

Creme statt Spritze

Pharmazeutische Charakterisierung Imiquimod-haltiger
Formulierungen zur transdermalen Immunisierung

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades

„Doktor der Naturwissenschaften“

Promotionsfach Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie

Fachbereich
09 - Chemie, Pharmazie und Geowissenschaften

der Johannes Gutenberg-Universität
in Mainz

Mark Denny

geb. in Mainz

Mainz, 2020

Dekan:

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Tag der mündlichen Prüfung: 06.05.2020

Diese Arbeit ist
meinen Großeltern
gewidmet.

Die Neugier ist die mächtigste Antriebskraft im Universum, weil sie die beiden größten Bremskräfte im Universum überwinden kann: die Vernunft und die Angst.

Walter Moers

I Inhaltsverzeichnis

I Inhaltsverzeichnis	4
II Abbildungsverzeichnis	6
III Tabellenverzeichnis	7
IV Formelverzeichnis	8
V Abkürzungsverzeichnis	9
1 Einleitung	11
1.1 Transkutane Immunisierung	11
1.1.1 Die menschliche Haut	11
1.1.2 Nicht-humane Hautmodelle	14
1.1.3 Impftechniken	16
1.1.4 Toll-Like-Rezeptor (TLR)	20
1.2 Imiquimod und seine Formulierungen	22
1.2.1 Wirkstoff Imiquimod	22
1.2.2 Arzneimittelentwicklung	24
1.2.3 Halbfeste Formulierungen	28
1.3 Grundlagen der Arbeitstechniken	31
1.3.1 Maschinelle Herstellung	31
1.3.2 Bearbeitung der Hautmodelle	37
1.3.3 Instrumentelle Analytik	38
2 Ziele dieser Dissertation	46
3 Materialien und Methoden	48
3.1 Geräte	48
3.2 Software	50
3.3 Materialien	50
3.4 Methoden	51
3.4.1 Technologische Entwicklung von ImiGEL	51
3.4.2 Biopharmazeutische Entwicklung von ImiGEL	59
3.4.3 Technologische Entwicklung von ImiSOL	62
3.4.4 Biopharmazeutische Entwicklung von ImiSOL	63
4 Ergebnisse	64
4.1. HPLC Validierung	64
4.1.1 Analytik Imiquimod	64
4.1.2 Analytik Imiquimod Verunreinigungen	68
4.1.3 Analytik Parabene	70

4.1.4 Anwendung auf ImiGEL	72
4.2 Reinigungsvalidierung Hochdruckhomogenisator	72
4.3 Abrieb	76
4.4 Penetrationsversuche ImiGEL in den Haut-Modellen Maus und Schwein.....	78
4.5 Betrachtung der chemischen und mikrobiologischen Stabilität von ImiGEL	86
4.6 Anbruch-Stabilität und Konservierungsmittelbelastungstest (KBT).....	88
4.7 Penetration von ImiSOL.....	89
4.8 Partikelgrößenbestimmung im DLS und NTA.....	91
5 Diskussion	93
5.1 HPLC Validierung	93
5.2 Reinigungsvalidierung Emulsiflex	96
5.3. Abrieb	97
5.4 Chemische und mikrobiologische Stabilität ImiGEL.....	98
5.5 Anbruch-Stabilität ImiGEL	100
5.6 Penetrationsversuche.....	101
5.7 Partikelgrößenbestimmung.....	106
6 Fazit und Ausblick.....	109
6.1 Fazit	109
6.2 Ausblick	110
Alternative Lipidphase ImiGEL.....	110
Möglichkeiten der biologischen Stabilisierung von ImiGEL	111
Stabilisierungsmöglichkeiten ImiSOL	112
Entwicklung eines pflasterbasierten Applikationssystems für ImiSOL.....	115
Kombination verschiedener TLR-Agonisten	116
7 Literaturverzeichnis.....	119
8 Publikationen.....	131
Veröffentlichungen	131
Vorträge mit Poster-Präsentation	131
9 Lebenslauf, Stand 02.2020	132
10 Eidesstattliche Erklärung	133
11 Danksagung	134
12 Anhang.....	135
12.1 Datenserie Imiquimod.....	135
12.2 Datenserie IRC	141
12.3 Datenserie Konservierungsmittel.....	143
12.4 Berichte Prüflabor	144

II Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Aufbau der Haut.....	11
Abbildung 2 Aufbau der Epidermis	12
Abbildung 3 Permeationswege des Wirkstoffs durch die Hornhaut	13
Abbildung 4 Rindereuter (bovine udder) System, schematisch	16
Abbildung 5 Zeitliche Abfolge von Immunantworten.....	17
Abbildung 6 Signaltransduktionswege der Toll-like Rezeptoren	22
Abbildung 7 Chemische Struktur und Wirkmechanismus von Imiquimod	23
Abbildung 8 Zeitstrahl der Entwicklung eines Wirkstoffs	24
Abbildung 9 Festes bröckliges Produkt ImiSOL nach Gefriertrocknung	30
Abbildung 10 Verflüssigung der plastischen Zubereitung durch leichten Scherstress.....	30
Abbildung 11 Leistungsfähigkeit von Zerkleinerungsmaschinen.....	32
Abbildung 12 Prinzip der Planetenkugelmühle.....	33
Abbildung 13 Prinzip des Homogenisators nach Lindenstruth (li.) und Schultz (re.)	35
Abbildung 14 Drei-Phasendiagramm des Wassers mit Tripelpunkt	37
Abbildung 15 Schematische Übersicht der DLS-Messung	39
Abbildung 16 Schematische Übersicht der NTA-Methodik	40
Abbildung 17 Typische Aufnahme der NTA	41
Abbildung 18 Schematischer Aufbau einer HPLC-Anlage	42
Abbildung 19 Trennwirkung der Säule auf eine Mischung mit drei Komponenten	43
Abbildung 20 Chemische Struktur der Parabene (li.) und Tween 80 (re.).....	45
Abbildung 21 Avestin C3-Emulsiflex vor (li.) und während (re.) der Produktion.....	56
Abbildung 22 Vorbereitung einer Maus für die Behandlung.....	60
Abbildung 23 Versuchsaufbau Penetration am Schweineohr	61
Abbildung 24 UV/ VIS-Kurvendiagramm von Imiquimod	64
Abbildung 25 HPLC-Kalibriergerade Imiquimod	65
Abbildung 26 Ausschnitt des Chromatogramms der monographierten Verunreinigungen ...	68
Abbildung 27 Kalibriergeraden der IRC A-E	69
Abbildung 28 Graphische Darstellung der Kalibriergeraden Methyl- und Propylparaben.....	71
Abbildung 29 Ermittlung eines Minimums an Imiquimod im HDH-System.....	73
Abbildung 30 Reduktion Imiquimod im HDH-System nach Verunreinigung	74
Abbildung 31 Zusammenfassung der Reduzierung des Wirkstoffs im HDH-System	75
Abbildung 32 Darstellung des Reinigungserfolgs unabhängig von der Ausgangsbelastung ...	76
Abbildung 33 Querschnitte der Maushaut nach einstündiger Einwirkung von Aldara®	78
Abbildung 34 Querschnitte der Maushaut nach einstündiger Einwirkung von ImiGEL	79
Abbildung 35 Penetration von Imiquimod aus ImiGEL in lebende Maushaut (n=1)	80
Abbildung 36 Penetration von Imiquimod aus Aldara® in lebende Maushaut (n=1)	80
Abbildung 37 Vergleichende Darstellung beider Formulierungen nach einer Stunde	81
Abbildung 38 Statistische Auswertung der Permeation von Imiquimod aus ImiGEL	82
Abbildung 39 Statistische Überprüfung des Vorversuchs für Aldara®	82
Abbildung 40 Analyse von ImiGEL auf mehreren Versuchstieren in Phase 3.....	83
Abbildung 41 Bestimmung der Verluste an Aldara® in Phase 3 (n=3).....	83
Abbildung 42 Analyse des physiologischen Einflusses.....	84
Abbildung 43 Querschnitte des Schweineohrs nach einstündiger Einwirkung von ImiGEL	85

Abbildung 44 Penetration ImiGEL am Model Schweineohr.....	86
Abbildung 45 Penetration von Imiquimod aus Aldara® am Modell Schweineohr	86
Abbildung 46 Penetrationsverhalten von ImiSOL auf lebende Maushaut (n=3).....	89
Abbildung 47 Gemittelte Werte aus der linken und rechten Euterhälfte	90
Abbildung 48 Kryogen-Schnitte des Rindereuters	91
Abbildung 49 Enzymatisches Metabolisierungsschema Imiquimod.....	99
Abbildung 50 Eindringtiefe von PLGA-Partikel verschiedener Größen.....	103
Abbildung 51 Wachstumsphasen von humanem Kopfhaar im Kreislauf	104
Abbildung 52 Schematischer Aufbau einer Mikrodialyse	105
Abbildung 53 Chemische Strukturen der Lipidphase des ImiSOLs	113
Abbildung 54 Verfärbung des ImiSOLs während der Lagerung	113
Abbildung 55 Zeitlicher Verlauf der Phasentrennung in ImiSOL binnen ca. 4 Wochen	114
Abbildung 56 Schematische Darstellung eines TTS Typ Matrixsystem nach Voigt.....	115
Abbildung 57 Mögliche Herstellung eines eigenen TTS.....	117

III Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Übersicht der ersten 10 TL-Rezeptoren	21
Tabelle 2 Beispiele des simple vs. complex extemporaneous compounded medicines	27
Tabelle 3 Zusammensetzung der beiden Imiquimod-Rezepturen ImiGEL und ImiSOL.....	31
Tabelle 4 Wasserbindungsarten nach Trocknungsaufwand	36
Tabelle 5 Lagerungsbedingungen nach ICH Q1A.	44
Tabelle 6 Auflistung der verwendeten Gerätschaften.....	48
Tabelle 7 Auflistung der verwendeten Materialien und Chemikalien.....	50
Tabelle 8 Verdünnungsreihe der Kalibrierkonzentrationen	53
Tabelle 9 Auszug der wichtigsten Analyseparameter aller Analyten.....	54
Tabelle 10 Zusammensetzung der Fließmittel und Diluenten	54
Tabelle 11 Versuchsplan Phase I	57
Tabelle 12 Versuchsplan Phase II	58
Tabelle 13 Auswertung der HPLC-Analyse mithilfe der Borwin Integrations Software.....	64
Tabelle 14 Gemittelte Flächen der Absorptionskurven von Imiquimod der Serien A-C.	65
Tabelle 15 Vergleich der Variationskoeffizienten Intraday	66
Tabelle 16 Berechnung der Messwertstreuung zwischen den Versuchstagen	66
Tabelle 17 Berechnung der Richtigkeit und Genauigkeit.....	67
Tabelle 18 Zweite Kalibriergerade Imiquimod Reinsubstanz.....	68
Tabelle 19 Gemittelte Daten der IRC zur Einschätzung der Präzision	69
Tabelle 20 Auswertung des Chromatogramms einer Mischung der Verunreinigungen.	70
Tabelle 21 Tabellarische Darstellung der Kalibriergeraden der Konservierungsmittel	71
Tabelle 22 Daten zur Berechnung des Wirkstoffgehalts in Tube „0,1 %“	72
Tabelle 23 Darstellung der gemittelten Ergebnisse der Parabene aus Tube „0,1 %“	72
Tabelle 24 Ergebnisse Imiquimod im Emulsiflex; Kontinuierlicher Modus.....	73
Tabelle 25 Belastungsreduzierung des Wirkstoffs, Lauf B	74
Tabelle 26 Ergebnisse Imiquimod im Emulsiflex; diskontinuierlichen Modus.....	75
Tabelle 27 Gravimetrische Bestimmung des Abriebs der Kugeln in wässrigem Medium.	76
Tabelle 28 Vierfache Vermessung des Abriebs des Bechers und des Deckels	77
Tabelle 29 Gravimetrische Bestimmung des Abriebs der Kugeln	77
Tabelle 30 Extraktion von Imiquimod-Zubereitung aus Watte.....	79

Tabelle 31 Zusammenfassung der chemischen und mikrobiellen Stabilität von ImiGEL	87
Tabelle 32 Ergebnisse KBT der Blindwert-Chargen nach 28 Tagen	88
Tabelle 33 Ergebnisse mikrobieller Befall nach Anbruch	88
Tabelle 34 Partikelgrößen nach Mahlung und Homogenisierung	92
Tabelle 35 Bewertungskriterien Ph.Eur. 9.0 (2017, Prüfung 5.1.3) am Beispiel von Topica .	100
Tabelle 36 Jojobaöl und seine Inhaltsstoffe	102
Tabelle 37 Alternative antioxidative Adjuvanzen zu Tocopherol	114
Tabelle 38 Rohdatensammlung der neun Validierungsläufe des Wirkstoffs Imiquimod.	135
Tabelle 39 Datenübersicht der chemischen Stabilität für Imiquimod	136
Tabelle 40 Grunddatensatz des Reinigungserfolgs unabhängig der Startbelastung	137
Tabelle 41 Darstellung des aus den Kryogenschnitten gefundenen Imiquimods	138
Tabelle 42 HPLC-Gehaltsbestimmung der Tesa-Strips am Euter aus ImiSOL	139
Tabelle 43 Kurzvalidierung der Verunreinigungs-Mischung	141
Tabelle 44 Validierung der Einzelstoffe IRC A, B, C, D und E auf Basis der HPLC-Flächen.....	142
Tabelle 45 Validierung der Konservierungsmittel in der Mischung	143
Tabelle 46 Analyse der beiden Parabene aus ImiGEL	143

IV Formelverzeichnis

Gl. 01	Zerkleinerungsgrad.....	33
Gl. 02	Stoke'sches Gesetz.....	34
Gl. 03	Berechnung des z-Average.....	40
Gl. 04	Berechnung des z-Average bei Rayleigh-Streuung.....	40
Gl. 05	Berechnung der Polydispersität.....	40
Gl. 06	Einstein-Stoke-Gleichung.....	41
Gl. 07	Arithmetischer Mittelwert.....	52
Gl. 08	Standardabweichung.....	52
Gl. 09	Variationskoeffizient, prozentual.....	52
Gl. 10	Genauigkeit.....	52
Gl. 11	Richtigkeit, prozentual.....	52
Gl. 12	Gehalt Imiquimod.....	55
Gl. 13	Gehalt IRC.....	55
Gl. 14	Gehalt Parabene.....	55
Gl. 15	Fick'sche Diffusionsgesetz.....	103

V Abkürzungsverzeichnis

μ	Wahrer Wert/ Sollwert
ABDA	Arbeitsgemeinschaft der Berufsvertretungen Deutscher Apotheker (früher), heute Bundesvereinigung Deutscher Apothekerverbände
AMG	Gesetz über den Verkehr mit Arzneimitteln - Arzneimittelgesetz
AMWHV	Verordnung über die Anwendung der Guten Herstellungspraxis bei der Herstellung von Arzneimitteln und Wirkstoffen und über die Anwendung der Guten fachlichen Praxis bei der Herstellung von Produkten menschlicher Herkunft - Arzneimittel- und Wirkstoffherstellungsverordnung
ApBetrO	Verordnung über den Betrieb von Apotheken - Apothekenbetriebsordnung
ApoG	Gesetz über das Apothekenwesen - Apothekengesetz
AS	Autosampler
CV	Coeffitient of variation, Variationskoeffizient
DAC	Deutscher Arzneimittelkodex, erarbeitet durch die ABDA (s. ABDA)
DG	Degaser
DLS	Dynamic light scattering, dynamische Lichtstreuung
EDQM	European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare, Europäisches Direktorat für die Qualität von Arzneimitteln
FMA/ FMB/ FMC	Fließmittel A/ B oder C
GCP	Good Clinical Praxis, dt. Gute klinische Prüfungspraxis
GMP	Good Manufacturing Practice, dt. Gute Herstellungspraxis
HDH	Hochdruckhomogenisation oder Hochdruckhomogenisator
HE	Herstellungserlaubnis nach § 13 AMG
HE-Lösung	Hämalaun-Eosin-Färbelösung
ICH	International Council for Harmonisation of <i>Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use</i> , Internationales Komitee
IfSG	Gesetz zur Verhütung und Bekämpfung von Infektionskrankheiten beim Menschen- Infektionsschutzgesetz
IPC	In Prozess Kontrolle
IRC	Imiquimod Related Compound
JGU	Johannes Gutenberg-Universität Mainz
KBE	Kolonie bildende Einheit(en)
KBT	Konservierungsmittelbelastungstest
LG	Low Pressure Gradient Unit = Mixer/ Mischer
li.	links

LOD	Limit of Detection, Detektionsgrenze
LOQ	Limit of Quantification, Bestimmungsgrenze
MP	Methylparaben
MW	Mittelwert
NRF	Neues Rezeptur Formularium, eigener Band des DAC (s. DAC)
NTA	Nanoparticle tracking analysis,
PAMPs	pathogen-associated molecular patterns, Pathogen-assoziierte molekulare Muster
PDI	Polydispersitätsindex
Ph.Eur.	Pharmacopoea Europaea, Europäische Pharmakopöe
PP	Propylparaben
PU	Pumpe
q.s.	quantum satis, dt. „so viel wie nötig“
QK	Qualitätskontrolle
re.	rechts
Rh ⁺ / Rh ⁻	Rhesusfaktor positiv/ negativ
RKI	Robert Koch Institut
StAW	Standardabweichung
TCI	Trancutaneous immunisation, Transkutane Immunisierung
THF	Terminal Hair Follicle, Erwachsener Haarfollikel
TTS	Transdermales Therapeutisches System
USP	United States Pharmacopeia, Amerikanisches Arzneibuch
UVD	UV / VIS-Detektor
VAV	Verantwortungsabgrenzungsvertrag
VHF	Vellus Hair Follicle, Kindliches Primärhaar, Flaumhaar
Wdh	Wiederholung(en)
Zub.	Zubereitung

1 Einleitung

1.1 Transkutane Immunisierung

1.1.1 Die menschliche Haut

Unsere Haut stellt das flächenmäßig größte und vielseitigste Organ sowie die äußere Barriere des menschlichen Körpers dar. Sie wird je nach Körperstelle 1,5-4 mm dick (1) und kann bei einem Erwachsenen eine durchschnittliche Fläche von 1,73 m² einnehmen.

Die Funktionen der Haut sind vielfältig und weitreichend. So schützt sie den Körper vor äußeren Einflüssen, wie mechanischen Verletzungen, dem Eindringen von Krankheitserregern, Schäden durch (Licht-)Strahlung sowie gasförmigen, flüssigen oder festen Fremdstoffen. Flüssigkeits-, Elektrolyt- und Proteinverluste aus dem Inneren werden verhindert oder mindestens gesteuert. Des Weiteren regelt sie als Sinnesorgan die Wärme-/Kälte-Sensorik, Berührungsreize sowie Schmerzempfindung. Die Haut besitzt eine natürliche Flora, die aus Bakterien, Pilzen aber auch kleinen Insekten bestehen kann. Der pH-Wert der Haut wird abhängig von Person und Körperregion im leicht sauren Bereich beschrieben (2). Sie wird aus Kutis, bestehend aus Epidermis (Oberhaut) und Dermis (Lederhaut), und Subkutis (Unterhaut) zusammengesetzt (siehe Abbildung 1).

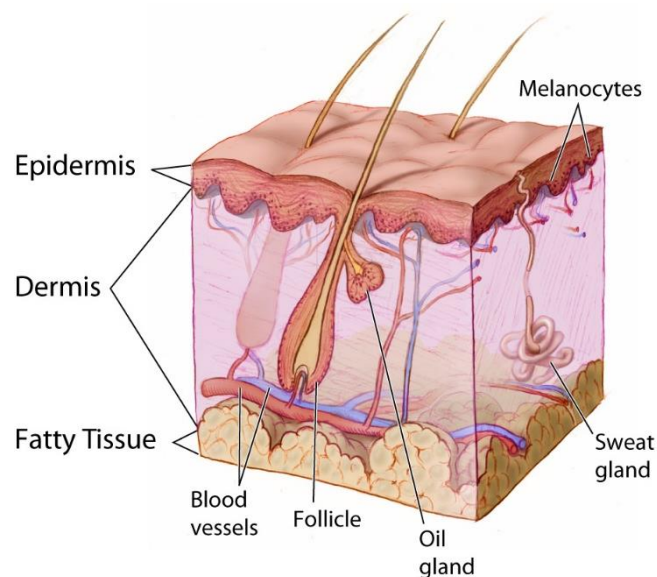


Abbildung 1 Aufbau der Haut

Die Epidermis unterteilt sich in vier bis fünf Zellschichten und misst im Durchschnitt einen halben Millimeter. Während die Dermis Haarfollikel und Schweißdrüsen beinhaltet, durchzieht die Unterhaut ein Netz aus Blutgefäßen und Nerven. (3)

Die Unterhaut bildet die Basis für die darüber liegenden Hautschichten und ist mit größeren Blutgefäßen sowie Nerven durchzogen. Ebenfalls befinden sich hier die subkutanen Fettspeicher der Haut. Hautanhangsgebilde entspringen hingegen der Dermis. Hierzu gehören Haare, Nägel, Talg- und Schweißdrüsen. Während im oberen Bereich der Dermis die Oberhaut durch ein feines Kapillarsystem mit Nährstoffen versorgt wird, regeln die unteren Lederhautschichten die Temperatur.

