untersuchung der Abgabe eines

Wirkstoffs an die verwendet. Es wurden die Auswirkungen gängiger Hilfsstoffe auf die perkutane Absorption des Modellarzneistoffs Ibuprofen (IBU) untersucht. Die Permeation von IBU und ausgewählten Lösungsmitteln nach Applikation einer finiten Dosis auf die menschliche Haut wurde *in vitro* und *in vivo* durch Franz-Diffusionsstudien bzw. quantitative CRS bestimmt. Die verwendeten Lösungsmittel waren Propylenglykol (PG), Dipropylenglykol (DPG), Tripropylenglykol (TPG) und Polyethylenglykol 300 (PEG 300). Insgesamt waren die kumulativen Mengen an IBU, die nach 24 Stunden *in vitro* permeierten, für PG, DPG und TPG ähnlich ($p > 0,05$). Diese drei Vehikel übertrafen PEG 300 ($p < 0,05$) in Bezug auf die Wirkstoffabgabe. Bei den Vehikeln war die Reihenfolge für die *in-vitro*-Hautpermeation $DPG \geq PG > TPG$, während PEG 300 die Haut nicht durchdrang. Mit einem Korrelationskoeffizienten (R^2) von 0,95 wurde eine lineare Beziehung zwischen dem maximalen Vehikel- und IBU-Flux *in vitro* festgestellt. Beim Vergleich von *in-vitro*- mit *in-vivo*-Daten wurde eine positive *in-vitro*-*in-vivo*-Korrelation (IVIV) zwischen der kumulativen Permeation von IBU *in vitro* und der Gesamtmenge an IBU, die das Stratum corneum (SC) *in vivo* durchdrungen hat, mit einem Korrelationskoeffizienten (R^2) von 0,90 festgestellt. Eine starke IVIV-Korrelation, $R^2 = 0,82$, wurde nach der linearen Regression der kumulativen Anzahl der *in vitro* diffundierten Lösungsmittel und der entsprechenden mit CRS gemessenen Hautaufnahme *in vivo* festgestellt. Die IVIV-Korrelationen deuten darauf hin, dass CRS eine leistungsfähige Methode für die Erstellung von Penetrationsprofilen aus dermalen Formulierungen ist.

Wir untersuchten ebenfalls die Korrelation von *in-vitro* bzw. korrekt bezeichnet *ex-vivo*-Untersuchungen der Hautpenetration mit der konfokalen Raman-Spektroskopie allerdings am Beispiel von Retinol und Coffein. Anstelle einfacher Lösemittelgemische, wie sie von Iliopoulos verwendet wurden, verwendeten wir echte Formulierungen, nämlich eine Öl-in-Wasser-Emulsion und ein Hydrogel. Zusätzlich untersuchten wir den Einfluss des Penetrationsverbessers 1,2-Pentandiol auf die Penetration von Coffein. Zusätzlich zu *ex-vivo* Penetrationsuntersuchungen mittels konventioneller Klebebandabriss-Technik und CRS verwendeten wir *in-vivo* genau die gleichen Methoden, nämlich Klebebandabriss und CRS. So konnten wir gleichzeitig einen *ex-vivo*-*in-vivo*-Vergleich durchführen als auch den Vergleich von Klebebandabriss-Technik und CRS [39].

Während Iliopoulos die Methode der Permeation wählte, welche die durch die Haut hindurch diffundierte Arzneistoffmenge misst, verwendeten wir die Penetrationsuntersuchung, bei der mit Klebebandabrissen die obersten Hautschichten sukzessive abgetragen werden. Dies ist aus unserer Sicht die passendere Vergleichsmethode, da sowohl bei ihr als auch bei der CRS-Methode die Arzneistoffkonzentrationen im Stratum corneum untersucht werden während bei der Permeation die Arzneistoffmengen untersucht werden, die durch die Haut hindurch diffundiert sind. Wie auch Iliopoulos sind wir zu dem Schluss gelangt, dass eine sehr gute Korrelation zwischen *ex-vivo* und *in-vivo* Daten besteht. Auch hier sehen wir unsere und die Ergebnisse von Iliopoulos als komplementär an, die verschiedene Arzneistoffe aus verschiedenen Vehikeln mit verschiedenen Methoden untersucht wurden, die alle zu dem gleichen Schluss kommen, nämlich, dass die CRS geeignet ist quantitative Penetrationsprofile zu erzielen, die denen der konventionellen Methoden gleichwertig sind. Des Weiteren konnten wir durch Vergleich von Daten, die an frischer und gefrorener und wieder aufgetauter Haut gewonnen wurden zeigen, dass die erfassten Konzentrationen in einem vergleichbaren Bereich liegen, dass allerdings der Effekt des Penetrationsverbessers bei gefrorener und wiederaufgetauter Haut etwas stärker ausgeprägt ist als bei frischer Haut (Tabelle 3). Dies liefert einen Hinweis zur Bewertung von

Ergebnissen, die, was dem üblichen Vorgehen entspricht, an gefrorener und wieder aufgetauter Haut gewonnen wurden.