Bei genauerer Betrachtung der Epidermis (0,03-0,05 mm), kann ein geschichteter Aufbau festgestellt werden, der von der Dermis beginnend, in das Stratum basale (Basalschicht), das

Stratum spinosum (Stachelzellschicht), das Stratum granulosum (Körnerzellschicht), das Stratum lucidum (Glanzschicht, nur an Hand- und Fußinnenseiten) und das Stratum corneum (Hornschicht) unterteilt wird (Abbildung 2). Durch im Stratum spinosum angesiedelte Immunzellen, sogenannte dendritische Zellen, fungiert die Haut als wichtige Säule der Immunreaktion. Zu diesen Zellen zählen Langerhans-Zellen, Monozyten und Makrophagen (4). Sie spielen eine Schlüsselrolle in der Initiierung, Modulierung und Beendigung von kutanen Entzündungsprozessen. Hierbei nutzen sie ihre Fähigkeit, aus Blutgefäßen in das betroffene Gewebe einzuwandern und durch das Lymphsystem in nahe gelegene Lymphknoten auswandern zu können. Dort interagieren sie mit Lymphozyten und initiieren folgend eine spezifische Immunantwort (5; 6).

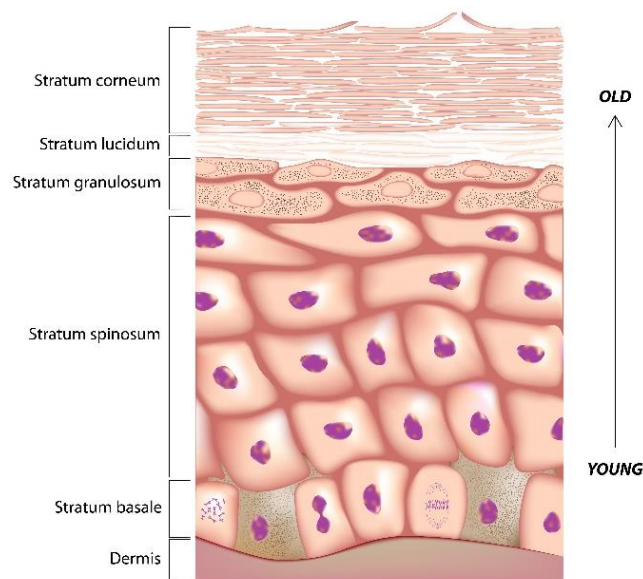


Abbildung 2 Aufbau der Epidermis

Von der Dermis aus altern die Keratinozyten binnen 20-30 Tagen nach außen und erhalten so die Schutzfunktion der Haut langfristig (7). Während die jüngeren Zellen einen Wasseranteil von 70 % besitzen, schrumpft dieser mit steigendem Alter auf 15 %.

Die physikalische Schutzfunktion der Haut wird langfristig erhalten durch die natürliche Alterung ihrer Zellen. Diese Zellen, Keratinozyten genannt, flachen ausgehend vom Stratum basale binnen 20 bis 30 Tagen ab und hinterlassen dünne Zellschuppen auf der Hautoberfläche (Abbildung 2). Durch ständige Abschilferung und Schuppung, mechanische Abnutzung sowie chemische Korrosion werden diese, nun abgestorbenen, Keratinozyten (dann Korneozyten genannt) abgestoßen und durch neue ersetzt. Während die Haut insgesamt einen Wassergehalt von ca. 70 % besitzt, weist die Hornschicht nur einen Anteil von ca. 15-20 % Wasser auf. Sie verfügt allerdings über ein hohes Wasseraufnahmevermögen (8). Die aufgeschichteten Korneozyten liegen in 15-20 Schichten toter Zellen backsteinmauerähnlich in einer Lipidmatrix vor, die das Eindringen diverser Stoffe durch die äußerste Barriere in tiefere Hautschichten sehr erschwert (9). Die Lipidmatrix wird hierbei vor allem aus Ceramiden sowie Cholesterol und seinen Estern gebildet. Wichtige Faktoren für eine Penetration sind entsprechend der Hautarchitektur eine ausreichende Lipophilie und eine geringe Molekülgröße sowie der Hydratationsstatus der Haut. Generell werden drei verschiedene Transportwege durch die Hornschicht beschrieben (Abbildung 3):

1. Diffusion: Sie wird durch einen Konzentrationsgradienten angetrieben und versucht ein Stoffgleichgewicht zwischen Zellaußenseite und –Innenseite herzustellen. Zur Aufnahme eines Stoffes in die Haut nehmen hierbei Drüsenkanäle und Haarfollikel eine besondere Rolle ein. Sie dienen als Abkürzung in tiefere Hautschichten und können so eine Stoffresorption in tiefere Gewebe beschleunigen. Durch kreisförmige Massage können die auf der Hautoberfläche aufgetragenen Formulierungen schraubenartig in die Haarkanäle eingebracht werden. Unter Umständen bildet sich hieraus eine Art Depot der Zubereitung (10; 11; 12).

2. Interzellulärer Transport: Durch die enge Verschachtelung der Zellen und die dazwischen befindliche Lipidmatrix, ist eine zwischenzelluläre Wanderung nur lipophilen und kleinen Stoffen vorbehalten. Je nach Hydratationszustand der Haut quellen die einzelnen Schichten auf und erleichtern es größeren und hydrophileren Stoffen zwischen den Zellen hindurch zur Dermis zu gelangen (13).

3. Transzellulärer Transport: Diese Route kann nur von Stoffen mit stark ambivalenten Fähigkeiten genutzt werden. Der Stoff muss lipophil genug sein, die Zellmembranen und die Lipidmatrix zu überwinden, aber auch hydrophil genug sein, um im Zellplasma diffundieren zu können. Aufgrund des der Haut aufliegenden dichten Gefüges aus toten Zellen wird diesem Transportweg jedoch keine tragende Rolle beigemessen (14; 15).

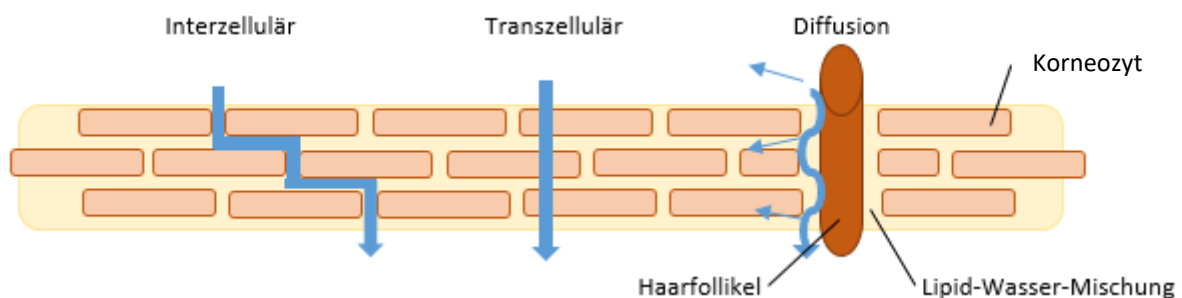


Abbildung 3 Permeationswege des Wirkstoffs durch die Hornhaut

Das Epithel ist backsteinartig aufgebaut und wird durch einen lipidhaltigen „Mörtel“ zusammengehalten. Je nach Hydratationszustand sind die Abstände der Zellen zu einander durch Quellung erweitert, sodass eine Passage hydrophiler Stoffe erleichtert wird.

Die dargestellten Permeationswege gelten nur für gesunde intakte Haut. Bei Vorliegen von Wunden oder Narbengewebe können körperfremde Substanzen leichter und tiefer bzw. nur schwerer und flacher in die Hautschichten eindringen. Weiterhin können die Temperaturregelung sowie die Sekretion hauteigener Substanzen verändert sein. Zusammenfassend stellt die Haut somit nicht nur ein lebensnotwendiges, sondern auch höchst individuelles Organ dar. Dies macht eine wissenschaftliche Betrachtung mit dem Ziel einer allgemein gültigen Aussage schwer.

Für derzeitige Forschungsprojekte können zwei humane Hautsysteme genutzt werden. Zum einen werden bspw. die Hautreste von Bauchdeckenstraffungen im Rahmen von notwendigen plastisch-ästhetischen chirurgischen Eingriffen für wissenschaftliche Untersuchungen genutzt. Dem Vorteil, das später effektivere Modell zu studieren, steht der präparative Aufwand entgegen. Die Haut muss hierzu vom anhängenden Unterhautfettgewebe befreit werden. Durch das Ablösen mit Schere und Skalpell kann das Gewebe leicht verletzt werden. Ebenso kommt es durch das Ablösen zu einer anschließenden Verkleinerung der Poren. Sobald die

Haut aber für Franz-Zell-Versuche erneut gespannt wird, können teils augenscheinliche Poren entstehen, die das Ergebnis einer Permeation oder Penetration verfälschen. Zudem können keine metabolischen Vorgänge in totem Gewebe untersucht werden. Um die Haltbarkeit der Hautreste zu erhöhen, kann diese tiefgefroren werden.

Um diese Nachteile zu umgehen wird als zweites System künstliche Haut verwendet. Hierzu werden bspw. wie bei *Zacchi et al.* beschrieben (16), Keratinozyten (Epidermis) und Fibroblasten (Dermis) erst einzeln gezüchtet und dann in Co-Kultur inkubiert. Die Ergebnisse dieser Studie zeigten eine hohe Übereinstimmung von gebildeten Signalmolekülen im Vergleich zu normaler Haut. Als bekanntestes Einsatzgebiet ist sicherlich die Anwendung von künstlicher Haut bei schwersten und großflächigen Verbrennungen zu nennen. Aufgrund des noch jungen Alters dieser Forschung sind künstliche Hautmodelle für spezifische Fragestellungen noch nicht ausgereift und darüber hinaus recht kostenintensiv. Um wiederum diesen Nachteil zu umgehen, werden Tiermodelle verwendet, die folgend dargestellt werden sollen.

1.1.2 Nicht-humane Hautmodelle

Generell wird die Fähigkeit der Permeation oder Penetration eines Stoffes durch die Haut durch eine Vielzahl an Faktoren festgelegt. Hierbei spielen die Eigenschaften des Stoffes an sich eine Rolle (Konzentration, Molekülgröße, Löslichkeit, Proteinbindung, usw.). Genauso wichtig sind die Eigenschaften der halbfesten Arzneiformulierung (Vehikeleigenschaften, Benetzungsfähigkeit, Löslichkeit des Wirkstoffes, usw.) worauf später näher eingegangen werden soll. Zu guter Letzt sind aber auch die Hauteigenschaften (Zustand der Haut, Hauttyp, usw.) (8) von tragender Wichtigkeit für eine erfolgreiche topische Behandlung. Da sich eine experimentelle Untersuchung aller Faktoren auf humaner Haut aus ethischen Gründen nicht realisieren lässt, bedient sich die moderne Wissenschaft, wie so oft, an Testsystemen, die dem menschlichen Vorbild möglichst nahekommen. Im Speziellen wurde in dieser Arbeit die Rückenhaut von Mäusen, die Haut von Schweineohren und ein unbehandelter Rindereuter verwendet.

Modell Maus

Nagetiere spielen in der experimentellen Wissenschaft eine zentrale Rolle. Das Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft, verantwortlich für die Genehmigung von Tierversuchen, veröffentlichte 2015 eine Erhebung zur Registrierung von Tierversuchen (17), aus dessen Zählung für das Jahr 2014, der Einsatz von ca. 2 Millionen Wirbeltieren zu wissenschaftlichen Zwecken hervorging. Mäuse machten hier einen Anteil von knapp 70% aus. Gründe für den häufigen Einsatz sind eine 98 %ige Übereinstimmung des Mäuse-Genoms mit dem des Menschen, aber sicherlich auch die kostengünstige Beschaffung und Haltung der Tiere. Bezogen auf das Forschungsvorhaben dieser Arbeit, stellt die Maus ein gutes Modell dar, wenngleich mit Einschränkungen. Im direkten Vergleich zur Maus erscheint humane Haut eher haarlos und vergleichsweise dick. Dies beeinflusst die Versuchsreihe im Hinblick auf die Spreitbarkeit der Formulierung, die Anzahl der Follikel pro Hautfläche und der Dicke der Penetrationsschicht.

Ein zweiter nennenswerter Vertreter der Nagetiere ist das Meerschweinchen. Während in Studien nachgewiesen werden konnte, dass die Haut der *Cavia porcellus* eine höhere Vergleichbarkeit zum Menschen besitzt (18), wird der Einsatz von Meerschweinchen generell seit 2009 reduziert. Stattdessen wird vermehrt auf artifiziell gezüchtete Haut zurückgegriffen.

Da in dieser Arbeit weder auf künstliche Hautmodelle noch auf Meerschweinchen zurückgegriffen werden konnte und eine Vergleichbarkeit zu vorangegangenen Versuchen wichtig war, wurden weiterhin Mäuse als Hauptmodell verwendet. Diese wurden hierfür entsprechend vor der Behandlung präpariert, d.h. rasiert, um eine direkte Kontaktfläche zwischen Arzneimittel und Haut zu erreichen. Die Versuche wurden an erwachsenen Tieren, ungefähr gleichen Alters durchgeführt um den Einfluss der Follikel und Hautdicke innerhalb des Versuchs auszugleichen. Ein weiterer Vorteil war die Behandlung lebender Tiere und damit die Möglichkeit einer immunologischen Auswertung. Während die Arzneimittel-Behandlung an lebenden Tieren durchgeführt wurden, erfolgte die analytische Auswertung an der exzidierten Haut.

Modell Schwein

Für experimentelle Vergleichsstudien wird üblicherweise die Haut der Schweineohren verwendet. Diese sind zwar als Schlachtabfälle leicht und günstig zu beschaffen, allerdings muss darauf geachtet werden, dass sie unbehandelt, also weder gebläut oder gebrüht, vorliegen. In mehreren Studien konnte sich die Ohrhaut des Schweines im Vergleich zur Rückenhaut der Ratte in Bezug auf die Vergleichbarkeit zur menschlichen Bauchhaut durchsetzen (19). Generell besitzt sie Ähnlichkeit im Behaarungsgrad und der Hautdicke zum humanen Vorbild. Ein weiterer Vorteil ist die Möglichkeit den follikulären Transport zu untersuchen. Diese Vorteile werden durch den präparativen Aufwand etwas geschmälert. Die gewünschte Haut liegt fest auf einer Knorpelschicht auf, die nur schwer zu entfernen ist. Dennoch entstehen weniger bzw. kleinere Löcher und Poren beim Ablösen und Aufspannen der Schweinehaut im Vergleich zur menschlichen Haut. Genau wie im humanen Modell wird totes Gewebe verwendet, sodass keine Aussagen zu einem möglichen Metabolismus des angewendeten Arzneimittels getroffen werden kann. Diesem Nachteil kann durch ein aufwendiges apparatives Verfahren entgegengewirkt werden, das am Beispiel eines Rindereuters beschrieben wird.

Modell Rindereuter

Verwendet wird die Haut der bovinen Milchdrüse. Ein solches Rindereuter besteht aus zwei identischen Mammakomplexen, die bilateral symmetrisch und je separat angeordnet sind (20). Aufgrund dieser anatomischen Gegebenheit können physiologische Studien beider Euterhälften durchgeführt werden, die durch die genetische Übereinstimmung eine ideale Vergleichbarkeit ermöglichen. Somit können Differenzen zwischen verschiedenen Organspendern (Kühe) vermindert werden. Das abgenommene unbehandelte Euter ist Schlachtmaterial und wird im Labor mit einer Elektrolyt- und Glukose-Lösung perfundiert (Abbildung 4). Auf diese Weise kann das Organ bis zu acht Stunden am Leben erhalten werden; der aerobe Hautstoffwechsel und die damit verbundene Barriere- und Reservoirfunktion der Hornschicht bleiben erhalten. Aufgrund seiner Morphologie und seines Penetrationspotentials entspricht die Haut der bovinen Milchdrüse der menschlichen Rückenhaut mit wirklichkeitsnaher Prädiktion. Experimentelle Auswertungen können im Bovine Udder System (BUS) über das Eluat (Perfusionslösung) und Biopsiestanzen erfolgen, wobei die Prüfstoffe offen oder okklusiv sowie einfach oder mehrmals aufgetragen werden können. Die Penetration aufgetragener Stoffe wird also expositionsabhängig (Dauer und Stärke) charakterisiert. Aufgrund des erhaltenen Hautstoffwechsels können darüber hinaus

sogar lokale Entzündungsreaktionen sehr gut nachvollzogen werden. So wurde die BUS-Modell-Methodik zuerst in der Pharmaforschung eingeführt und ab 1993 von Kosmetika-Herstellern zur Irritationsprüfung von bspw. Hautpflegemittel (Creme/ Lotion), Haarshampoos oder Reinigungsmitteln eingesetzt.

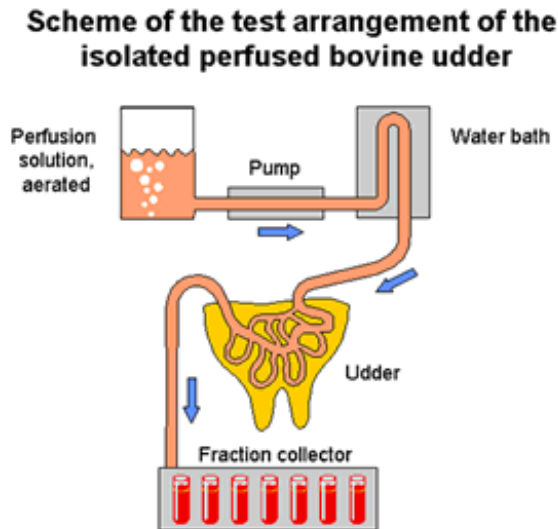


Abbildung 4 Rindereuter (bovine udder) System, schematisch

Die Euterhälfte wird mit einer erwärmten Perfusionslösung durchströmt, wobei die durch die Haut penetrierten Stoffe nach Zeit aufgeschlüsselt werden können. Die einzelnen Fraktionen werden dann durch analytische Verfahren identifiziert und quantifiziert (21).

1.1.3 Impftechniken

Das Immunsystem wird aus einem komplexen Konstrukt aus Zellen, Proteinen, Enzymen und Stoffen gebildet, das den Körper vor schädlichen Angriffen von „innen“ (entartete Zellen) wie „außen“ (Bakterien, Viren, Antigene) beschützen soll. Zum Teil ist dieser Schutzschild bereits angeboren, teils wird er erst durch Kontakt mit entsprechenden Erregern erlernt. Um diese Lernphase zu beschleunigen und eventuelle Erkrankungen in ihrem Verlauf abzumildern, bedient sich die heutige Medizin der Methode der Impfung. Der Begriff der Impfung oder auch Vakzinierung stammt von dem lateinischen Wort für Kuh, „*vacca*“, eingeführt 1796 durch den Arzt Edward Jenner. Dieser infizierte einen Jungen mit Kuhpockenmaterial, woraus eine Immunität des Heranwachsenden gegenüber den gewöhnlichen Pocken resultierte. Aufgrund des Durchbruchs gegen diese totbringende Krankheit und damit der Eindämmung der Pockenepidemie, wurde bereits ~1830 eine Impfpflicht in Teilen Europas eingeführt. Den eigentlichen Nachweis, dass bakterielle Erreger Verursacher der gravierenden Erkrankung waren, erbrachten Louis Pasteur und Robert Koch gegen Ende des 19. Jahrhunderts. Seither konnten eine Vielzahl von Krankheiten auf identische Weise eingedämmt oder ausgerottet werden. Letztere durchleben allerdings zurzeit eine Renaissance aufgrund starker Impfgegnerkampagnen. Die WHO erklärte 2019 die Gemeinschaft der Impfgegner sogar als eine der Top-10-Bedrohungen der globalen Bevölkerung (22). Auf Deutschland bezogen berichtet das Robert Koch Institut (RKI) in seinem aktuellsten *Epidemiologisches Bulletin* (23) u.a. von der steigenden Impfmüdigkeit und den daraus resultierenden steigenden Inzidenzen von bspw. Masernausbrüchen in stichprobenartig ausgewählten Bundesländern. Dass eine ernst zu nehmende Bedrohung der gesundheitlichen Lage der Bundesrepublik vorliegt, kann

auch aus den aktuellen Bemühungen des Bundesministeriums für Gesundheit (BMG) abgelesen werden. Mit Inkrafttreten der letzten Änderung des Infektionsschutzgesetz (IfSG, 2019) wurde die Freiwilligkeit zur Impfscheidung für bestimmte Personen aufgehoben, um eine höhere Durchimpfungsrate zu erreichen (24). Landläufig als Masernschutzgesetz bekannt, stellt dies eine Impfpflicht für Säuglinge, Kinder und Jugendliche sowie deren betreuendes Personal dar.