Tabelle 3: Gegenüberstellung der Konzentrationen von Coffein in der Haut nach 1, 2, 3 h Inkubation, gemessen mit verschiedenen Techniken (tape stripping=Klebebandabrisstechnik, CRM=kofokale Raman Mikroskopie) und frischer oder gefrorener und aufgetauter Haut (fresh vs. Frozen)

		Gel 1	Gel 2	ER
		c_{caffeine} [$\mu\text{g}/\text{cm}^2$]	c_{caffeine} [$\mu\text{g}/\text{cm}^2$]	
In vivo CRM	1h	18.58	25.09	1.35
	2h	45.69	28.45	0.62
	3h	47.98	42.45	0.88
Ex vivo CRM (fresh skin)	1h	11.76	20.71	1.76
	2h	16.92	24.21	1.43
	3h	20.58	26.12	1.27
Ex vivo CRM (frozen skin)	1h	11.28	27.89	2.47
	2h	14.87	31.77	2.14
	3h	21.98	37.00	1.68
In vivo tape stripping	1h	7.17	10.89	1.52
	2h	10.65	13.27	1.25
	3h	12.35	20.92	1.69
Ex vivo tape stripping	1h	13.20	13.86	1.05
	2h	10.41	13.85	1.33
	3h	24.93	18.60	0.75

Dies wiederum ist in teilweiser Übereinstimmung mit den Resultaten von Bonnier [37], die eine reduzierte Barrierefunktion bei gefrorenen und wieder aufgetauten in-vitro-Zellkulturmodellen fanden. Sie untersuchten rekonstruierte menschliche Epidermis (RHE), welche tierisches Gewebe in der pharmazeutischen, toxikologischen und kosmetischen Wissenschaft ersetzen kann. Da RHE nach wie vor kostspielig sind und nur eine kurze Haltbarkeit haben, erschien die Lagerung in gefrorenem Zustand erstrebenswert. Die Auswirkungen des Einfrierens und wieder Auftauens wurde anhand kommerzieller EpiSkin™ RHE, die bei -20, -80 und -150 °C für 1 und 10 Wochen gelagert wurden untersucht. Dazu wurden intrinsische Raman-Spektren im Stratum corneum (SC) der RHE sowie Spektren aufgenommen, die nach der topischen Anwendung von Resorcin in einer wässrigen Lösung gewonnen wurden. Parallel dazu wurden die Auswirkungen des Einfrierens und wieder Auftauens auf die Permeationskinetik von Resorcinol anhand von zeitabhängigen Permeationsexperimenten untersucht. Hauptkomponentenanalysen unterschieden die intrinsischen SC-Spektren und die Spektren von Resorcin-haltigen RHEs, jeweils auf der Grundlage der Einfrierbedingungen. Die Permeation von Resorcin durch die gefrorenen RHE erhöhte sich im Vergleich zu frischem RHE um das 3- bis 6-fache, wobei der stärkste Effekt beim Einfrieren bei -20 °C für 10 Wochen erzielt wurde. Einen derart großen Effekt des Einfrierens und Auftauens konnten wir in unseren Untersuchungen nicht finden. Die Penetration von Coffein ohne Penetrationsverbesserer lag in einem vergleichbaren Bereich wie

bei frischer hat. Nur die Penetration mit Penetrationsverbesserer war leicht erhöht, bleibt aber unter dem Faktor 2. RHE ist als Zellkulturmodell per se deutlich permeabler als exzidierte Haut und seine Barriereigenschaften sind schwächer ausgeprägt. Dies könnte der Grund für die stärkere Beeinflussung der Barriereigenschaften durch Einfrieren und wieder auftauen sein, und die Unterschiede zu unseren Untersuchungen erklären.

Fazit

Die von uns im Rahmen des IGF-Vorhabens durchgeführten Untersuchungen bereichern den Stand von Wissenschaft und Technik in folgenden Bereichen:

- Unsere Methode ist die einzige in der Literatur beschriebene, welche eine in-situ Untersuchung der Arzneistoffpenetration mittels CRS ermöglicht
- Wir konnten anhand von zwei Modellsubstanzen eine ex-vivo-in-vivo-Korrelation der CRS-Daten zeigen
- Wir konnten eine Korrelation zwischen der konventionellen Klebebandabrissmethode und der CRS sowohl ex-vivo als auch in-vivo zeigen
- Wir konnten die Quantifizierung eines weiteren Modellarzneistoffs in der Haut mittels CRS zeigen.
- Wir konnten den Einfluss der Messbedingungen (v. a. der Temperatur) und der Vorbehandlung der Haut (einfrieren und auftauen) auf die Ergebnisse der Penetrationsuntersuchungen zeigen.