Die Medizin unterscheidet verschiedene Immunisierungsarten. Zum Einsatz können Lebend- als auch Totimpfstoffe innerhalb einer aktiven oder passiven Impfung zum Einsatz kommen. Innerhalb der aktiven Impfung werden dem Patienten direkt funktionsfähige aber abgeschwächte (attenuierte) Antigene verabreicht. Beispielsweise werden Masern, Mups und Röteln in vermehrungsfähigem Zustand als Kombination verabreicht. Die Kleinkinder können Symptome der Infektionen zeigen, doch brechen die Krankheiten nicht aus. Vorteile liegen in einer teilweise lebenslangen Immunisierung und einer guten Verträglichkeit. Nachteile stellt diese Strategie für immungeschwächte Patienten dar. Hier kann der behandelnde Mediziner auf Totimpfstoffe zurückgreifen, die nicht vermehrungsfähige Einheiten enthalten. Zu diesen Einheiten können Strukturen, Proteine sowie Spaltprodukte und Untereinheiten dergleichen gehören. Als Beispiele sollen Diphtherie (Toxoidimpfstoff), Tollwut (Ganzpartikelimpfstoff) und Hepatitis-B (Untereinheitenimpfstoff) genannt werden. Weitere Entwicklungen der Totimpfstoffe stellen DNS- und virale Vektoren dar. Die Kombination von Lebend- und Tot- bzw. Tot- und Totimpfstoffe kann in den meisten Fällen simultan verabreicht werden. Für die Verabreichung zweier Lebendimpfstoffe wird eine vierwöchige Pause empfohlen.

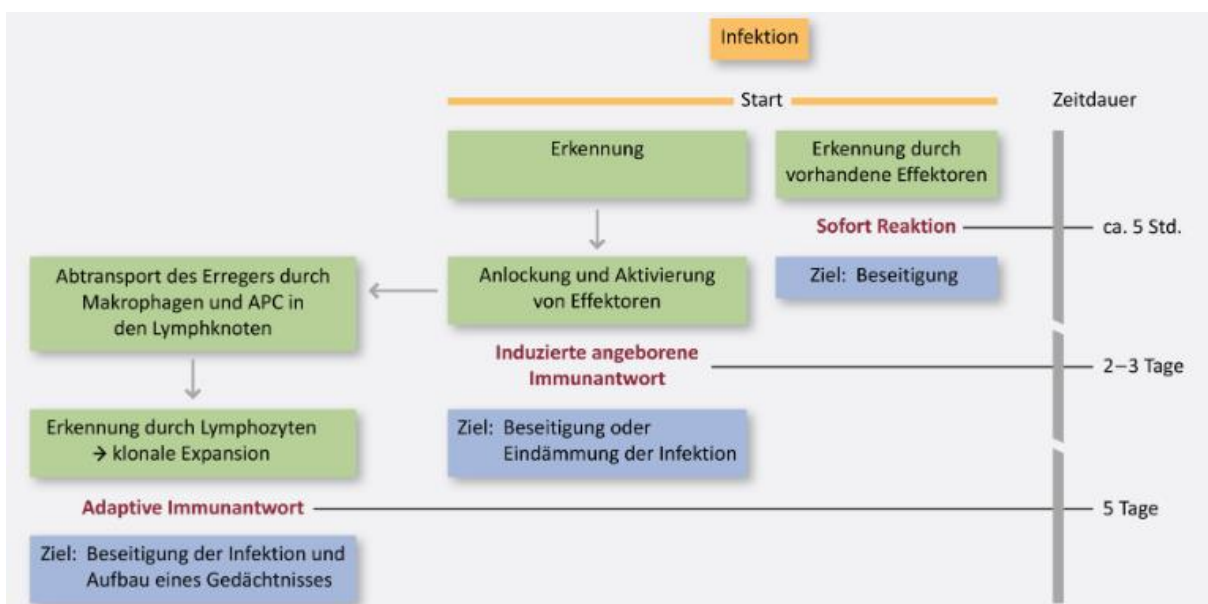


Abbildung 5 Zeitliche Abfolge von Immunantworten

Schema nach Vollmar (6). Je nach Erkennungsstatus des Antigens durch die vorhandenen Effektoren, kann eine Sofortantwort binnen eines Tages gestartet oder muss eine adaptive Immunantwort über eine knappe Woche entwickelt werden.

Während das Immunsystem, wie beschrieben, in einer aktiven Strategie die Infektionskaskade also selbst durchläuft, erhält der Patient in einer passiven Immunisierung ausschließlich den gewünschten Antikörper. Um diesen zu gewinnen wurden früher Tiere mit dem Antigen infiziert und die Antikörper aus deren Blutserum extrahiert. Etwas fortschrittlicher werden heute Zellkulturen zur Herstellung monoklonaler Antikörper gezüchtet, die folgend dem Patienten verabreicht werden. Durch diese Gabe entsteht ein schneller aber kurzzeitiger

Schutz, der kein Impfgedächtnis auslöst. Als Beispiele sollen hier die Rhesusfaktorschutzimpfung der (Rh⁻)-Mutter bei der Geburt eines (Rh⁺)-Kindes und die natürliche passive Immunisierung des Kindes durch Stillen mit Muttermilch angeführt werden. In den Körper eingedrungene Antigene werden durch diesen, aufgrund eines einfachen Rezeptormechanismus (PRR, pattern recognition receptors) als körperfremd (PAMP, pathogen-associated molecular pattern) erkannt. Folgend wird eine Bekämpfungskaskade ausgelöst (Abbildung 5). Dieser Kampf endet entweder in einer Sofortreaktion durch bereits vorhandene Effektoren oder in einer Anlockung und Aktivierung von weiteren Effektoren, die den Erreger abtransportieren, zerlegen und gegenüber Lymphozyten präsentieren. Hierdurch wird eine Bildung von Immunzellen mit Gedächtnis ausgelöst, die im Bedarfsfall zur Bildung von Abwehrstoffen (Antikörpern) aktiviert werden können. Effektoren können u.a. Antigenpräsentierende Zellen sein (APC; bspw. Makrophagen, B-Zellen oder dendritische Zellen). Diese APCs phagozytieren in unreifer Form Pathogene, zerkleinern diese und präsentieren jene Fragmente auf ihrer Zellmembran. Parallel zur Phagozytose (Verdauung) wandern sie aus ihren Geweben ins lokale Lymphgewebe aus und aktivieren dort als mittlerweile gereifte, hochspezialisierte APC, naive T-Zellen. Hierzu exprimieren sie eine Vielzahl an MHC-II-Molekülen auf ihrer Membranoberfläche. Neben dieser Reifung setzen besonders Makrophagen eine Vielzahl an Zytokinen frei, die daraufhin eine Entzündungsreaktion im betroffenen Gewebe auslösen. Als Administrationswege einer Vakzinierung werden je nach Immunisierungsart (aktiv oder passiv) und Antigen (Tot- oder Lebendimpfstoff) verschiedene Strategien beschrieben:

Nasale/ pulmonale Zubereitungen

Sowohl die Nase als auch die Lunge stellen die natürlichen Eingangspforten in den Körper für Pathogene dar. Dementsprechend ist das Immunsystem von Natur aus dort hochaktiv und schnell wirksam. Beide Applikationsorte wären somit für eine Impfung prädestiniert, wenn nicht gewisse Faktoren dieser Therapie entgegenständen. Aufgrund der hohen mukoziliären Clearance wird eine langfristige Kontaktzeit zwischen Immunzellen und Antigen erschwert. Dies kann durch Adjuvantien bis zu einem gewissen toxischen Punkt kompensiert werden, dennoch haben es bisher nur wenige Zubereitungen zu einer Marktzulassung geschafft. Eine pulmonale Administration wird darüber hinaus durch Partikelgröße und -geschwindigkeit bestimmt. Es muss also neben der Zubereitung auch ein Gerät entwickelt werden, das ein entsprechendes Aerosol erzeugen kann. Bisherige Unternehmungen diesbezüglich scheiterten innerhalb der klinischen Studienphase (25). Grundlegend wäre es sicherlich eine kostenintensive Behandlung, bei der man aber eine hohe Akzeptanz und Compliance beim Patienten vermuten könnte.

Orale/ sublinguale Zubereitungen

Die weltweit am häufigsten durchgeführte Impfung, war die Poliomyelitis-Schluckimpfung. Mittlerweile wird aber auch diese parenteral verabreicht. Darüber hinaus wurden Studien zu Masern- und Cholera-Impfungen durchgeführt, die aber das Phase 1-Stadium nicht überschritten. Die Anforderungen an oral verabreichte Pathogene sind aufgrund der Magen-Darm-Passage extrem hoch. So müssen sie den niedrigen pH-Wert des Magens von ca. 1 überstehen und vor dem First-Pass-Effekt eine ausreichende Aktivierung des Immunsystems eingeleitet haben. Trotz Ausschöpfung galenischer Kniffe konnten, bis auf die oben genannte Ausnahme, bisher keine überzeugenden Impfergebnisse erzielt werden (25). Eine etwas erfolgreichere Therapievariante stellt die bukkale oder sublinguale Zubereitung dar. Die sehr

gute Stoffaufnahme durch die Mundschleimhäute verbunden mit einer Umgehung des First-Pass-Effekts sind hinlänglich bekannt, wobei eine Impfung im klassischen Sinne nicht durchgeführt wird. Produkte wie SLITone®, Sublivac® und AllerSlit® forte werden für die Allergie-Therapie eingesetzt, um eine Desensibilisierung zu erreichen. Präklinische Daten zeigen darüber hinaus gewisse Erfolge bei Gabe von Influenza-Antigen in Kombination mit Cholera-Toxin als Adjuvans in Mäusen (25; 26).

Parenterale Zubereitungen

Die Anwendung parenteraler Zubereitungsformen mittels Spritzen macht den größten Anteil der Impfstherapie aus. Dabei werden sterile Lösungen oder Suspensionen intradermal, subkutan oder intramuskulär verabreicht. Frühere Anwendungen ins Fettgewebe werden mittlerweile als obsolet betrachtet und vermieden (6). Der Vorteil der Gabe in den Muskel oder das Unterhautfettgewebe ist die direkte Aktivierung des dort lokalisierten Immunsystems und die Auswanderung der APC in umliegendes Lymphgewebe. Trotz der recht leichten Anwendung mittels Spritzen besitzt das System erhebliche Nachteile. Aufgrund der unterschiedlichen Tiefe des Applikationsortes werden unterschiedlich lange Nadeln benötigt. Nur medizinisch geschultes und trainiertes Personal kann somit passend entscheiden und applizieren. Während bzw. nach der Anwendung besteht ein erhebliches Risiko einer Verletzung und einer Ansteckung mit übertragbaren Krankheiten bei der Entsorgung oder dem *Recapping* der verwendeten Nadeln. *Prüss-Ustün et al.* (27) schätzte die Zahl der Verletzungen auf ca. 35,7 Millionen weltweit pro Jahr und *Hofmann et al.* (28) postulierte die Zahl der Stichverletzungen in Deutschland auf 500.000 jährlich, wobei in beiden Studien die immense Dunkelziffer hervorgehoben wurden. Die Wiederverwendung benutzten Equipments datierte die WHO zur Jahrtausendwende mit knapp 7 Milliarden Injektionen (29). Abgesehen vom physischen Verletzungsrisiko mit eventueller Krankheitsübertragung unterliegen die Flüssigimpfstoffe meist einer Kühlkettenpflicht, die den Transport und die Lagerung erheblich kostenintensiviert. Des Weiteren sind Injektabilia nicht für Massenimpfungen geeignet, da meist eine Einheit für einen Patienten angewendet werden muss. Aufgrund der verschiedenen eingesetzten Materialien (Glas, Metall, Gummi) ist die Produktion kostenintensiv und es ist mit einem hohen Interaktionspotenzial zwischen Medizinprodukt und Arzneizubereitung zu rechnen. Nicht zu vergessen ist auch die hohe Anzahl von Nadel-Phobien, die die Patienten unter sehr hohen Stress vor und während der Anwendung setzen und unter Umständen die Compliance deutlich verringern.

Alternativen zur klassischen Spritze und dennoch invasive Anwendungen, sind neuartige Entwicklungen in Bezug auf Pulverinjektoren, die nadelfrei arbeiten. Hierbei werden pulverige Impfstoffe in die Hautschichten durch Luftdruck geschossen, wobei die Tiefe der Deposition nur schwer beeinflussbar ist. Ob diese neue Therapie in Bezug auf Administrationsschmerzen besser akzeptiert wird, bleibt vorerst aufgrund der fehlenden Datenlage offen.

Dermale Zubereitungen

Eine sehr gute und verträgliche Alternative zur parenteralen Anwendung kann hier das Immunsystem der Haut darstellen. Wie bereits erwähnt, enthält diese eine Vielzahl an Immunzellen, die mengenmäßig dem subkutanen oder muskulären Gewebe überlegen sind. Somit kann bei gleicher Menge Antigen eine stärkere Immunantwort ausgelöst werden. Den größten Nachteil der Haut stellt das *Stratum corneum* dar. Um diese Schicht überwinden zu können beschreibt die Literatur intradermale und transdermale Applikationen.

Intradermale Anwendungen sind bspw. bekannt durch dermatologische Allergietests. Der Anwender gibt hierbei Testallergene auf die Haut und durchsticht folgend die Epidermis. Das Ergebnis zeigt sich rasch über Quaddel-Bildung oder eine entsprechend ausbleibende Reaktion. Vorteile dieser Technik sind starke und schnelle immunologische Reaktionen sowie eine schnelle Resorption des Wirkstoffs. Letzteres wurde durch *Rini et al.* an Diabetikern gegenüber subkutaner Injektion nachgewiesen (30). Als Beispiel im Sinne der Vakzinierung ist der intradermal zu injizierende Influenzaimpfstoff INTANZA® zu nennen, der eine europäische Zulassung besaß.

Die transdermalen Systeme sind etwas vielseitiger in ihren Applikationstechniken gegenüber den intradermalen Systemen. Dies stellt zugleich Nachteil und Chance dar, bestehen doch noch keine einheitlichen und etablierten Verfahren im noch jungen Forschungs- und Entwicklungsgebiet der transdermalen Immunisierung. Neben passiven Systemen, die bspw. über Okklusionseffekte die Penetration des Stratum corneums erhöhen, stellen Iontophorese (Transport mithilfe eines elektrischen Felds) und Sonophorese (Ultraschallbehandlung) mögliche Strategien dar (31). Als eine Mischung aus Pflaster und Spritze können Mikronadel-Zubereitungen durch die obersten Hautschichten den Wirkstoff in definierte Tiefen einbringen. Hierbei können die pflasterartigen Mikronadeln bioabbaubar oder beständig sein und den adhärierten Wirkstoff in gelöster oder ungelöster Form einbringen. *Sullivan et al.* (32) konnte mit Hilfe eines biologisch abbaubaren Systems eine Überlegenheit gegenüber intramuskulärer Verabreichung nachweisen. *Bramson et al.* (33) entwickelte ein nadelfreies Elektroporationspflaster, das die Zubereitung durch 120 Poren mit einem Durchmesser von je 100 µm durch die Haut befördert. Weitere Techniken stellen die halbfesten Zubereitungen Cremes und Salben dar, die entweder mithilfe von Nadelrollern leichter die Haut penetrieren oder spezielle Adjuvantien enthalten, die eine Permeation ohne Verletzung der Haut ermöglichen. Die Wirkstoffe liegen hierbei vesikulär in gelöster Form oder als sub-Mikrometer-Partikel vor.

Die Vorteile solch transdermalen Systeme liegen wiederum in einer einfachen und weitestgehend vom Patienten in Eigenregie durchführbaren Therapie; sie spart somit Zeit und speziell geschultes Personal ein. Des Weiteren stellen Cremes und Salben kein Verletzungsrisiko während oder nach der Anwendung dar, besitzen eine vergleichsweise günstige Primärverpackung, die leicht zu inertisieren ist und ermöglichen die Vakzinierung von Großkollektiven aus nur einem Gebinde. Halbfeste Zubereitungen sind in der Bevölkerung breitflächig bekannt, akzeptiert und besitzen deshalb eine gute Compliance.

1.1.4 Toll-Like-Rezeptor (TLR)

In Säugetieren wurden mindestens zehn verschiedene Toll-Like-Rezeptoren gefunden, die jeweils eine bestimmte Funktion in der Signalweitergabe der angeborenen Immunität besitzen (Tabelle 1). Sie werden nach ihrer Ligandenspezifität und der notwendigen Anwesenheit bestimmter akzessorischer Proteine (Co-Rezeptoren) unterschieden. Die TLR erkennen PAMPs (Pathogen Associated Molecular Pattern), d.h. Musterstrukturen auf Pathogenen. Kommt es durch Kontakt eines Pathogens zur Aktivierung eines TLRs, führt dies zur Induktion verschiedenster Gene, deren Produkte (antibakterielle Proteine, inflammatorische Zytokine, Chemokine, Adhäsionsmoleküle, NO-Synthase) essentiell für die angeborene Immunantwort sind, aber auch die erworbene Antwort (MHC-Moleküle, Interleukine) beeinflussen können.

Tabelle 1 Übersicht der ersten 10 TL-Rezeptoren

Darstellung mit Zell exprimierung und natürlichen Agonisten (PAMPs). Eine Vielzahl von synthetischen Antagonisten befindet sich in der präklinischen Phase. LPS Lipopolysaccharid; RSV respiratory syncytical virus; LBP Lipopolysaccharidbindendes Protein, CpG Dinukleotid aus Cytosin und Guanodin, GU Dinukleotid aus Guanodin und Uridin (34; 6)

Rezeptor	PAMPs	Exprimierung
TLR-2 in Kombination mit TLR-1 oder TLR-6	Peptidoglykane (Gram +), Lipoproteine (Gram -), Lipoarabinomannane (Mykobakterien), Zymosan (Hefen)	Extrazellulär auf APC, B-Lymphozyten, Mastzellen und Endothelzellen. TLR-1 und TLR-6 sind konstitutiv auf vielen Zellen vorhanden.
TLR-3	Virale Doppelstrang-RNS	Intrazellulär in Dendritische Zellen, weniger in B-Lymphozyten.
TLR-4	LPS (Gram -), RSV-F-Protein	Extrazellulär auf APC verankert. Die lösliche Form kann im Plasma als Lipopolysaccharid-Rezeptorkomplex vorliegen.
TLR-5	Flagellin	Extrazellulär auf APCs der basolateralen Seite der Darmschleimhaut.
TLR-7	Bakterielle und virale Einzelstrang-RNS	Intrazellulär in APCs der Haut
TLR-8	Bakterielle und virale Einzelstrang-RNS mit GU-reichen Sequenzen	Intrazellulär in APCs und Mastzellen
TLR 9	Unmethylierte CpG-DNS	Intrazellulär in APCs und B-Lymphozyten. Bakterielle CpG-Einheiten liegen im Gegensatz zur humanen DNS unmethyliert vor.
TLR 10	Triacylierte Lipopeptide	Extrazellulär auf APCs der Darmschleimhaut, B-Zellen

Schlüsselmolekül dieser Kaskade ist Nf- κ B. Durch Phosphorylierung des inhibitorischen I κ B's und Freisetzung, sowie Translokation des Dimers in einem Zellkern wird die Transkription proinflammatorischer und immunmodulatorischer Gene gesteigert (Abbildung 6). Die so gebildeten Effektoren der angeborenen Immunität (Zytokine, Chemokine, Zelladhäsionsmoleküle) vermitteln wesentliche Effektormechanismen, die sich als akute lokale Entzündungsreaktion äußern (6). Während PAMPs die biologischen Agonisten der Toll-Like-Rezeptoren darstellen, existieren erst wenige zugelassene synthetische Agonisten (z.B. Imiquimod, das Bakterium Clamette-Guérin und Monophosphoryl-Lipid A) (35) und noch weniger Antagonisten (z.B. Eritoran) (36). Die meisten Substanzen befinden sich aber in präklinischer Entwicklung oder in klinischen Studienphasen.

TLR auf und in dendritischen Zellen bewirken, wie beschrieben, nach Pathogenerkennung eine Reifung von APCs, die zu einer erhöhten Expression von Co-stimulierenden Molekülen führt. Diese Co-Stimulatoren müssen auf den Oberflächen der antigenpräsentierenden Zellen vorhanden sein, um in Kombination mit dem MHC-Komplex, T-Zellen zu aktivieren und eine adaptive Immunantwort auszulösen.

Über diesen Mechanismus ist das angeborene System in der Lage, die Induktion geeigneter adaptiver Immunantworten zu unterstützen und zu steuern. Der Einsatz von Antigen-Impf-Adjuvantien wird genutzt, um über den TLR-Signalweg die spezifische adaptive Immunantwort zu steigern.

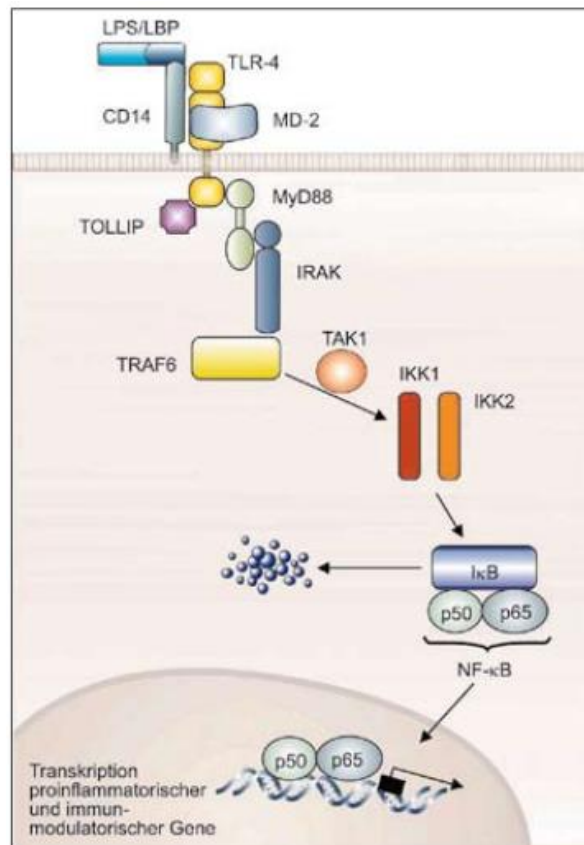


Abbildung 6 Signaltransduktionswege der Toll-like Rezeptoren
 Beispielhafte Darstellung von TLR4. Die Bindung der spezifischen PAMPS am TLR führt über diverse Kinase-Aktivitäten zu einer Phosphorylierung des inhibitorischen IκB und damit zur Freisetzung von NFκB. Dieses wandert in den Zellkern und induziert die Transkribierung von proinflammatorischen und immunmodulatorischer Gene (6).

Imiquimod ist beispielsweise ein spezifischer TLR7 Agonist. Generell löst TLR7 die Entzündungsreaktion durch Erkennung von Einzelstrang-RNS aus. Diese ist vor allem in Viren (bspw. HIV, HCV) zu finden. Des Weiteren spricht man TLRs eine wichtige Rolle bei Autoimmunkrankheiten und chronisch rheumatoiden Entzündungsreaktionen wie SLE (Systemic Lupus Erythematosus) zu (37).

1.2 Imiquimod und seine Formulierungen

1.2.1 Wirkstoff Imiquimod

1-isobutyl-1*H*-imidazo[4,5-*c*]-quinolin-4-amin, oder einfach Imiquimod, gehört zu der Familie der Imidazo-Chinolin-Derivate. Der C-14-Körper hat ein Molekulargewicht von 240,31 g/mol und zählt damit zu den *small molecules* (Abbildung 7). Der Feststoff besitzt einen Schmelzpunkt von 292-294 °C und ist nach Definition der Ph.Eur. als schwer wasserlöslich einzustufen (38). Berechnungen zufolge liegt die Wasserlöslichkeit bei ca. 6,25 g/L bei 25 °C. Der Octanol-Wasser-Koeffizient wird mit 2,7 angegeben. Eine analytische Identifikation kann durch verschiedene Methoden erfolgen. Es liegen für Infrarot-, MS- (GC-MS/ MS-MS), HPLC- und Raman-Spektroskopie Erfahrungswerte vor (39).

Der Wirkstoff ist seit 1997 in den USA als Fertigarzneimittel Aldara® zur Behandlung von Feigwarzen (*Condylomata acuminata*) zugelassen. Später folgten die Zulassungserweiterungen für den Einsatz bei superfiziellen Basalzellkarzinomen und aktinischer Keratose. Seit 2015 ist Imiquimod weltweit generisch verfügbar (40).

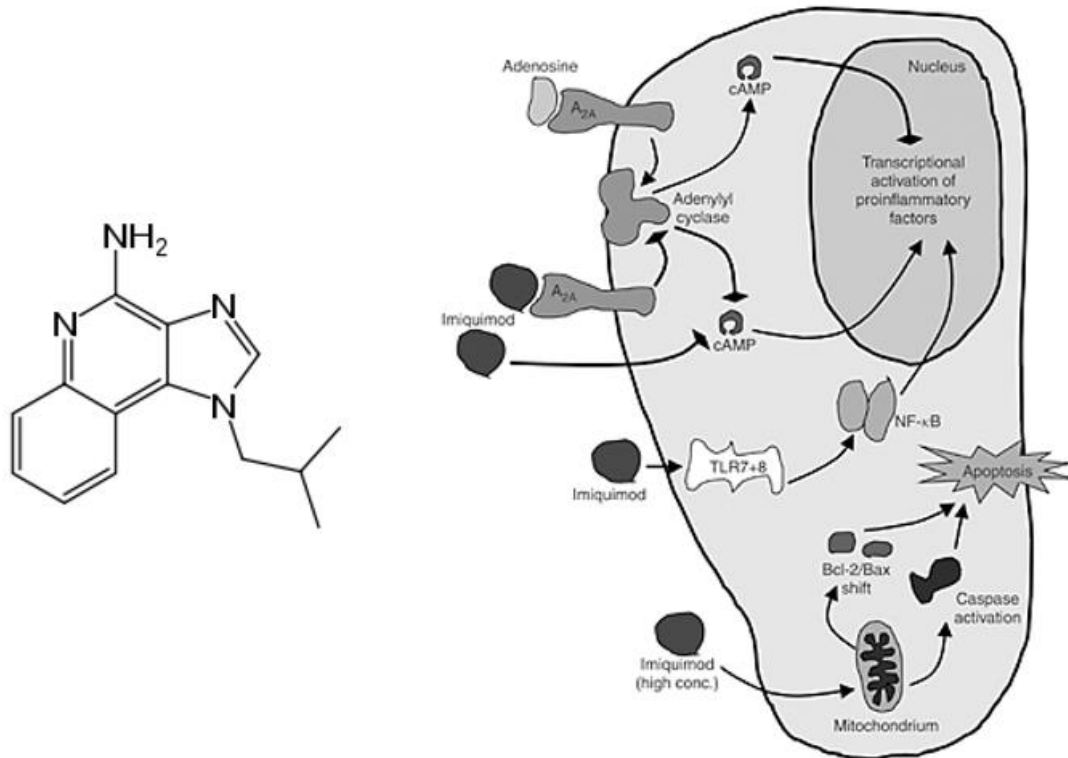


Abbildung 7 Chemische Struktur und Wirkmechanismus von Imiquimod

Das Dreiring-System trägt keine Ladung; der pK_s -Wert wird in der Literatur mit 5,4 angegeben. Dem Imidazo-Chinolin-Analogon wird eine inhibitorische Wirkung auf Cyp450-Enzyme der Subtypen 1A2 und 2D6 vorhergesagt, wobei der Nachweis noch aussteht. Entsprechend der intrazellulären Konzentration werden verschiedene Reaktionskaskaden mit proinflammatorischer oder apoptotischer Wirkung gestartet (137).

Imiquimod besitzt konzentrationsabhängig verschiedene Mechanismen, die in Abbildung 7 dargestellt sind. Bei hohen Wirkstoffkonzentrationen führt der Einfluss von Imiquimod zur Apoptose. Bei mittleren bis niedrigen Spiegeln verläuft der Hauptmechanismus über eine Aktivierung von TLR7-Rezeptoren auf der Oberfläche von Endosomvesikel in Antigen-präsentierenden Zellen. Nach Aktivierung der Tyrosinkinase führt diese zu einer Steigerung der NF- κ B-Konzentration und letztendlich zur Freisetzung von Entzündungsmediatoren (41). Durch Kombination von Imiquimod und spezifischen Antigenen kann die immunmodulierende Wirkung auf spezifische Viren, bakterielle Antigene oder Tumorgewebe gerichtet werden (42; 43). Dermal appliziertes Imiquimod ist sehr gering systemisch verfügbar. Radioaktiv markierter Wirkstoff konnte nach topischer Anwendung mit weniger als 0,9 % seiner Dosis im Urin nachgewiesen werden. Im Serum waren nach topischer Anwendung keine quantifizierbaren Konzentrationen nachweisbar (< 5 ng/ml). Nach oraler Einnahme verteilt sich die Eliminierung über Urin und Fäzes im Verhältnis 3:1 (44; 45).

Als Nebenwirkungen des Wirkstoffs können Juckreiz, Brennen oder Schmerzen am Applikationsort auftreten. Weiterhin werden grippeähnliche Symptome, Myalgien und Kopfschmerzen beschrieben (46).

Aufgrund der minimalen systemischen Resorption sind keine Wechselwirkungen zwischen topisch aufgebrachtem Imiquimod und anderen systemisch applizierten Wirkstoffen (WS) zu erwarten. Belastbare Studien hierzu wurden allerdings noch keine durchgeführt. Organtransplantierten wird eine gleichzeitige Behandlung mit Imiquimod vorsorglich abgeraten (46).

1.2.2 Arzneimittelentwicklung

1.2.2.1 Wissenschaftliche Basis

Die Entwicklung eines Arzneimittels umfasst, angefangen bei der Wirkstoffsuche bis hin zur Marktzulassung, durchschnittlich 13,5 Jahre und kostet das forschende Unternehmen ca. 1,7 Milliarden US-Dollar (47). Die einzelnen Abschnitte dieses Prozesses können grob in Forschung, Präklinik, klinische Phase I, II und III, Zulassungsverfahren und Postklinik unterteilt werden (Abbildung 8). Während die ersten Entwicklungsschritte dem Verständnis der Krankheit und der Suche nach einer geeigneten chemischen Struktur gewidmet werden, kann mit voranschreitender Zeit die Auswahl der Wirkstoffe stark reduziert und erste Formulierungsversuche unternommen werden.

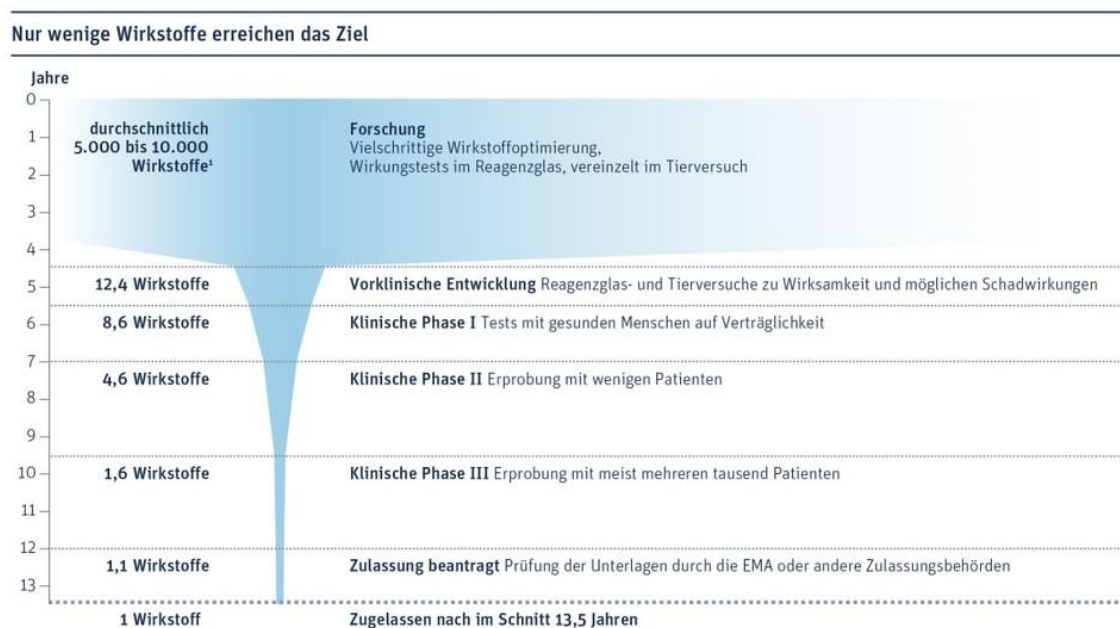


Abbildung 8 Zeitstrahl der Entwicklung eines Wirkstoffs

Nach ca. 13,5 Jahren Forschungsarbeit und einem finanziellen Aufwand von ca. 1,7 Milliarden US Dollar, kann das forschende Unternehmen sein Produkt auf dem Markt vertreiben (48).

Parallel verlaufende Untersuchungen bezüglich chemischer, physikalischer und biologischer Eigenschaften verschaffen einen ersten Überblick über den neuen Wirkstoffkandidaten. Hierzu werden Dossiers zu chemischer und/ oder biologischer Herstellung, Stabilität mit oder ohne Stressfaktoren sowie toxikologische Untersuchungen an Zellen und (Klein-)Tieren zusammengetragen, fortlaufend erweitert und überprüft. Steht letzten Endes ein erster Formulierungsversuch aus Wirkstoff und Hilfsstoff(en) zur Verfügung, kann mit positivem Ethikvotum eines Expertengremiums sowie einer Anzeige bei der zuständigen Behörde, der

erste Schritt in die klinische Phase unternommen werden. Aufgrund der vielfältigen Zielsetzungen solcher Studien ist sicherzustellen, ob eine Anzeige des Vorhabens ausreichend oder eine Genehmigung der Behörden einzuholen ist. Hierzu stellt die EMA ein FAQ Papier mit Entscheidungsbaum zur Verfügung, um das Vorhaben und damit die zu benachrichtigenden Behörden zu eruieren (49). Klassischerweise werden vorerst kleine gesunde Kollektive dem neuen Wirkstoff oder der neuen Rezeptur ausgesetzt, um die Metabolisierung, Unbedenklichkeit und Verträglichkeit zu überprüfen (Phase I). Sofern diese Voraussetzungen gegeben sind, wird eine (vor-)finalisierte Formulierung an einem Kollektiv aus erkrankten und gesunden Personen getestet, um die Wirksamkeit zu belegen (Phase II). Es folgt eine noch größer angelegte Studienphase (Phase III), der sich das Zulassungsverfahren angegliedert. Die in dieser Arbeit aufgeführten Arzneiformen befinden sich zum einen im Übergang in die klinische Phase II (ImiGEL) und zum anderen in der präklinischen Phase (ImiSOL), besitzen somit beide keine Zulassung auf einem nationalen oder dem internationalen Markt.

1.2.2.2 Regulatorische Basis

Der Gesetzgeber hat seine Vorstellungen für die Durchführung einer klinischen Studie innerhalb Europas in der GCP-Verordnung (2012) (50), niedergeschrieben. Diese verweist in Bezug auf die Herstellung explizit auf die Arzneimittel- und Wirkstoffherstellungsverordnung (AMWHV, 2018) (51). Die AMWHV wiederum basiert und kreuzverweist auf das Arzneimittelgesetz (AMG) sowie den GMP-Leitfaden, mitsamt Anhängen.

Herstellungserlaubnis (HE)

Kapitel 3 der AMWHV definiert die Voraussetzungen zur Herstellung und Prüfung von Arzneimitteln und Prüfpräparaten. Hierzu gehört ein qualifizierter Personalstamm, der mindestens eine sachkundige Person, die Leitung der Herstellung und die Leitung der Qualitätskontrolle (QK) umfasst. Eine Personalunion der Leitung Herstellung und QK ist dabei ausgeschlossen. Die jeweiligen Aufgabenfelder der drei Positionen werden in §12 AMWHV klar aufgeteilt. Sofern Arzneimittel in den Verkehr gebracht werden, müssen zudem die Positionen Stufenplan- und Informationsbeauftragter besetzt werden (vgl. §63a und §74a AMG). Sowohl Herstellung, als auch Qualitätskontrolle, sind nach schriftlichen Anweisungen durchzuführen und zu dokumentieren. Diese Dokumente sind den Genehmigungsunterlagen hinzuzufügen (vgl. §13 Abs.2 AMWHV). Des Weiteren schreibt die Verordnung vor, eine Qualitätskontrolle der Ausgangsstoffe durchzuführen und entsprechend zu kennzeichnen (Freigabe-Deklaration). Verhaltensweisen einer GMP-konformen Herstellung sind anzuwenden. Die angewandten Verfahren (vgl. §13 Abs.5 AMWHV) sind nach aktuellen Stand der Wissenschaft und Technik zu validieren, wobei der Herstellungsprozess von Prüfpräparaten als Ganzes betrachtet werden kann. Diese Ausnahme wird insoweit im darauffolgenden Satz wieder eingeschränkt, dass kritische Prozessschritte immer zu validieren sind. Unter Umständen kann eine Re-Validierung bestehender Systeme notwendig werden, durch bspw. einen wartungsbedingten Austausch kritischer Bauteile oder der Tatsache, dass die Erstvalidierung sehr lange zurückliegt oder eine Umstellung der Produktzusammensetzung erfolgt ist. Weiterhin fordert die AMWHV eine vollumfängliche Dokumentation der Herstellung und Überprüfung, sowie eine Durchführung und Protokollierung von In-Prozess-Kontrollen (IPC). Hierbei umfasst die Prüfung des Arzneimittels auch die Primär- und ggfls. die Sekundärverpackung, die Kennzeichnung (Label) sowie die gesetzlich vorgeschriebenen

Informationsbeilagen. Auftretende Abweichungen von den vordefinierten Spezifikationen sind gründlich aufzuarbeiten und zu begründen.

Alle hier zitierten Anforderungen müssen von einem Unternehmen mit einer Herstellungserlaubnis (HE, vgl. §13 AMG) erbracht werden, ungeachtet einer bereits erfolgten, beabsichtigten oder nicht beabsichtigten Registrierung oder Zulassung des Arzneimittels. Besitzt die Firma selbst keine HE, ist eine Fertigung im Lohnauftrag möglich (vgl. §9 AMWHV). Hierbei produziert eine Fremdfirma das Arzneimittel nach schriftlichen Anweisungen innerhalb seiner eigenen HE. Der Gesetzgeber fordert in einem solchen Konstrukt einen schriftlichen Verantwortungsabgrenzungsvertrag (VAV) zwischen den Parteien und die Auditverpflichtung des Auftraggebers.

Extemporaneous Compounding

Ist die Fremdfirma eine Apotheke, bedarf es eines VAVs, aber keiner HE (vgl. §13 Abs.2 AMG). Apotheken besitzen hier nach Apothekengesetz einen traditionellen Sonderstatus. §1 des Apothekengesetzes (ApoG) bevollmächtigt die Leitung einer Apotheke mit der „im öffentlichen Interesse gebotenen Sicherstellung einer ordnungsgemäßen Arzneimittelversorgung der Bevölkerung“. Wo heute eine Vielzahl an Fertigarzneimitteln durch die pharmazeutische Industrie zur Verfügung gestellt wird, wurden früher die gängigen Arzneiformen überwiegend vor Ort hergestellt. Die heute im angelsächsischen als „extemporaneous compounded medicines“ (dt. ad-hoc-Herstellung) beschriebene Arzneimittelproduktion spiegelt sich in der deutschen Rezeptur wider. Sie basiert auf einer patientenindividuellen Fertigung aufgrund einer ärztlichen Verschreibung (vgl. §7 ApBetrO). Das AMG erlaubt in §14 Abs.4 hierzu kongruent „die Herstellung von Arzneimitteln zur klinischen Prüfung am Menschen in einer beauftragten Apotheke“ explizit als Ausnahme von §13 AMG. Anzumerken ist, dass öffentliche Apotheken und Krankenhausapotheken bzw. krankenhausversorgende Apotheken in Bezug auf die Ausnahmeregelung gleichzusetzen sind. Als einzige behördliche Voraussetzung sind ausgebildetes Personal und entsprechende Räumlichkeiten inklusive Gerätschaften vorzuhalten. Dabei steigen die GMP-Bedingungen mit dem jeweiligen Arzneimittelrisiko an (52). Eine Übersicht zu einfachen und komplexen Zubereitungen nach Falconer und Steadman gibt Tabelle 2 wieder. Gründe für die Herstellung einer Rezeptur können vielfältig sein, so ist die benötigte Zubereitung nicht kommerziell verfügbar, eine individualisierte Dosierung ist notwendig oder es liegt eine Unverträglichkeit gegenüber einem der Hilfsstoffe des Marktprodukts vor. Den Vorteilen der patientenindividuellen und frischen Herstellung stehen die Nachteile der manuellen Fertigung, die stark verkürzte Verbrauchsfrist (Keimkontamination) und die hohen Herstellungskosten entgegen. Darüber hinaus unterstehen die Produkte nur einer sporadischen Überprüfung der Qualität (Inhalt, Gleichförmigkeit, Stabilität und ggfs. Sterilität) auf freiwilliger Basis. In Deutschland führen die Pharmazierärzte hierzu im Namen der zuständigen Behörde stichprobenartige Kontrollen durch und übersenden diese an die Landesuntersuchungsämter.

Tabelle 2 Beispiele des simple vs. complex extemporaneous compounded medicines

Je komplexer die Herstellung, desto eher verlagert sich die Produktion aus der Apotheke heraus in spezialisierte Industriebetriebe.

Herstellungsart	Erklärung	Beispiele
Einfach	Herstellungspraktiken sind in der Ausbildung (PTA, Apotheker) erlernt worden. Es stehen einschlägige Handbücher zur Verfügung (NRF, Ph.Eur., USP, u.ä.) und Daten zur Plausibilität, Qualität, Stabilität u.ä. sind leicht und seriös recherchierbar. Die Produktion kann in der apothekenüblichen Rezeptur durchgeführt werden.	Topische Zubereitungen wie Cremes, Salben, Öle, Gele. Orale Flüssigzubereitungen wie Lösungen, Emulsionen, Suspensionen, Tinkturen. Orale feste Zubereitungen wie Pulver, Kapseln, Tabletten. Suppositorien
Komplex	Das Personal benötigt Weiterbildungen zur spezifischen Herstellungsart. Spezielle Einrichtungen sind erforderlich (Reinraum mit Druckgefälle, LAF-Isolator, Sterilisation, Gefriertrocknung, u.ä.).	Parenterale Zubereitungen, Zytostatika, Ophthalmologika, Hochpotente Wirkstoff-Zub., Zub. mit veränderter Wirkstofffreisetzung.