Die im Rahmen des IGF-Vorhabens durchgeführten Arbeiten bereichern somit den Stand von Wissenschaft und Technik in mehreren Bereichen und können dazu beitragen die Methode weiter zu etablieren. Das langfristige Ziel, eine Akzeptanz der Methode durch die Zulassungsbehörden zu erreichen, rückt somit in erreichbare Nähe.

Angaben zu den aus der Zuwendung finanzierten Ausgaben

- für Personenmonate des wissenschaftlich-technischen Personals gemäß Beleg über Beschäftigungszeiten (Einzelansatz A.1 des Finanzierungsplans)
17,5 PM
- für Geräte (Einzelansatz B des Finanzierungsplans)
Wassertauchobjektiv: Spezifikation 63x Wasserimmersionsobjektiv (W "Plan-Apochromat" 63/1,0 M27, Carl Zeiss, Jena, Germany)
Einsatzgebiete: APs 3, 5, 6 & 7
- für Leistungen Dritter (Einzelansatz C des Finanzierungsplans)
In-vivo Raman Messungen

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	Diskussion mit den im PA vertretenen KMU	3. Quartal 2020	29.10.2020, online

	in Abstimmung mit den KMU			
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 und im September 2022 publiziert.

- o “ex vivo–in vivo comparison of drug penetration analysis by confocal Raman microspectroscopy and tape stripping”

Die Ergebnisse 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

Literaturverzeichnis

1. Statista *Umsatz der top 10 Pharmamärkte weltweit bis 2015*. 2017.
2. Statista *Weltweiter Arzneimittelumsatz nach Therapiegebiet 2016 und 2022*. 2017.
3. Statista *Umsatzentwicklung auf dem deutschen Pharma-Gesamtmarkt bis 2016*. 2017.
4. V. , B. d. P. I. e. *Pharma Daten 2016*. 2016.
5. Industrie, B. d. P. *Mittelständische Pharmaindustrie Neue Wege zum Erfolg mit Biotechnologie*. 2002.
6. V. , I. K. -u. W. e. 2017 05. 09. 2017]; Available from: <http://www.ikw.org/ikw/hauptanliegen-des-ikw/fakten-zahlen/marktzahlen/>.
7. Statista. *Weltweiter Vergleich Umsatz*. 2017 06. 09. 2017]; Available from: <https://de.statista.com/outlook/70000000/102/kosmetik-und-koerperpflege/europa#>.
8. Statista *Dossier Kosmetik*. 2017.
9. Mendelsohn, R. , C. R. Flach, and D. J. Moore, *Determination of molecular conformation and permeation in skin via IR spectroscopy, microscopy, and imaging*. BBA-Biomembranes, **1758**(7), p. 923-933 (2006)
10. Hollricher, O. , *Raman Instrumentation for Confocal Raman Microscopy*, in *Confocal Raman Microscopy*, T. Dieing, O. Hollricher, and J. Toporski, Editors. 2010, Springer Verlag: D-Heidelberg. p. 43-60.
11. 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, **50**(5), p. 601-608 (2013)
12. Mateus, R. , et al. , *A new paradigm in dermatopharmacokinetics – Confocal Raman spectroscopy*. Int J Pharm, **444**(1–2), p. 106-108 (2013)
13. 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, **29**(2), p. 92-101 (2016)
14. Lunter, D. J. , *Determination of skin penetration profiles by confocal Raman microspectroscopy: statistical evaluation of optimal microscope configuration*. p. n/a-n/a (2016)
15. Caspers, P. J. , et al. , *Automated depth-scanning confocal Raman microspectrometer for rapid in vivo determination of water concentration profiles in human skin*. J Raman Spectrosc, **31**(8-9), p. 813-818 (2000)
16. Caspers, P. J. , et al. , *In Vivo Confocal Raman Microspectroscopy of the Skin: Noninvasive Determination of Molecular Concentration Profiles*. J Investig Dermatol, **116**(3), p. 434-442 (2001)
17. Wascotte, V. , et al. , *Assessment of the “Skin Reservoir” of Urea by Confocal Raman Microspectroscopy and Reverse Iontophoresis*. Pharm Res, **24**(10), p. 1897-1901 (2007)
18. Albèr, C. , et al. , *Effects of water gradients and use of urea on skin ultrastructure evaluated by confocal Raman microspectroscopy*. BBA Biomembranes, **1828**(11), p. 2470-2478 (2013)
19. 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*. **495**(1), p. 482-484 (2015)
20. Mélot, 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, **138**(1), p. 32-39 (2009)
21. Pudney, P. D. A. , et al. , *An In Vivo Confocal Raman Study of the Delivery of Trans-Retinol to the Skin*. Appl Spectrosc, **61**(8), p. 804-811 (2007)
22. Tfayli, A. , et al. , *Follow-up of drug permeation through excised human skin with confocal Raman microspectroscopy*. Euro Biophys J, **36**(8), p. 1049-1058 (2007)
23. 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, **95**, p. 110–116 (2015)

24. 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*. **104**, p. 51-58 (2016)
25. Tfaili, S. , et al. , *Monitoring caffeine and resveratrol cutaneous permeation by confocal Raman microspectroscopy*. *J Biophoton*, **7**(9), p. 676-681 (2014)
26. Mateus, R. , et al. , *Percutaneous absorption of salicylic acid – in vitro and in vivo studies*. **475**(1–2), p. 471-474 (2014)
27. Zhang, G. , et al. , *Imaging the Prodrug-to-Drug Transformation of a 5-Fluorouracil Derivative in Skin by Confocal Raman Microscopy*. *J Invest Dermatol*, **127**(5), p. 1205-1209 (2007)
28. Pyatski, Y. , et al. , *Effects of permeation enhancers on flufenamic acid delivery in Ex vivo human skin by confocal Raman microscopy*. **505**(1–2), p. 319-328 (2016)
29. Lunter, D. and R. Daniels, *Confocal Raman microscopic investigation of the effectiveness of penetration enhancers for procaine delivery to the skin*. **19**(12), p. 126015-126015-12 (2014)
30. Lutz Franzen, Juliane Anderski, Maike Windbergs, Quantitative detection of caffeine in human skin by confocal Raman spectroscopy – A systematic in vitro validation study, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **95** p. 110-116 (2015)
31. Rubio, L., Alonso, C., López, O., Rodríguez, G., Coderch, L., Notario, J., de la Maza, A. and Parra, J.L. Barrier function of intact and impaired skin: percutaneous penetration of caffeine and salicylic acid. *International Journal of Dermatology*, **50** 881-889 (2011)
32. Peter J. Caspers, Claudio Nico, Tom C. Bakker Schut, Johanna de Sterke, Paul D. A. Pudney, Patricia R. Curto, Abigail Illand, Gerwin J. Puppels, Method to quantify the in vivo skin penetration of topically applied materials based on confocal Raman spectroscopy, **1** (2019), *Translational Biophotonics*
33. Binder, L, Valenta, C, Lunter, D. Determination of skin penetration profiles by confocal Raman microspectroscopy: Evaluation of interindividual variability and interlab comparability. *J Raman Spectrosc.*; **51** p.1037– 1043 (2020)
34. Choon Fu Goh, Ben J. Boyd, Duncan Q. M. Craig & Majella E. Lane Profiling of drug crystallization in the skin, *Expert Opinion on Drug Delivery*, **17** (9), 2020
35. Franz Cell Diffusion Testing and Quantitative Confocal Raman Spectroscopy: In Vitro-In Vivo Correlation, Fotis Iliopoulos, Peter J. Caspers, Gerwin J. Puppels and Majella E. Lane, *Pharmaceutics* **12**(9), 887 (2020)
36. Avnish Patel, Fotis Iliopoulos, Peter J. Caspers, Gerwin J. Puppels and Majella E. Lane In Vitro–In Vivo Correlation in Dermal Delivery: The Role of Excipients, *Pharmaceutics*, **13** (4), 542 (2021)
37. Freezing Weakens the Barrier Function of Reconstructed Human Epidermis as Evidenced by Raman Spectroscopy and Percutaneous Permeation, Yuri Dancik, Hichem Kichou, Christophe Eklouh-Molinier, Martin Soucé, Emilie Munnier, Igor Chourpa and Franck Bonnier, *Pharmaceutics* **12** (11), 1041; (2020)
38. Yali Liu, Richard Krombholz, Dominique Jasmin Lunter. Critical parameters for accurate monitoring of caffeine penetration in porcine skin using confocal Raman spectroscopy **607** (25) p.121055, (2021)
39. Richard Krombholz, Stefanie Fressle, Ines Nikolić, Ivana Pantelić, Snežana Savić, Milkica Crevar Sakač, Dominique Lunter, ex vivo–in vivo comparison of drug penetration analysis by confocal Raman microspectroscopy and tape stripping, *Experimental Dermatology*, **00** (2022)