Compassionate use

Als zweite Möglichkeit nicht zugelassene Produkte zur klinischen Studie zu verwenden, hat die Europäische Kommission den „*Compassionate use*“ oder auch „*Bench-to-Bedside*“-*approach* in ihrer Verordnung (EG) Nr. 726/2004 (2004) (53) niedergeschrieben. Artikel 83 entbindet hierbei unter gewissen Bedingungen die Hersteller von der unter Artikel 3 beschriebenen Zulassungspflicht (vgl. VO 726/2004 Artikel 3 (1) und (2)). Somit kann ein Arzneimittel „aus humanen Erwägungen einer Gruppe von Patienten zur Verfügung gestellt werden, die an einer zu Invalidität führenden chronischen oder schweren Krankheit leiden oder deren Krankheit als lebensbedrohend gilt und die mit einem genehmigten Arzneimittel nicht zufriedenstellend behandelt werden können. Das betreffende Arzneimittel muss entweder Gegenstand eines Antrags auf Erteilung einer Genehmigung für das Inverkehrbringen nach Artikel 6 dieser Verordnung oder Gegenstand einer noch nicht abgeschlossenen klinischen Prüfung sein. Sowohl der Hersteller als auch der Antragsteller werden durch dieses Verfahren nicht aus ihrer zivilrechtlichen Haftung oder ihrer strafrechtlichen Verantwortung entlassen. Darüber hinaus muss der Antragsteller sicherstellen, dass den beteiligten Patienten das neue Arzneimittel auch in der Zeit zwischen Genehmigung und Inverkehrbringen zur Verfügung gestellt wird (vgl. VO 726/2004 Artikel 83 (7) und (8)). Die Kommission reglementierte dabei den Einsatz der Arzneimittel auf folgende Indikationsgebiete (vgl. VO 726/2004 Anhang 3): erworbenes Immundefizienz-Syndrom, Krebs, neurodegenerative Erkrankungen, Diabetes, Autoimmunerkrankungen und andere Immunschwächen sowie Viruserkrankungen. Die Liste kann auf Antrag und Mehrheitsbeschluss durch die Kommission erweitert werden.

Sonderfälle

Der Vollständigkeit halber sollen noch zwei weitere Sonderfälle erwähnt werden, die in der Gesetzgebung benannt wurden und durchaus zur täglichen Praxis genutzt werden.

Der erste Spezialfall stellt die Befreiung der Ärzteschaft von einer HE laut §13 Abs.2b AMG dar, „sofern die Arzneimittel unter ihrer unmittelbaren fachlichen Verantwortung zum Zwecke der persönlichen Anwendung bei einem bestimmten Patienten hergestellt werden“. Als Positiv-

Beispiel sei die personalisierte Herstellung von Radiopharmaka zur Behandlung von Schilddrüsenkarzinomen genannt, die autark durch medizinisches Personal durchgeführt wird. Im Gesetzestext allerdings explizit ausgeschlossen ist die Herstellung von Arzneimitteln „die zur klinischen Prüfung bestimmt sind, soweit es sich nicht nur um eine Rekonstitution handelt.“ Somit ist diese Sondererlaubnis für ein klinisches Experiment mit mehreren Probanden nicht einsetzbar.

Die zweite, auf einzelne Personen anzuwendende Regelung, stellt eine Variante des *compassionate use* dar. Während dieser für Probandenzahlen ab 2 genutzt werden darf, gilt der *Heilversuch* oder *named patient use* nur für Einzelpersonen. Die Deklaration von Helsinki (54) sieht in ihrem Artikel 37 „die Behandlung eines einzelnen Patienten, für den es keine nachgewiesenen Maßnahmen gibt oder andere bekannte Maßnahmen unwirksam waren, vor, dass der Arzt [...] eine nicht nachgewiesene Maßnahme anwendet, wenn sie nach dem Urteil des Arztes hoffen lässt, das Leben zu retten, die Gesundheit wiederherzustellen oder Leiden zu lindern“. Dabei kann der Arzt innerhalb seiner ihm gerade zugesprochenen Therapiefreiheit den Patienten nicht willkürlich behandeln, sondern muss eine plausible kausale Begründung für sein Handeln dokumentieren. Des Weiteren trägt der behandelnde Arzt persönlich die volle Verantwortung und ist angehalten seine Ergebnisse zu kommunizieren und wissenschaftlich aufzuarbeiten. Heilversuche sind in Deutschland nicht gesetzlich geregelt, während Österreich (55) klare Richtlinien in seinem Arzneimittelgesetz (§ 8 Abs.1 Z 2) regelt. Eine gute Zusammenfassung des Ausnahmefalls stellt der Verband Forschender Arzneimittelhersteller e.V. (56) auf seiner Homepage zur Verfügung. Sowohl der *compassionate-use* als auch der *named-patient-use* stellen keine Varianten des *off-Label-use* dar, weil die dort angewendeten Arzneimittel bereits registriert oder zugelassen sind.

1.2.3 Halbfeste Formulierungen

Die Verwendung von Dermatika hat eine lange Historie. Erstmalige schriftliche Erwähnung von halbfesten Systemen als Heilmittel lassen sich auf die Zeit um 1600 v.Chr. auf Papyrus datieren. Die Verwendung von tierischen Fetten, pflanzlichen Ölen oder Bienenwachs fand im Altertum vor allem als Kosmetikum und Körperpflegemittel aber auch in rituellen Zeremonien („Salbung“) großen Anklang (8). Auch heute noch stellen Dermatika einen wichtigen Faktor in der rezepturbasierten Herstellung der Apotheken dar.

Die Vorteile gegenüber anderen Darreichungsformen liegen mitunter in der einfachen Anwendung begründet, die es Patienten ermöglicht eine Behandlung in Eigenregie, ohne medizinisches Fachpersonal, durchzuführen. Die Therapie kann bei auftretenden Nebenwirkungen relativ schnell durch Abwaschen oder Abtragen der Formulierung ab- oder unterbrochen werden. Darüber hinaus wird die Magen-Darm-Passage umgangen und nadelbedingte Verletzungen vermieden. Nachteile der halbfesten Arzneiform sind die teilweise komplexen Zusammensetzungen der Zubereitungen aus Grundlage, Wirkstoff, Wasseranteil, Konservierungsmittel, Emulgatoren, Stabilisatoren, Penetrationsbeschleuniger etc. deren Interaktionspotential das Geschick des Galenikers fordert. Weiterhin ist eine großflächige Behandlung meist nicht empfehlenswert, da systemische Nebenwirkungen auftreten können.

Das europäische Arzneibuch definiert *praeparationes molles ad usum dermicum* als halb feste Zubereitungen zur kutanen Anwendung, die zur lokalen oder transdermalen Wirkstofffreisetzung bestimmt sind. Unterteilt werden sie in Salben (einphasige Systeme), Cremes (mehrphasige Systeme), Gele, Pasten, Umschlagpasten, wirkstoffhaltige Pflaster und kutane Pflaster. Einzelne oder mehrere Wirkstoffe liegen gelöst oder dispergiert in einer natürlichen oder synthetischen Grundlage vor. Dabei kann die Grundlage erheblichen Einfluss auf die Wirkung der Zubereitung haben (38). Als Applikationsort werden gesunde, erkrankte oder geschädigte Haut und Schleimhäute genannt, auf denen in den meisten Fällen eine lokal begrenzte oberflächliche Behandlung angestrebt wird. Nur in bestimmten Fällen (bspw. Hormontherapie) können auch tiefere Hautschichten gezielt adressiert werden. Eine weiterführende Unterteilung der Systeme Salben, Cremes und Gele erfolgt nach ihrer Hydro- bzw. Lipophilie, die anhand der Einarbeitungsmöglichkeit und Bindung von Wasser festgelegt wird.

Die zwei hier vorgestellten Formulierungen stellen mehrphasige Systeme dar und fallen somit unter die Kategorie der Cremes. Die genauen Zusammensetzungen der Formulierungen sind Tabelle 3 zu entnehmen. Die Produktion der klinischen Prüfmuster wurde am Institut der Pharmazie in Mainz unter einer Herstellungserlaubnis GMP-konform in einem Reinraum der Klasse D durchgeführt.

ImiGEL basiert auf einer hydrophoben Salbengrundlage aus Jojobaöl, welches aus den Samen des *Simmondsia chinensis* gewonnen wird und ein natürliches Wachs darstellt. Hauptbestandteile des Jojobaöls sind langkettige, ungesättigte Fettsäuren, die teilweise auch als Triglyceride vorliegen. Setzt man dieser lipophilen Absorptionsbase einen Öl-in-Wasser-Emulgator (Tween 80) zu, so kann sie ähnlich hohe Anteile an Wasser aufnehmen wie die Ölphase. Jojobaöl zeigt eine gute Spreitung auf der Haut und wird vielfach als Kosmetikum eingesetzt. Durch seine weiteren Inhaltsstoffe (Tabelle 36) besitzt die Grundlage antibiotische Wirkung und führt zu einer beschleunigenden Abheilung verletzter Haut. Durch Hochdruckhomogenisation wird eine Emulsion, bestehend aus der wässrigen Wirkstoffsuspension und dem Jojobaöl, erhalten. Um die Viskosität der bisher flüssigen Arzneiform zu erhöhen, wird diese in ein Carbomer-Gelgerüst eingearbeitet. Es entsteht ein plastisch verformbares weißes Mehrphasensystem, das leicht dosiert und auf der Haut verstrichen werden kann.

In ImiSOL wird das stark lipophile Squalen verarbeitet und mit Tocopherol vor oxidativem Abbau geschützt. Der O/W-Emulgator Sucrose 1670 wird als eine Zucker-Fettsäure-Kombination aus Saccharose und Monostearinsäure verwendet. Squalen besitzt die Fähigkeit eine signifikant stärkere Immunreaktion in der Haut hervorzurufen, als eine Vielzahl verwendeter lipophiler Grundlagen (57). Wie bei ImiGEL wird auch hier die wässrige Suspension mit der Ölkomponente unter hohen Drücken homogenisiert. Nach Erhalt der Suspensionsemulsion schließt sich ein Gefriertrocknungsschritt an, der der Zubereitung das Wasser weitestgehend entzieht. Nach dieser Kalttrocknung bildet das Produkt feste bröcklige Agglomerate (Abbildung 9), die sich durch leichten Scherstress wieder verflüssigen (Abbildung 10).



Abbildung 9 Festes bröckliges Produkt ImiSOL nach Gefriertrocknung



Abbildung 10 Verflüssigung der plastischen Zubereitung durch leichten Scherstress

Beide Formulierungen wurden mit dem primären Ziel der transkutanen Immunisierung entwickelt. Wie in den oberen Kapiteln besprochen, können zwei Ansatzpunkte zur Überwindung der Hautbarriere genutzt werden. Zum einen stellt die gewählte Grundlage und hierin die lipophile Phase eine wichtige Komponente dar. *Gogoll* (57) konnte durch Vergleichsstudien nachweisen, dass Jojobaöl und respektive Squalen/ Tocopherol die bevorzugten Grundlagen für die jeweilige Formulierung darstellten. Zum anderen entscheidet die Partikelgröße des Wirkstoffes über die Eindringtiefe und damit die Aktivierung des kutanen Immunsystems (12; 58). Durch die auf Submikrometergröße gemahlene Partikel und die Eigenschaften der Grundlage, kann der Wirkstoff tief genug in die Hautschichten eindringen, ohne nennenswerte systemische Resorption zu bewirken, wodurch Nebenwirkungen vermieden werden. Dabei bilden die Partikel ein Depot, aus dem der Wirkstoff langsam durch Auflösen in die Zellen aufgenommen werden kann und hier eine langfristige Aktivierung der Immunzellen hervorruft. *Lopez et al.* (42) konnte in einem transkutanen Impfxperiment mit Influenza-Viren eine B-Zellen Antwort mit nachweisbaren Titern über 35 Tage nachweisen.

Tabelle 3 Zusammensetzung der beiden Imiquimod-Rezepturen ImiGEL und ImiSOL

Die Zubereitungen bestehen aus einer Wasser- und einer Lipidphase und fallen demnach in die Kategorie Creme als zweiphasige Systeme. Während ImiSOL das Wasser wieder entzogen wird, ist eine Konservierung des ImiGELs unumgänglich.

Formulierung	Qualitative Komponente	Quantitative Komponente [auf 100 g, g]	Funktion
ImiGEL	Imiquimod	5,00	Wirkstoff
	Konserviertes Wasser	40,36	Wässrige Phase mit Methyl- (0,03 g) und Propylparaben (0,01 g) konserviert
	Polysorbat 80	5,00	O/ W-Emulgator
	Carbomer	1,33	Gelbasis
	Natronlauge (5 N-Lösung)	3,33	Neutralisierung des Gels
	Jojobaöl	44,98	Lipidphase
ImiSOL	Imiquimod	1,25	Wirkstoff
	Sucrose-Ester 1670	5,00	O/ W-Emulgator
	Wasser	75,00	Wässrige Phase, wird durch spätere Trocknung entfernt
	Squalen	11,25	Lipidphase
	Tocopherol	7,50	Antioxidans

Um die bis dahin erzielten Erfolge international eingruppiert zu können, wurden bereits zugelassene Produkte auf Wirkstoffform und Arzneimittelformulierung untersucht. Mehrere asiatische Produkte bieten suspendierte Imiquimod-Partikel von rund-rhombischen bis nadelförmigen Kristallen an, die in verschiedenen Grundlagen eingebettet sind. Die als Goldstandard verwendete Lotion Aldara® hingegen, beinhaltet den Wirkstoff in gelöster Form. Gogoll und Lopez stellten eine Überlegenheit des amerikanischen gegenüber den fernöstlichen Produkten in Bezug auf die IFN- γ -Produktion in Mäusen fest (59; 57). Neben immunologischen und partikelbezogenen Untersuchungen wurden Viskositätsmessungen durchgeführt. Die in dieser Arbeit verwendeten neu entwickelten Suspensionen zeigen ein sphärisches Kristallmuster im Bereich von 400 nm bzw. 600 nm jeweils \pm 200 nm. In Franz-Zell-Versuchen mit exzidiert muriner Haut konnte nachgewiesen werden, dass Aldara® aufgrund seines gelösten Wirkstoffes die höchsten Permeationsraten erzielte (60). Die in derselben Arbeit untersuchten lipophilen Komponenten Jojobaöl und Squalen/ Tocopherol zeigten ein sehr langsames Penetrationsvermögen (ImiGEL) respektive ein mittleres, der Zubereitung Aldara®-ähnliches Verhalten (ImiSOL). Erst in den Immunisierungsversuchen konnte nachgewiesen werden, dass ImiGEL bezüglich Aldara gleichwertig und ImiSOL signifikant dem vermarkteten Standard gegenüber überlegen war (60).

1.3 Grundlagen der Arbeitstechniken

1.3.1 Maschinelle Herstellung

In diesem Kapitel sollen die grundlegenden chemischen und physikalischen Prinzipien entlang des Herstellungsprozesses beider halbfester Formulierungen dargestellt werden. Die jeweiligen Verfahren der Arzneiformulierungen ähneln sich hierbei stark bis zum abschließenden Herstellungsschritt. Grundlegend kann die Herstellung in Wägung, Vermahlung und Hochdruckhomogenisation unterteilt werden. Für ImiGEL schließt sich eine Einarbeitung in ein Carbomergel an, währenddessen ImiSOL gefriergetrocknet wird.

1.3.1.1 Vermahlung

Das Zerkleinern von Stoffen und Materialien ist ein uraltes physikalisches Grundprinzip. Es beruht auf Druck-, Schlag-, Prall-, Reibungs- und Scherkräften (8). Die Härte bzw. Elastizität des Mahlgutes bestimmt hierbei die effektivste Methode und das zu verwendende Mahlwerkzeug. Unter Einwirkung von Kraft verformt sich das Material erst elastisch bzw. plastisch, bis es beim Überschreiten einer gewissen Krafteinwirkung zum Bruch kommt. Dabei gilt: je größer das Mahlgut, desto mehr potentielle Bruchstellen liegen vor und desto mehr Energieeintrag ist notwendig je kleiner das Korn wird. Die aufzuwendende Energie wird hierbei teilweise als Oberflächenenergie in den neu gebildeten Oberflächen gespeichert, aber hauptsächlich als Wärme freigesetzt. Aufgrund dieser teilweisen starken Hitzebelastung, die das Mahlgut negativ beeinflussen kann (Modifikationsbildung, Zersetzung, Agglomerationsneigung, u.ä.), werden neben der Trockenmahlung auch Kalt- und Nassmahlungen durchgeführt. Eine Übersicht der Zerkleinerungsmaschinen und die zu erreichenden Feinheitsgrade können Abbildung 11 entnommen werden. Um unvermeidlichen Abrieb der Mahlwerkzeuge zu minimieren, sollte deren Mohs'scher Härtegrad mindestens um ein Grad höher liegen als der des Mahlguts.

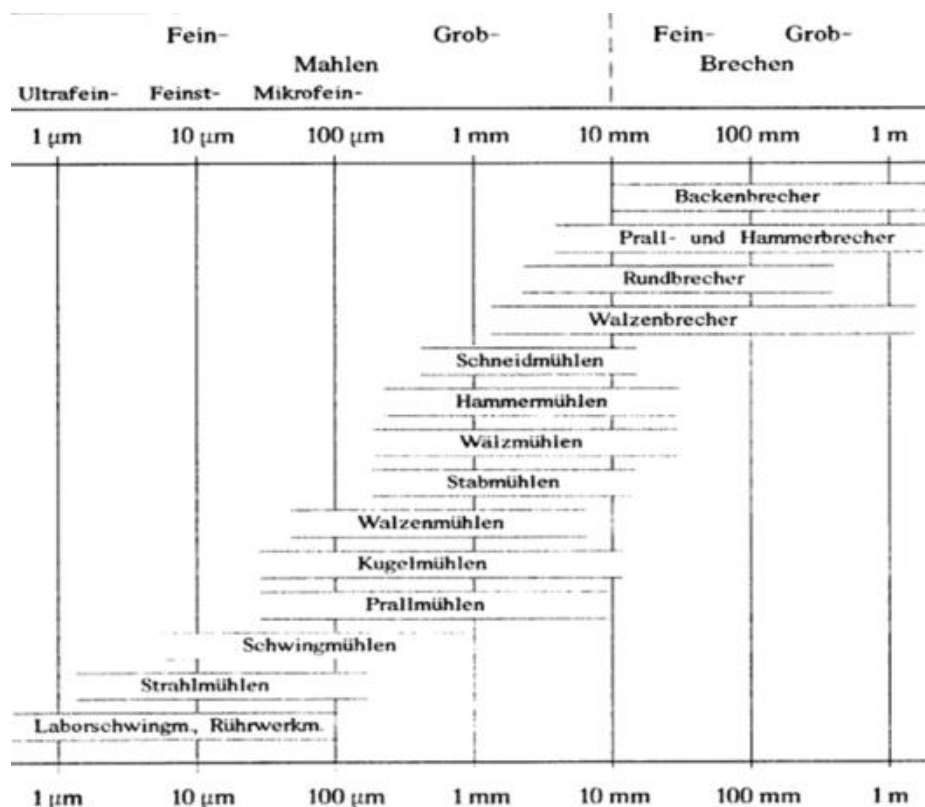


Abbildung 11 Leistungsfähigkeit von Zerkleinerungsmaschinen

Die Angaben verstehen sich als Richtwerte, da das Ergebnis stark von Material, Mühlentyp, Mahldauer und Vermahlungsart abhängt (61). So vermag die in dieser Arbeit verwendete Planeten-Kugelmühle ein Produktkorn zu generieren, dass im mittleren Nanometerbereich liegt.

Das Ausmaß der Zerkleinerung kann mathematisch anhand des Zerkleinerungsgrads (vgl. Gl. 1) definiert werden, wobei d_0 den Durchmesser des Partikels vor der Mahlung und d_1 den Durchmesser nach der Vermahlung darstellt.

$$Z = \frac{d_0}{d_1} \quad \text{Gl. 1 (1)}$$

In dieser Arbeit wurde eine Planeten-Kugelmühle zur Nassmahlung eingesetzt. Hierzu wurde der kristalline Wirkstoff in einer Tween-Wasser-Mischung suspendiert und mit 1 mm Zirkoniumoxid-Kugeln versetzt. Wasser stellt für Imiquimod ein Nicht-Lösungsmittel dar, ist stark polar und besitzt in Mischung mit Tween 80 diverse Vorteile im Zerkleinerungsprozess. So können Adsorptions- und Agglomerationskräfte durch die neu gebildeten Oberflächen verringert werden (8). Die Wärmebelastung wird reduziert und die erreichbare Korngröße kann durch effektivere Kraftübertragung verkleinert werden.

Friedrich Mohs, ein deutsch-österreichischer Mineraloge im 18. Jahrhundert, klassifizierte verschiedene Mineralien aufgrund ihrer Härte durch gegenseitiges Ritzen. Die so aufgestellte Skala gibt noch heute einen Überblick über die Verwendbarkeit bestimmter Materialien als Nutzwerte gegenüber dem zu bearbeitenden Material. Zirkonoxid wird hierzu in der Literatur als sehr hartes Material mit einer Mohshärte von 7-9 (zum Vergleich Diamant: 10) mit einer hohen Abriebfestigkeit beschrieben (62; 61; 63). Das Mineral ist weder magnetisch, noch giftig, es ist wasserunlöslich und gegen die meisten Säuren und Laugen beständig. In der Zahnmedizin wird es aufgrund seiner hohen Festigkeit und Bruchzähigkeit bei guter Bioverträglichkeit zur Herstellung von Zahnimplantaten verwendet (45).

Kugelmühlen arbeiten nach den Prinzipien Reibung, Druck und Schlag. Die Planetenkugelmühle stellt gegenüber regulären Kugelmühlen und -schleppen einen Sonderfall dar, weil die Rotation nicht horizontal, sondern vertikal verläuft. Entsprechend Abbildung 12 rotieren dabei sowohl das Probengefäß (hier um die eigene Achse gegen den Uhrzeiger) als auch der Probenauftragsteller („Planetary Disk“, mit dem Uhrzeiger). Die jeweils gegenläufigen Zentrifugalkräfte, in Kombination mit der Corioliskraft, ergeben eine Kugelbewegung entlang der Becherinnenwand mit abruptem Seitenwechsel diagonal des Bechers und eine starke Beanspruchung bzw. sehr gute Zerkleinerung des Mahlguts.

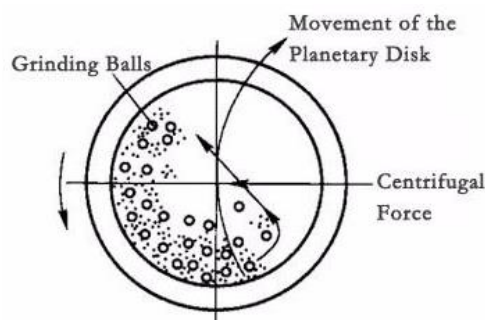


Abbildung 12 Prinzip der Planetenkugelmühle

Während der Probenbecher nach links um die eigene Achse dreht, bewegt sich der Probenteller („Planetary Disk“) in die entgegengesetzte Richtung. Durch diese Bewegung werden die Kugeln über die Seitenwand mitgenommen, und auf die gegenüberliegende Seite geschleudert. Das Zusammenspiel der beiden Zentrifugalkräfte mit der Corioliskraft bewirkt eine maximale Mahlbeanspruchung (63).

Nach Beendigung der Wirkstoffzerkleinerung durch Nassmahlung wird eine weißliche Suspension mit Partikelgrößen von 400 nm (ImiGEL) bzw. 600 nm (ImiSOL) mit jeweils ± 200 nm erhalten. Die Mahlkugeln werden durch Siebung abgetrennt und das Filtrat einer In-Prozess-Kontrolle (IPC) unterzogen (s. 2.3.2.2. Partikelgrößenmessung). Sofern diese IPC den Spezifikationen entspricht, wird die lipophile Phase anteilsweise der Suspension zugegeben und der Hochdruckhomogenisation zugeführt.

1.3.1.2 Hochdruckhomogenisation

Mischungen zwischen hydrophilen und lipophilen Phasen sind thermodynamisch nicht stabil. Selbst unter Zugabe von Emulgatoren kann es zu Sedimentation, Aufrahmen, Flokkulation, Koaleszenz und schließlich dem Brechen der Emulsion kommen. Die Geschwindigkeit dieser Instabilität kann mit Hilfe des Stoke'schen Gesetzes beschrieben werden (vgl. Gl. 2), mit r = Radius des Partikels, ρ = Dichte der jeweiligen Phase und η = Viskosität des Dispersionsmittels, g = Erdbeschleunigung). Es besagt, dass die Geschwindigkeit v eines Emulsionstropfens minimiert wird, und damit die Zubereitung stabil ist, wenn die Dichten beider Phasen ähnlich, die Partikel der dispergierten Phase sehr klein sind und die Viskosität des Dispersionsmittels sehr hoch ist.

$$v = \frac{2 r^2 (\rho_1 - \rho_2) * g}{9 \eta} \quad \text{Gl. 2 (8)}$$

Als Emulgator wird in beiden Formulierungen Tween 80 verwendet. Die Polysorbate zählen zu den nichtionogenen Öl-in-Wasser-Emulgatoren, die auch in der Lebensmittelindustrie Einsatz finden (64). Des Weiteren dient Tween zur Erniedrigung der Grenzflächenspannung, womit die Energie der neu gebildeten Oberflächenkräfte kompensiert werden kann. Um die lipophile Phase entsprechend fein zu verteilen, gibt es mehrere technische Möglichkeiten. Während die Verwendung von Reibschalen oder Schüttelflaschen grobdisperse Systeme generieren, können durch hochtourige Rührwerke mit Stromstörern hohe Zerkleinerungsgrade erreicht werden. Die feinsten Ergebnisse erzielen Homogenisatoren des Rotor-Stator-Prinzips (Ultra-Turrax®), Kolloidmühlen oder Hochdrucksysteme mit eingebauten Düsen- bzw. dünnen Spaltsystemen (8). Letzteres System wurde für die hier besprochenen Zubereitungen verwendet.

Innerhalb aero- sowie hydrodynamischer Systeme gilt die Bernoulli-Gleichung, welche besagt, dass die Summe aus dynamischem und statischem Druck in durchströmten Systemen konstant bleibt (65). Kongruent zu Abbildung 13 A wird das Gut aus einem Vorratsbereich mit hohem Druck in eine Zwangspassage geleitet. Durch die Verengung der Passage wird die Emulsion stark beschleunigt, der statische Druck nimmt korrespondierend stark ab (vgl. Abbildung 13 B). Fällt der statische Druck unter den Dampfdruck des Dispersionsmittels bilden sich Dampfblasen, es entsteht eine Mischströmung aus gasförmigen und flüssigen Bestandteilen. Die gasförmigen Kavitäten verengen die Passage nochmals, das Gut wird auf über Schallgeschwindigkeit beschleunigt. Es folgt die Komprimierung am Prallring mit plötzlichem Druckanstieg, sodass die Dampfblasen kollabieren und das System sich normalisiert. Die notwendige Energie zum Zerkleinern der festen und flüssigen Partikel entsteht also aus der Bildung und Implosion der Dampfblasen (65). Zusätzlich tragen turbulente Strömungen (Scherkräfte) im Gerät und Kollisionskräfte der Partikel untereinander zur Zerkleinerung bei. Um die neugebildeten feineren Partikel stabil erhalten zu können, sind unter anderem

folgende Faktoren wichtig: zügige Wanderung und Adsorption der Emulgatormoleküle an den jeweils neugebildeten Grenzflächen sowie die Desaggregation von bestehenden Mizellen. Um diese Vorgänge zu unterstützen und Aggregationen direkt wieder aufzulösen, sind häufige Homogenisationszyklen während der Produktion notwendig.

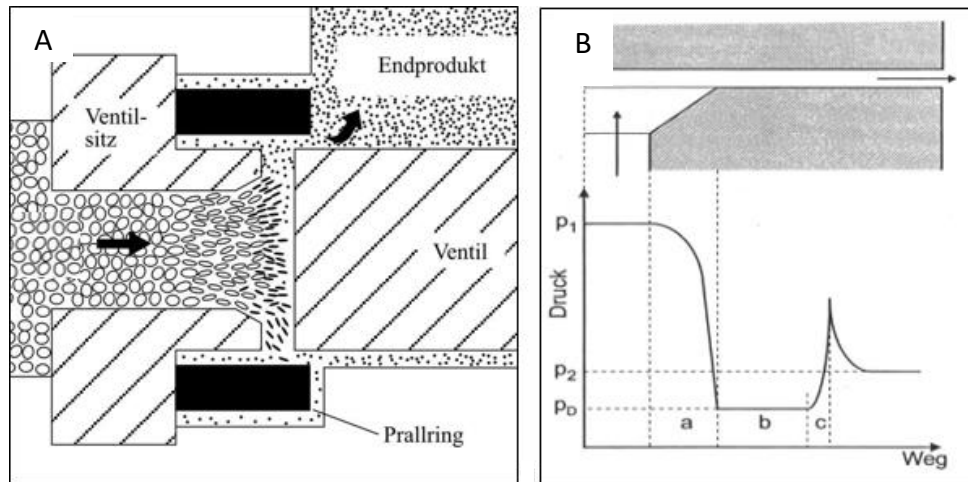


Abbildung 13 Prinzip des Homogenisators nach Lindenstruth (li.) und Schultz (re.)

A Die Ausgangsemulsion wird bei Drücken von bis zu 2000 bar verarbeitet. Hierbei werden sowohl die Kristallpartikel als auch die Emulsions-Tröpfchen zerkleinert und dispergiert, sodass eine stabile Dispersion entsteht (46). B Druckdiagramm bei Passage des durch Ventil und Ventilsitz gebildeten Spalts. Die Bildung und Kollabierung von Luftblasen führen zur Zerteilung der Partikel (66).

Das erhaltene Homogenisat ist gelblichweiß, warm und flüssig. Die Viskosität entspricht einer kosmetischen Lotion oder Bademilch. Zur Herstellung von ImiGEL wird folgend ein Carbomergel hergestellt und prozentual eingearbeitet. Es entsteht eine weiße, plastische Creme, die der Primärverpackung zugeführt werden kann.

Die Produktion von ImiSOL schreibt nach der Homogenisation einen Gefriertrocknungsprozess vor.

1.3.1.3 Gefriertrocknung

Die Trocknung eines Guts stellt das Prinzip des Flüssigkeitsentzugs und damit einer Stabilisierungsmaßnahme der Formulierung dar. Durch den Entzug des, in den meisten Fällen, Wassers wird eine chemische Modifizierung sowie mikrobiologisches Wachstum erschwert. Das Wasser kann hierbei auf verschiedenste Arten aufliegen oder mit dem Gut verbunden sein. Die einzelnen Wasserbindungsarten sind in aufsteigender Trocknungsenergie in Tabelle 4 aufgeführt. Die diversen Trocknungsverfahren bedienen sich der drei Phasenübergänge Verdunsten, Verdampfen und Sublimieren, um das Wasser in flüssiger oder fester Form direkt in den gasförmigen Zustand zu überführen und damit abzutrennen. Dabei werden die physikalischen Prinzipien der Konvektion (warmes überströmendes Medium), der Strahlung (IR-/ Mikrowellenstrahlung) und der Leitung (Kontaktwärme) befolgt. In den genannten Verfahren wird hauptsächlich Hitze oder Strahlung eingesetzt, um die Wassermoleküle in Wasserdampf zu transferieren. Nicht jedes Material verträgt aber eine hohe oder mehrmalige Hitzeeinwirkung, da gesteigerte Temperaturen die Geschwindigkeit chemischer Reaktionen und physikalische Instabilitäten (bspw. Modifikationsbildung) begünstigt (8).

Die zur Produktion von ImiSOL verwendete Gefriertrocknung stellt ein sehr schonendes Verfahren für thermolabile oder hydrolyseempfindliche Produkte dar. Sie wird breitflächig zur Herstellung von Antibiotika, Hormonen, Impfstoffen und kolloidalen (Liposome) Zubereitungen eingesetzt. Das Prinzip beruht auf dem Vorliegen eines deutlich messbaren Dampfdrucks von Wasser in gefrorenem Zustand. Sofern der Wasserdampfpartialdruck des Eises niedriger als der Sättigungsdampfdruck der Umgebung ist, kann das Wasser durch Sublimation entfernt werden. Sublimation stellt den direkten physikalischen Übergang aus einer festen in eine gasförmige Phase dar. Der apparative Aufwand ist im Vergleich zu anderen Trocknungsverfahren höher, da hier neben einer Vakuumpumpe auch eine temperaturkontrollierte Auflagefläche vorhanden sein muss, die sowohl frieren als auch wärmen kann. Der Prozess unterteilt sich in drei Hauptphasen: dem Einfrieren, der Sublimation oder Primärtrocknung und der Sekundärtrocknung.

*Tabelle 4 Wasserbindungsarten nach Trocknungsaufwand
Darstellung in von oben nach unten ansteigender Bindungsenergie sortiert (8).*

Art der Wasser-Bindung	Erklärung
Haftwasser	Leicht zu entfernendes Oberflächenwasser. Es ist ungebunden und frei beweglich. Der Dampfdruck entspricht der Umgebung.
Kapillarwasser	Der Dampfdruck in Mikrokapillaren ist deutlich niedriger und hängt stark vom Krümmungsradius der Flüssigkeitsoberfläche ab.
Quellungswasser	Hydrophile Makromoleküle vermögen Wasser unter Adsorption zu binden. Eine Trocknung ist relativ einfach.
Adsorbiertes Wasser	Diese substanzspezifischen Adsorptionskräfte können sehr stark sein. Es bildet sich eine monomolekulare Schicht auf der Feststoffoberfläche aus, die weitere Schichten Wasser mit geringerer Bindungsstärke anfügen kann.
Hydrat- oder Kristallwasser	Die Wassermoleküle sind Teil des Kristallgitters und nur unter Zerstörung desselben freizusetzen.

Das Drei-Phasendiagramm von Wasser (Abbildung 14) verdeutlicht die Übergänge des Wassers während der Trocknung. Zu Beginn muss das noch flüssige Homogenisat tiefgefroren werden [Abb. 15, 1]. Das vorhandene Wasser liegt nun vollständig in fester Form vor. Durch Anlegen eines Vakuums wird der Sättigungsdampfdruck der Kammer erniedrigt und das gefrorene Wasser in die Sublimation gezwungen [Abb. 15, 2a]. Ob das Produkt nun durch reinen Unterdruck getrocknet werden kann [Abb. 15, 2b] oder zusätzlich Kontaktwärme [Abb. 15, 3] aufgewendet werden muss, hängt stark von den jeweils spezifischen Eigenschaften der Formulierung ab.

Das Ergebnis der durchgeführten Gefriertrocknung über 48 Stunden kann in Abbildung 9 und Abbildung 10 eingesehen werden. Die halbfeste Zubereitung hat ein festes bröckliges Erscheinungsbild, das durch leichte Scherstressung wieder verflüssigt werden kann. Der Inhaltstoff Saccharose-Monostearat besitzt einen wichtigen Einfluss auf die Eigenschaften der Zubereitung während der Trocknung. Weil das Wasser als Eis der Emulsion entzogen wird, kommt es zu einer Aufkonzentrierung der restlichen Inhaltsstoffe. Bei Temperaturen zwischen -10 °C und -30 °C führt der Zucker aber zu einem amorphen Erstarren des ImiSOLs in Nachbarschaft zu den Eiskristallen (Kryoprotektion). Entsprechend kommt es nicht zu einem temperaturbedingten Ausfällen vereinzelter Komponenten. Generell wird der O/ W-Emulgator mit einem HLB-Wert von 11 bereits breitflächig in der Kosmetik- und Lebensmittelindustrie eingesetzt.

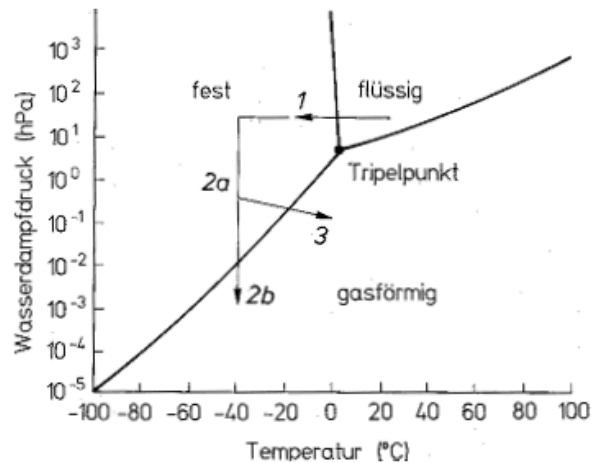


Abbildung 14 Drei-Phasendiagramm des Wassers mit Tripelpunkt

An diesem Punkt liegt Wasser gleichzeitig in festem, flüssigem und gasförmigem Zustand vor. Die Pfeile zeigen einen typischen Verlauf einer Gefrier Trocknung. 1 Einfrieren des Trocknungsguts, 2 Primärtrocknung durch Anlegen von Vakuum, 3 zusätzliche Wärmeeinwirkung (67).

1.3.2 Bearbeitung der Hautmodelle

Eine halb feste Zubereitung auf die Haut aufzutragen, ist keine diffizile Arbeit. Die Bestimmung der Eindringtiefe des Wirkstoffs in die Haut dagegen, fordert je nach Methode Geschick und technischen Aufwand. In den folgenden Abschnitten sollen die beiden verwendeten Präparationstechniken erläutert werden, mit denen die Hautmodelle zur Analyse aufbereitet wurden.

1.3.2.1 Tape stripping

Kann die Formulierung die Barriere des *Stratum corneums* überwinden und wenn ja, in welchem Ausmaß? Um die Penetrationstiefe von applizierten Stoffen in die Haut analytisch aufarbeiten zu können, ist eine schichtweise Abtragung sinnvoll. Hierzu werden Tesafilm®-Streifen auf die Haut mit gleichmäßigem Druck aufgebracht und wieder abgezogen. Die Methode ist einfach, minimal invasiv und ubiquitär einsetzbar (Mensch und Tier; lebende und tote Haut) (68). Wie viel Haut dabei pro Film abgetragen wird, hängt von verschiedenen Faktoren ab. Bspw. variieren die Kerneozyten in ihrer Größe je nach Körperstelle, Jahreszeit und Alter. Äußere Einflüsse stellen der Klebestreifen als solcher, der darauf verarbeitete Kleber, die Presszeit auf die Haut und die Kraft des Abziehens des Streifens dar. Eine eventuell aufgetragene Formulierung beeinflusst das Ergebnis zudem zusätzlich. Diese Variablen machen das tape stripping zu einem sehr schlecht reproduzierbaren Versuch. Der Nachteil wird aber durch den direkten Vergleich der Zubereitungen innerhalb desselben Protokolls nivelliert. Zudem werden mehrere Messreihen durchgeführt und die Ergebnisse gemittelt. Der sich nun in oder auf den Zellen befindliche Wirkstoff wird per HPLC-Analytik quantifiziert. Hierzu werden die Klebestreifen in einem Lösungsmittel definierter Menge, für eine definierte Zeit geschwenkt. Wichtig ist, dass der Klebestreifen vollständig mit Lösungsmittel bedeckt ist. Um ein Verkleben des Streifens mit sich selbst zu verhindern, werden kleine Glaskugeln aufgebracht. Die Lösung wird folgend per HPLC analysiert, wobei Vorversuche bezüglich der Kompatibilität der Analytik mit den Kleberinhaltsstoffen ratsam sind.

1.3.3.2 Kryogen-Schnitte

Die zweite Methode wurde an Haut von Mäusen, Schweinen und Rindereuter angewendet. Die Schnitte sollten zwei Fragestellungen beantworten: Kann mit der stripping-Methode das SC sicher abgetragen werden? Hierzu wurden senkrechte Schnitte von 25 μm (Maus, Schwein) angefertigt, gefärbt und fotografiert. Und wie weit penetriert die Zubereitung die darunterliegenden Hautschichten? Hierzu wurden parallel zur Oberfläche 25 μm (Maus, Schwein) bzw. 20 μm (Euter) dicke Schnitte angefertigt, der Wirkstoff extrahiert und die Lösungen der Analytik zugeführt.

Die Färbung der verschiedenen Zellschichten erfolgte mit Hämatoxylin-Eosin-Lösung nach Mayer. Hämatoxylin ist einer der ältesten und weitverbreitetsten Übersichtsfärbemittel in histologischen Laboren. Es wird ebenso zu Diagnosezwecken von malignem Tumorgewebe eingesetzt wie zur Bildgebung von intra- und interzellulären Bestandteilen (69). Es wird aus dem Holz des Blauholzbaums (*Haematoxylum campechianum*) gewonnen. Nach Oxidation des Hämatoxylin zum farbigen Hämatein erfolgt die Färbung in Abstufungen von blau, wobei die Farbe durch Zusatz von metallischen Salzen verändert werden kann. Der basische Farbstoff chelatisiert in der Zelle mit anionischen (sauren) Strukturen wie bspw. der DNS im Zellkern und färbt diese. Werden Chrom-Aluminium Salze verwendet, können Lipoproteine, Myelinschichten und neuronales Gewebe sichtbar gemacht werden. Kupferzusätze dagegen werden eingesetzt bei Fettsäuren oder Mitochondrien. Das hier verwendete Hämalaun folgt dem Rezept nach Mayer, der Kalium-Aluminium-Salze oder Ammonium-Aluminiumsalze verwendete. Durch Zugabe der Lösung zum Gewebe werden die sauren Bestandteile eingefärbt („blueing“), es folgten ein Waschschriff und die Zugabe von Eosin (Konterfärbung). Eosin wiederum ist ein synthetischer saurer Farbstoff, der an basische Strukturen (Zellplasmaproteine, Kollagen und Keratin) rot bindet.

1.3.3 Instrumentelle Analytik

Die im ersten Teil dieses Kapitels produzierten Produkte (ImiGEL und ImiSOL) müssen folgend einer Qualitätskontrolle unterzogen werden. Hierzu werden Kontrollen auf Partikelgröße, Wirkstoffgehalt, Gehalt von Verunreinigungen und Konservierungsmittel sowie die dazugehörigen chemischen wie mikrobiologischen Langzeitstabilitätsprüfungen erläutert.

1.3.3.1 Partikelgrößenmessung

Wie in den oberen Passagen bereits mehrfach betont, war die Teilchengröße in den hier hergestellten Formulierungen von ausschlaggebender Wichtigkeit. Grundlegend besitzen Partikelhäufungen, keine einheitliche geometrische Form, sondern unterliegen in den meisten Fällen einer Verteilung. Modellverteilungen die sich für Pulverpartikel bewährt haben, sind die Gauß'sche Normalverteilung oder die RRSB-Verteilung. Sie geben Lage- und Streuparameter der Probe an und ermöglichen so einen mathematisch-fundierten Vergleich von verschiedenen Chargen oder einzelnen Messungen (8). Die Messung der einzelnen Partikel erfolgt über eine statistische oder eine Äquivalenzprüfung des Durchmessers. Hierzu können verschiedene Verfahren eingesetzt werden wie bspw. mikroskopische Verfahren, Siebanalysen, Sedimentationsverfahren oder Impulsverfahren. Die hier verwendeten Systeme zählen zum einen zu den Streulichtverfahren (DLS) und zum anderen zu einer Kombination aus Streulicht und Ultramikroskop (NTA). Als Lichtquelle dient ein Laser, also

monochromatisches, kohärentes und linear polarisiertes Licht mit hoher Intensität, das an den suspendierten Teilchen gestreut, also gebrochen, reflektiert oder gebeugt wird (8).

Dynamic light scattering (DLS)

Die dynamische Lichtstreuung basiert auf der Brown'schen Molekularbewegung von Teilchen in einem Medium. Es gilt: je kleiner die Partikel sind, desto schneller bewegen sie sich durch das Medium und umgekehrt. Bei ihrer Bewegung streuen sie das einfallende monochromatische Licht des Lasers entsprechend stärker oder schwächer (s. Abbildung 15). Der Detektor kann mithilfe des Streumusters eine Autokorrelationsfunktion erstellen und diese zu einer Funktion des Partikeldiffusionskoeffizienten transformieren (70; 71). Aus der zweiten Funktion kann der äquivalente hydrodynamische Durchmesser von Partikeln unter Verwendung der Stokes-Einstein-Beziehung (vgl. Gl. 2) bestimmt werden, vorausgesetzt, die Partikel sind sphärisch und lichtundurchlässig.

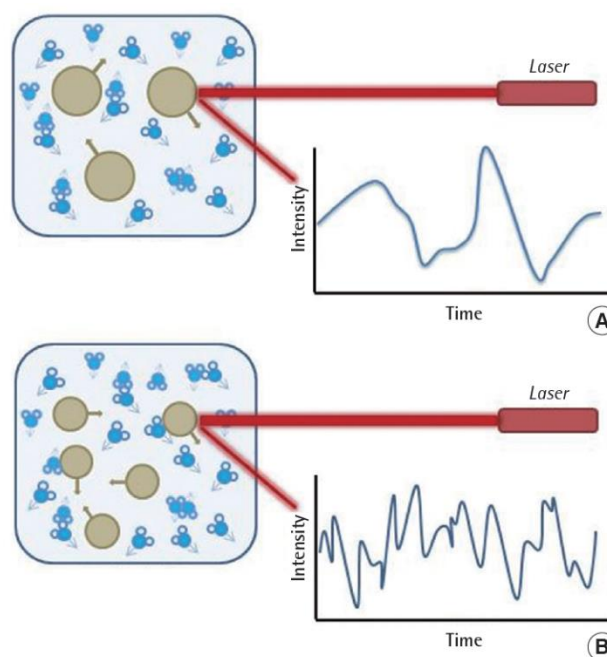


Abbildung 15 Schematische Übersicht der DLS-Messung

Aufgrund der Brown'schen Molekularbewegung diffundieren größere Partikel (A) langsamer durch das Medium als kleinere (B). Entsprechend „gleichmäßiger“ wird das Licht des Lasers gestreut. Eine mathematische Transformation erlaubt den Rückschluss des erhaltenen Diagramms auf die Partikelgröße (76).

Die DLS liefert zur Charakterisierung der Partikelmenge unter anderem zwei Parameter: den *z-Average* (s. Gl. 3) und den Polydispersitätsindex (PDI, s. Gl. 5). Der *z-Average* wird synonym als X_{DLS} oder d_{DLS} bezeichnet und beschreibt den Quotient der Summe der Lichtstreuung vom Teilchen i (S_i) geteilt durch die Summe des Verhältnisses Lichtstreuung (S_i) zu Durchmesser der Teilchen i (D_i). D_z liegt als harmonischer Mittelwert vor und wird aus der intensitätsgewichteten Verteilung berechnet (71; 72). Dies führt zu der Aussage, dass die *Z-Durchschnittsgröße*, die intensitätsgewichtete harmonische Durchschnittsgröße ist.

$$D_z = \frac{\sum S_i}{\sum (S_i/D_i)} \quad \text{Gl. 3 (71)}$$

$$D_z = \frac{\sum D_i^6}{\sum D_i^5} \quad \text{Gl. 4 (71)}$$

$$D_M = \frac{M_w}{M_n} \quad \text{Gl. 5 (71)}$$

Liegen die Partikelgrößen weit unter der verwendeten Wellenlänge des Lasers, spricht man von diesen Teilchen als Rayleigh-Streuer. Ihr z-Average kann mithilfe Gl. 4 näherungsweise bestimmt werden. Der dimensionslose Polydispersitätsindex, oder nach IUPAC seit 2009 nur Dispersitätsindex, wird nach Gl. 5 berechnet (73). M_w stellt das massenmittlere Molekulargewicht dar, während M_n das zahlenmittlere Molekulargewicht beschreibt. Liegen alle Teilchen in der gleichen Form vor, spricht man von einer monodispersen Verteilung, liegen zwei oder mehr verschiedenartige Teilchenmengen vor, handelt es sich um eine polydisperse Verteilung. Mathematisch spricht man von einer Monodispersität bei Werten unter 0,07, die auch angestrebt werden. Graphisch wiederum, würde eine Polydispersität an einem zweiten oder einem sehr breiten einzelnen Peak zu erkennen sein.

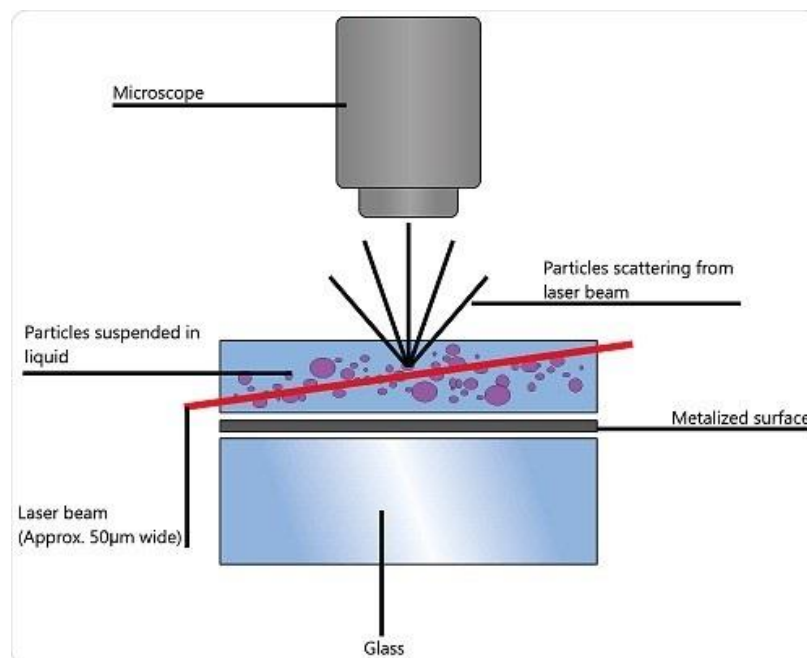


Abbildung 16 Schematische Übersicht der NTA-Methodik

Die angestrahlten Partikel reflektieren mehr oder weniger einen Teil des Laserlichts. Die Kamera zeichnet nun die Wegstrecke der Reflexion über einen gewissen Zeitraum auf und berechnet daraus die Partikelgröße. Dieser Zusammenhang beruht wie bei der DLS auf der Brown'schen Molekularbewegung (74).

Nanoparticle Tracking Analysis (NTA)

Vergleichbar zur DLS basiert auch die NTA auf der Brown'schen Molekularbewegung. Ebenso wird bei dieser Methode ein Laser verwendet, der eine Lichtstreuung an den Teilchen hervorruft. Doch statt das Streuungsmuster auszuwerten, wird diese als eine Art Marker verwendet, um das Partikel bei seiner Wanderung über die Zeit zu verfolgen. Um die Bewegung von Partikeln, deren Größe nahe oder unter der Wellenlänge von sichtbarem Licht (~500 nm) liegen, reicht ein Lichtmikroskop nicht mehr aus (75). Ein Ultramikroskop wiederum, kombiniert mit einer Kamera, kann hingegen Frame für Frame die Partikelstreuung verfolgen und darstellen. Am Ende der Messung wird ein 30 Frames-per-second (fps)-Video erhalten, das den Diffusionsweg mehrerer tausend Partikel darstellt (s. Abbildung 17). Der schematische Aufbau des Versuchs ist Abbildung 16 zu entnehmen. Mithilfe der Einstein-Stokes-Gleichung (Gl. 6) kann folgend der Durchmesser (d) des sphärischen Partikels berechnet werden. Dt stellt hierbei die Diffusionskonstante als Produkt aus Diffusionskoeffizienten (D) und der Zeit (t) dar. Bei bekannter Temperatur (T in Kelvin) und Viskosität (η), kann mit der Boltzmann Konstante (K_b) auf die Partikelgröße geschlossen werden. Das Ergebnis ist immer eine Mittelung der beobachteten Bewegungen und wird in nm angegeben.

$$Dt = \frac{TK_b}{3\pi\eta d} \quad \text{Gl. 6 (75)}$$

Das System besitzt Einschränkungen bezüglich der hier zu vermessenden Partikel. Sind diese aus bestimmten Materialeigenschaften stark reflektierend, entstehen Artefakte, die sich als weiße Lichtkreise um die eigentlichen Partikel herum zeigen. Das System erkennt nicht mehr nur den Partikel selbst, sondern auch die Lichtkreise als separate, größere Partikel. Dies verzerrt die analytische Auswertung und ist nicht zu vermeiden. Des Weiteren funktioniert das System nur optimal bei möglichst monodispersen Verteilungen. Während das DLS eine Polydispersität aktiv anzeigt, kann bei der NTA nur eine Vermutung aufgrund der „schlechten“ Auswertung angestellt werden. Teilweise kann hier eine Verdünnung zu auswertbaren Ergebnissen führen, die allerdings auf Kosten der größeren ausgeschwemmten Partikel erfolgt und damit wieder eine Verzerrung der Analyse darstellt.

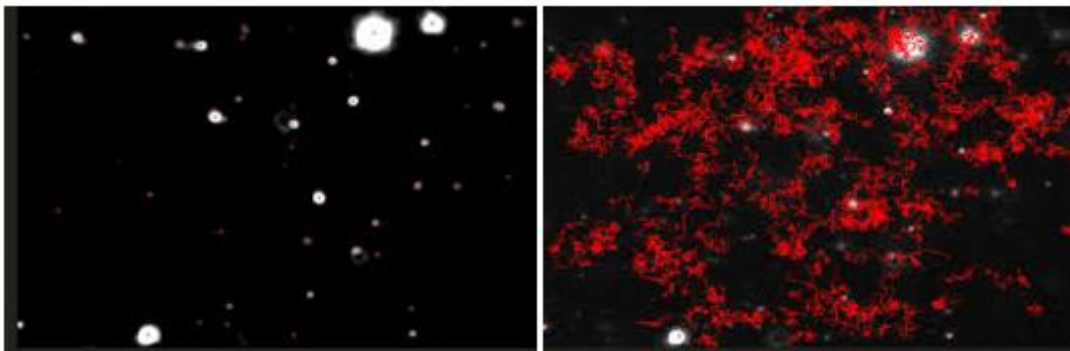


Abbildung 17 Typische Aufnahme der NTA

Links vor und rechts nach Bestimmung der Wegstrecken von tausenden Partikel. (75). Deutlich zu sehen sind große Partikel (oben rechts) mit ihren Lichtkreisen, die als Analyseartefakt zu einer Verzerrung der Auswertung führen können.

1.3.3.2 Gehaltsmessung für Wirkstoff, Verunreinigung und Konservierungsmittel per HPLC

Die high performance liquid chromatography oder Hochdruckflüssigchromatographie ist ein mittlerweile gängiges System zur Separierung und Identifikation von Stoffen und Stoffgemischen. Es besteht aus mindestens vier Bausteinen (Pumpe, Injektor, Säule und Detektor) und kann um eine Entgaser-Station (vor der Pumpe) und eine Vorsäule ergänzt werden (s. Abbildung 18). Alle Bausteine sind in Kette geschaltet und werden kontinuierlich mit einer mobilen Phase (Eluent, flüssig) durchspült.

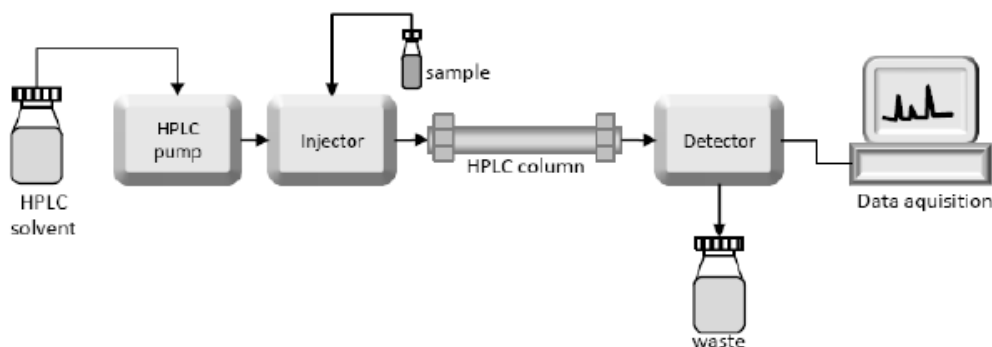


Abbildung 18 Schematischer Aufbau einer HPLC-Anlage

Das System muss in sich geschlossen sein, da sehr hohe Drücke auf die Medien wirken. Die kritischsten Komponenten sind die Säule und der Detektor. Beide müssen für den Zweck der Analyse geeignet sein (76).

Während die Pumpe den Eluenten pulsationsarm durch das System befördern soll, versucht der Entgaser alle Luftpneinschlüsse durch Ultraschall aus dem fließenden Medium zu entfernen. Diese würden im weiteren Verlauf das System stören und zu Fehlern führen. Es schließt sich der (Auto-)Injektor an, der die zu analysierende Probe in das System bringt. Über ein 6-Wege-Ventil kann die Probe definierter Menge vorgeladen und dann in das strömende Medium eingebracht werden ohne Druckschwankungen zu erzeugen. Nachdem die Probe nun im System ist, gelangt sie zum Herzstück der Anlage. Die stationäre Phase (Säule, fest) besteht aus einer gestapelten Packung von Trennmateriale, das gewisse hydrophile oder lipophile Eigenschaften besitzt. Wird eine Normalphasen-Säule verwendet, besteht das Trennmateriale aus Kieselgelen oder Aluminiumoxiden, die mit polaren Gruppen interagieren können. Für den umgekehrten Fall werden Umkehrphasen, also Kieselgelgerüste mit langen verknüpften Kohlenstoffketten, verwendet (hier: Reversed Phase-C8). Während die polaren Säulen auf Adsorptionsvorgängen basieren, funktionieren Umkehrphasen nach dem Prinzip der Verteilung oder Van-der-Waals-Kräfte (77). Abbildung 19 zeigt die Trennung dreier Komponenten (dargestellt als Rechtecke, Kreise und Dreiecke) in einer solchen RP-Säule. Über die Zeit läuft das Rechteck, als sehr hydrophiler Stoff, am schnellsten ab, da keine Wechselwirkungen mit dem Säulenmateriale stattfinden. Das Dreieck hingegen erweist sich als bindungsfreudig und benötigt demnach sehr viel länger, um die Säule zu verlassen. Der Vollständigkeit halber sei an dieser Stelle noch der Einfluss des Eluenten auf die Trennung angefügt. Aufgrund der Wechselwirkung des Kieselgels sowohl mit den Stoffen als auch mit dem Medium entstehen multiple Konkurrenzsituationen, die die Trennung der zu analysierenden Stoffe stark beeinflussen kann.

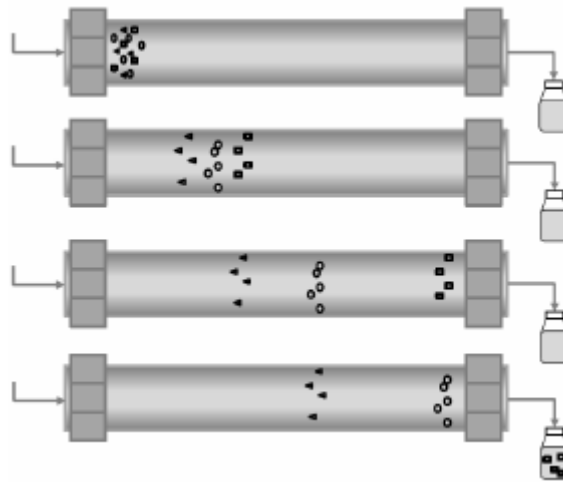


Abbildung 19 Trennwirkung der Säule auf eine Mischung mit drei Komponenten
Aufgrund der Wechselwirkung zwischen Probe und stationärer Phase trennen sich die Komponenten und können separiert analysiert werden.

Nach erfolgter Trennung der Stoffe erfolgt die Detektion. Diese kann auf unterschiedliche Arten erfolgen. Die häufigste und auch hier verwendete Methode ist die Bestimmung per UV/VIS-Detektor. Konjugierte Doppelbindungen und Aromaten absorbieren die Strahlung, die Absorption wiederum kann gemessen werden. Als Alternativen seien die Fluoreszenz, die Refraktometrie- sowie Fluoreszenzmessung und der Dioden-Array genannt. Mithilfe einer Software ergibt sich aus der gemessenen Absorption ein Kurvendiagramm, das stoffspezifisch in eine Elutionszeit überführt wird. Durch den Vergleich gegen einen internen oder externen Standard kann die eluierte Stoffmenge berechnet werden.

Bezogen auf diese Arbeit mussten der Wirkstoff (Imiquimod), die Verunreinigungen (imiquimod related compound, ICR) und das Konservierungsmittel (Parabenmischung) leitliniengerecht untersucht, getrennt und validiert werden (78). Die Analysen mussten somit nicht nur die Einzelbestimmungen, sondern auch die Mischungen und ihre jeweiligen Interaktionen umfassen. Nach Leitlinie sind die einzelnen Stoffe untereinander deutlich zu diskriminieren und eine Beeinflussung der Analytik untereinander zu untersuchen (bspw. eluiert Imiquimod im Beisein der Verunreinigungen später, als in der Solo-Analyse).

1.3.3.3 Chemische, physikalische und mikrobiologische Stabilität

Die Maxime eines jeden Arzneimittelherstellers ist die Qualität, Wirksamkeit und Unbedenklichkeit seines Produktes über einen langen Zeitraum aufrecht zu halten. Allein schon aus logistischen Gründen einer weltweiten Belieferung zielen Unternehmen heutzutage auf 3-5 Jahre Stabilität ab. Das *International Council of Harmonisation* (ICH) stellte hierfür eine Vielzahl an Leitfäden für Qualität, Sicherheit, Effektivität und multidisziplinäre Themengebiete öffentlich zur Verfügung. Als harmonisiertes Werk der drei Hauptarzneibücher Europas, Japans und der USA sind die Vorgaben recht unscharf gehalten, während in den jeweiligen Arzneibüchern die Anforderungen spezifiziert werden. Für die in dieser Arbeit beschriebenen Untersuchungen wurden die Vorgaben der ICH in Bezug auf die chemische und physikalische Stabilität angewandt, während die mikrobiologischen Tests nach Vorgaben der Ph.Eur. durchgeführt wurden.

ImiGEL sollte in einer vierwöchigen Anwendungsphase klinisch geprüft werden. Aufgrund des schnellen Aufbrauchens der Zubereitung durch die Patienten, wurden für das Studiendesign

mittlere Temperaturen von 30 °C und Luftfeuchten von 65 % relativer Feuchte gewählt. Hierzu schreiben die Leitlinien einen Prüfungszeitraum von 6 Monaten vor. Mit einem realistischen Zuschlag von zwei Wochen für Produktion, Qualitätskontrolle, Freigabe und Transport zu der Anwendungsdauer ergibt sich ein kongruenter Zeitverlauf zwischen geforderten und gewünschten Untersuchungsperioden. Die Leitlinien schreiben weiterhin die Festlegung einer rationalen Frequenz der Prüfungen zu den wahrscheinlichsten Veränderungen während der Lagerung, die Qualität und Sicherheit des Arzneimittels betreffend, vor (79). Somit wurden aufgrund der bisher fehlenden Datenbasis die chemischen Gehalte monatlich und die mikrobielle Reinheit zweimonatlich nachgewiesen.

Als signifikante Veränderung definiert die ICH Q1A (auf ImiGEL spezifisch gekürzt):

1. Änderung des Gehalts des Wirkstoffes um 5 % gegenüber dem ursprünglichen Wert;
2. Jedes Abbauprodukt, das sein Annahmekriterium überschreitet;
3. Nichterfüllen der Annahmekriterien für Aussehen, physikalische Eigenschaften und Funktionstest (z.B. Farbe, Phasentrennung, u.ä.) wobei unter *accelerated conditions* zu erwartende Veränderungen wie Schmelzen der Suppositorien-Masse gerechtfertigt werden können oder
4. Nichteinhaltung des Akzeptanzkriteriums für den pH-Wert.

Tabelle 5 Lagerungsbedingungen nach ICH Q1A.

*Der Antragsteller kann bei Langzeitstudien entscheiden ob diese unter 25 °C ± 2 °C / 60 % r.F. ± 5 % r.F. oder unter 30 °C ± 2 °C / 65 % r.F. ± 5 % r.F. durchgeführt werden. **Sofern 30 °C ± 2 °C / 65 % r.F. ± 5 % r.F. den Langzeit-Bedingungen entspricht, muss keine weitere Intermediate Studie durchgeführt werden.

Studiendesign	Lagerungsbedingungen	Minimale Dauer der Studie bei Einreichung der Daten
Langzeit*	25 °C ± 2 °C / 60 % r.F. ± 5 % r.F. oder 30 °C ± 2 °C / 65 % r.F. ± 5 % r.F.	12 Monate
Intermediate**	30 °C ± 2 °C / 65 % r.F. ± 5 % r.F.	6 Monate
Accelerated	40 °C ± 2 °C / 75 % r.F. ± 5 % r.F.	6 Monate

Wie von der ICH Q1A-Leitlinie gefordert, wurden die Anforderungen (Tabelle 5) an Temperatur und Luftfeuchte während des Experiments eingehalten. Weiter beschreibt die Leitlinie unter 2.2.7.2, dass sofern ein luft- und wasserdampfdichtes Primärpackmittel eingesetzt wird, die Prüfung unter jeglicher kontrollierten oder umgebenden relativen Feuchte durchgeführt werden kann (79). Die hier verwendeten Aluminiumtuben entsprechen diesen Vorgaben. Generell schreibt die ICH die Stabilitätsprüfung einer Arzneizubereitung immer in Kombination mit der Primärverpackung, sofern vorhanden sogar der Sekundärverpackung vor. Unter physikalischen Gesichtspunkten wurden keine expliziten Prüfungen durchgeführt, dennoch Konsistenz und Farbe makroskopisch überprüft. Beide Prüfpunkte verhielten sich über 6 Monate unauffällig und wurden demnach nicht weiterverfolgt. Als halb feste Zubereitung mit einem signifikanten Wasseranteil ist ImiGEL grundsätzlich anfällig für mikrobiellen Befall. Das europäische Arzneibuch fordert entsprechend umfangreiche Prüfungen des Arzneimittels insgesamt und auf das ausreichende Vermögen des Konservierungsmittels einen Keimbefall zu unterbinden oder zu unterdrücken. In dieser Arbeit wurden die Vorschriften Ph.Eur 2.6.12 „Zählung der gesamten vermehrungsfähigen Keime“, 2.6.13 „Nachweis spezifizierter Mikroorganismen“ sowie 5.1.3. „Prüfung auf ausreichende Konservierung“ angewandt. Die Methode der Zählung der vermehrungsfähigen Keime kann auf zwei verschiedene Arten durchgeführt werden. Die Membranfiltermethode stellt eine klassische Filtrierung der zumeist flüssigen oder auflösbaren Zubereitung dar. Die Filter (0,45 µm Porenweite) werden nach der Filtration zur Zählung der aeroben Keime (total aerobic microbial count, TAMC) auf Casein-

Pepton-Agar bei 30-35 °C über 3-5 Tage bebrütet. Zur Bestimmung der Hefen und Schimmelpilze (total combined yeasts/ moulds count, TYMC) wird das Filterpapier auf einen Sabourand-Dextrose-Agar bei 20-25 °C über 5-7 Tage inkubiert. Nach Auszählung der koloniebildenden Einheiten (KBE) kann der Befall pro ml oder g angegeben werden (8). Für Halbfeste Zubereitungen bietet sich die Plattenguss- oder Ausstreichmethode an. Entweder wird die Zubereitung mit dem flüssigen Agar ausgegossen oder auf dem bereits verfestigten verteilt. In beiden Fällen werden die Platten mit Verdünnungsstufen beimpft, wobei die stärkst befallene Stufen zur Auswertung herangezogen wird. Während die Auszählungsmethoden eine umfängliche quantitative Bestimmung aller Keime vorsieht, fordert 2.6.13 die Auszählung der Keime *E.coli*, *Salmonellen*, *P.aeruginosa*, *S.aureus* und *Clostridien* über spezielle Nährmedien, wobei *P.aeruginosa* und *S.aureus* nicht nachzuweisen sein dürfen. Die letztangeführte Prüfung stellt einen Konservierungsbelastungstest dar. Hierbei wird die Zubereitung innerhalb des Primärpackmittels mit 10^5 - 10^6 Keimen pro g Zubereitung beimpft und inkubiert. Die Überprüfung eines Wachstums, Stasis oder Reduzierung der Keimzahl findet innerhalb 28 Tagen mehrmals statt, wobei definierte Reduzierungen vorgeschrieben sind, die sich je nach Zubereitung (Parenteralia, Ophthalmologika, Oralia und Topika) unterscheiden.

Die hier angewandten Methyl- und Propylparabene gehören zur Gruppe der Phenole, deren endständige Hydroxylgruppe auch die Wirksamkeit ausmacht. Parabene besitzen eine starke pH-Abhängigkeit und sind nur im undissoziierten Zustand wirksam (8). Die Wirksamkeit beruht auf der generellen Toxizität der Phenole als Zellgift, das in hohen Konzentrationen das Zelleiweiß koagulieren lässt. Parabene sind oral gut verträglich, weshalb sie auch in Lebensmitteln eingesetzt werden. Dermal und auf Schleimhäuten können sich Kontaktekzeme und Sensibilisierungen (Paragruppenallergien) ausbilden. Beim gleichzeitigen Einsatz von nichtionogenen Tensiden, hier vor allem Tween 80, werden die Hemmwirkungen der Parabene und anderer Konservierungsmittel stark reduziert (8). Wässrige Paraben-konservierte Lösungen bspw. erfahren dadurch eine 80-90%ige Inaktivierung. Zum einen liegt dies an Mizelleinschlüssen, sodass die Stoffe erst gar nicht an ihren Wirkort gelangen, zum anderen aber auch an starken Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den phenolischen Hydroxylgruppen und dem Sauerstoff der Polyoxyethylengruppen des Tensids (s. Abbildung 20). Dieser Inaktivierung ist nur durch starke Aufkonzentrierung des Konservans oder einem Tausch der Hilfsstoffe zu begegnen.

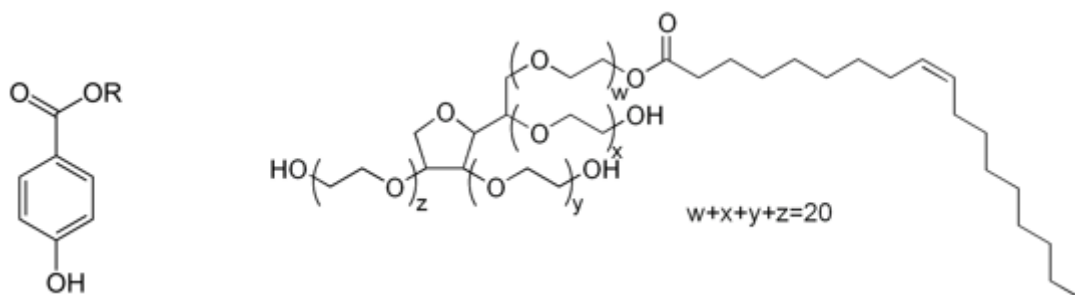


Abbildung 20 Chemische Struktur der Parabene (li.) und Tween 80 (re.)

Die wirkhemmende Interaktion der beiden Hilfsstoffe liegt zum einen an einem Mizelleinschluss des Parabens, zum anderen an einer Interaktion des Phenols mit den Sauerstoffen des Polyoxyethylens.

2 Ziele dieser Dissertation

Jährlich kommt es innerhalb von Impfkampagnen, Anästhesien und ähnlichen Therapien, die eine invasive Verabreichung erfordern, weltweit zu 35,7 Millionen Verletzungen des medizinischen Personals oder der Patienten selbst. Bezogen auf eine Impfung sind parenterale, orale und nasale Administrationswege bekannt, wobei Schluckimpfungen und die Verabreichung durch die Nase eine sehr untergeordnete Rolle spielen. Erste Bemühungen in jüngerer Zeit versuchen dermale und mucosale Administrationswege für eine Vakzinierung zu erschließen und zu etablieren. Sollten sich transdermale Impfungen im therapeutischen Sinne durchsetzen, könnten diverse Vorteile durch den Wegfall der Spritzen entstehen. Die Verletzungsgefahr an Nadeln oder Glasbruch der Spritzen entfiel. Die Ansteckungsgefahr an übertragbaren Krankheiten durch Wiederverwendung von Nadeln wäre reduziert. Die Anwendung einer halbfesten Formulierung kann durch den Patienten in Eigenregie durchgeführt werden und bedürfte keinem medizinischen Personal mehr. Nicht zuletzt würden Ängste und Traumata vor Nadeln und Spritzen im Ursprung erstickt.

Bis zum Zeitpunkt der flächendeckenden Therapie mit transdermalen Arzneimitteln ist gewiss noch eine wissenschaftliche wie praxisgerechte Wissensstrecke zu meistern, doch soll diese Arbeit den Start zum Ziel unterstützen. Diese Arbeit befasste sich somit mit pharmazeutisch-technologischen Themen wie chemischen und biologischen Stabilitäten sowie der Validierung des Herstellungsprozesses, der Reinigung und der anschließenden Analytik. Biopharmazeutisch wurden die Permeation sowie die Penetration der Formulierungen auf Häuten verschiedener Säugetierarten untersucht. Hierzu wurden zu Beginn dieser Arbeiten zwei präklinisch vorentwickelte halbfeste Formulierungen zur Verfügung gestellt. Beide Formulierungen enthalten Imiquimod als Wirkstoff, werden aber unterschiedlich technologisch verarbeitet und (prä-)klinisch eingesetzt. Sämtliche Prozesse der Produktion sowie der Qualitätskontrolle wurden unter GMP-Bedingungen durchgeführt. Die hierzu benötigten Gerätschaften wurden einer intensiven Qualifizierungs- und Validierungsphase unterworfen.

Die erste Formulierung stellt eine multidisperse plastische Creme dar. ImiGEL soll im Studienmodell Aktinische Keratose eingesetzt werden und dort erste klinische Daten erheben. Die Rezeptur zeigte sich in präklinischen Tierversuchen in-vivo wie in-vitro (Franz-Zellen-Versuche) gegenüber dem bereits vermarkteten Produkt Aldara® (Firma Meda AB) als ebenbürtig in Bezug auf sein transkutanes Immunisierungspotential (60). Hierbei liegt der Wirkstoff im Marktprodukt in gelöster Form vor, während die neuentwickelte Rezeptur Imiquimod als submikronisierten Feststoff enthält. Zudem konnte durch die Verwendung geeigneter Hilfsstoffe mit ImiGEL eine vermeintlich verbesserte Verträglichkeit und Handhabung gegenüber der Konkurrenz erzielt werden. Aldara®, hier als Goldstandard eingesetzt, enthält Imiquimod in gleicher Konzentration wie ImiGEL, doch während die Fa. Meda AB Isostearinsäure verwendet, die ihrerseits bereits eine Entzündungsreaktion auslöst, setzt ImiGEL auf die abheilungsfördernde Wirkung des Jojobaöls. Des Weiteren wird der Goldstandard als dünnflüssige Lotion auf dem erkrankten Areal aufgetragen, wobei ungewollt gesundes Gewebe zwangsläufig mitbehandelt wird. Als plastisch verformbare Creme kann das neu entwickelte Emulsionsgel als fester Strang einfach dosiert und durch leichte Scherkraft selektiv verteilt werden.

Während die oben genannten Methoden der Analytik und Reinigung auch der zweiten Formulierung zu Gute kamen, lag der Schwerpunkt bei ImiSOL in der biopharmazeutischen

Charakterisierung bezüglich Permeation und Metabolisierung in lebender Haut, sowie die Untersuchung der Partikelgrößen entlang der entscheidenden Prozessschritte. ImiSOL ist ein gefriergetrocknetes Produkt, das nach Mahlung, Hochdruckhomogenisation und Trocknung ein krümeliges, festes Erscheinungsbild zeigt, aber durch leichte Scherstressung in seine halb feste pastöse Form rücküberführt werden kann. Der Wirkstoffgehalt liegt wie bei den vorher beschriebenen Formulierungen bei 5%; die Lipidphase wird durch Squalen in Kombination mit Tocopherol dargestellt. Nicht in dieser Arbeit inbegriffen, aber diskutiert, werden das weitere Vorgehen in Bezug auf die Stabilität, die Applikationsform und die Vorbereitung zum Einsatz in einer klinischen Studie von ImiSOL. Der derzeitige Entwicklungsstand lässt noch keine klinische Anwendung am Menschen zu und bedarf weiterer Optimierung. An Mäusen allerdings zeigte ImiSOL gegenüber ImiGEL, als auch Aldara[®], eine signifikant überlegene Impfreaktion in Bezug auf Immunisierungsstärke und Bildung eines Impfgedächtnisses.

Zusammenfassend lassen sich somit die Aufgaben dieser Arbeit wie folgt darstellen

- 1) Entwicklung und Validierung einer robusten Analytik für ImiGEL entsprechend der Arzneibücher bezüglich Wirkstoff, Verunreinigungen und Konservierungsmittel.
- 2) Nachweis der chemischen und mikrobiologischen Stabilität von ImiGEL.
- 3) Entwicklung einer validierten Reinigungsmethode der verwendeten Herstellungsgeräte gegenüber dem Wirkstoff Imiquimod am Beispiel ImiGEL.
- 4) Charakterisierung von herstellungsbedingten, nicht Wirkstoff-verwandter Verunreinigungen in ImiGEL.
- 5) Penetrations- und Permeationsstudien beider Formulierungen auf unterschiedlichen Säugetierhäuten.

3 Materialien und Methoden

Die verwendeten Gerätschaften (Hard- wie Software) sowie Materialien (chemischer wie biologischer Natur) wurden der Übersichtlichkeit halber tabellarisch aufgeführt. Die Erklärungen zu den Methoden sind entsprechend den beiden galenischen Formulierungen und nach pharmazeutischen Themengebieten aufgeteilt.

3.1 Geräte

Tabelle 6 Auflistung der verwendeten Gerätschaften

Gerät	Modell, Firma
Waage	Precisa XR 205SM-DR, Precisa Gravimetrics AG, Dietikon, Schweiz
	Sartorius LE225d-OCE, Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
	Denver Instrument S-2002, Denver Instrument GmbH, Göttingen, Deutschland
Hochdruckhomogenisator	Avestin C3 Emulsiflex, AVESTIN Europe GmbH, Mannheim, Deutschland
Viskosimeter	Modell nach Ubbelohde, Nummer IV rot, Schott AG, Mainz, Deutschland
pH-Meter	pH 538, Xylem Analytics Deutschland Sales GmbH & Co. KG, Weilheim, Deutschland
Wasseraufbereitung	Bi-Destillation Bi12E11, Heraeus Quarzglas GmbH, Hanau, Deutschland
Trockenschrank	Ecocell 55, MMM Medcenter Einrichtungen GmbH, München Deutschland
Mühle	Pulverisette 6 classic, Fritsch GmbH, Idar-Oberstein, Deutschland
Mahlwerkzeug	Zirkoniumoxid-Mahlbecher, 45 ml, Fritsch GmbH, Idar-Oberstein, Deutschland
	Zirkoniumoxid Mahlkugeln, 1 mm, Fritsch GmbH, Idar-Oberstein, Deutschland
HPLC-Autosampler	AS-950, JASCO Deutschland GmbH, Pfungstadt, Deutschland
HPLC-Pumpe	PU-980, JASCO Deutschland GmbH, Pfungstadt, Deutschland
HPLC-UV/VIS-Detektor	UV-975, JASCO Deutschland GmbH, Pfungstadt, Deutschland
HPLC-Degaser	DG-980-50, JASCO Deutschland GmbH, Pfungstadt, Deutschland
HPLC-Gradientenmischer	LG-980-025, JASCO Deutschland GmbH, Pfungstadt, Deutschland

Fortsetzung Tabelle 6 Auflistung der verwendeten Gerätschaften

HPLC-Säulenofen	Column-Thermostat Jet Stream Plus JASCO Deutschland GmbH, Pfungstadt, Deutschland
HPLC-Säule	Zorbax RX-C8, 4,6 x 150 mm, 5µm, Agilent Technologies, Santa Clara, USA
	Inertsil ODS-5, 4,6 x 250 mm, 5µm, GL Sciences, Japan
	PerfectSil 300 RP-C8, 4,6 x 250 mm, 5 µm, MZ-Analysentechnik GmbH, Mainz, Deutschland
IR	FTIR-8400s, Shimadzu Science, Kyoto, Japan
ATR-Einheit	MIRacle® Single Reflection, PIKE Technologies, Madison, USA
Gefrierschrank	Ultra-low Temperature Freezer MDF-U70V, Sanyo Electric Co., Ltd, Moriguchi, Japan
Gefriertrockner	Christ LOC-1M, Alpha 1-4, B.Braun Biotech International GmbH, Osterode am Harz, Deutschland
Vakuumpumpe	Drehschieber-Vakuumpumpe, Vacuubrand GmbH + Co KG, Wertheim, Deutschland
Mikrotom	Cryo Star HM 560V, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Sedimentationsplatten	CASO-Agar mit LTHTh, 30ml Vol., 90mm, Mibius e.K., Düsseldorf, Deutschland
Abklatschplatten	Caso-Agar-Abklatschplatten mit LTH, Mibius e.K., Düsseldorf, Deutschland
Kryomedium	Richard-Allan Scientific® NEG 50® Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Mikrotom-Klingen	Edge-Rite® Disposable Microtome Blades, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Objektträger	SuperFrost® Gelb Art.Nr.2106, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Lochstanze	12mm, Westfälische Gesenkschmiede GmbH, Breckerfeld, Deutschland
Mikroskop	Leica DMIL, Leica Mikroskopie & Systeme GmbH, Wetzlar, Deutschland
Kamera	Nikon D5000, Nikon Corporation, Tokio, Japan
Klebefilm	Tesafilm® 20mm Breite, Beiersdorf AG, Hamburg, Deutschland
Schüttler	Type TU-1, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Druckluftkompressor	SO 45-E2-ASY, Fritz Haug AG, Maschinenfabrik St. Gallen, Schweiz
Haut – Schwein	Deutsches Hausschwein (ungebrüht), Schlachthof Alzey, Alzey, Deutschland
Haut – Maus	C57BL/6J Mäuse, III. Medizinische Klinik und Poliklinik, Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Mainz, Deutschland
Haut – Euter	Rindereuter (perfundiert), Univ.-Prof. Dr. Kiezmann, Institut für Pharmakologie, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover, Hannover, Deutschland

3.2 Software

Jasco Borwin Integrator, Seriennr. 1.50/16, JASCO Deutschland GmbH, Pfungstadt, Deutschland

Microsoft Office Professional Plus 2016 - Excel, Redmond, USA

Microsoft Office Professional Plus 2016 - Word, Redmond, USA

Shimadzu FTIR Software Seriennr. 206-95080D, Shimadzu Science, Kyoto, Japan

3.3 Materialien

Tabelle 7 Auflistung der verwendeten Materialien und Chemikalien

Bestandteil	Hersteller, Lieferant, Großhändler
Carbomer 974P	Caesar & Loretz GmbH, Hilden, Deutschland
NaOH (1 mol/ L)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Imiquimod	Teva Pharmaceutical Industries Ltd., Petach Tikva, Israel
Jojobawachs	Caesar & Loretz GmbH, Hilden, Deutschland
Konserviertes Wasser	Caesar & Loretz GmbH, Hilden, Deutschland
Natronlauge, Plätzchen	Caesar & Loretz GmbH, Hilden, Deutschland
Tween 80	Caesar & Loretz GmbH, Hilden, Deutschland
Polysorbat-Referenzspektrum	EDQM Council of Europe, Strasbourg, Frankreich
1-Heptasulfonat	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Acetonitril	VWR International, Pennsylvania, USA
Bidest. Wasser	Eigenherstellung
Phosphorsäure, konz.	Fluka, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Triethylamin	Fluka, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Squalen	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Sucroseester S1670	Harke Pharma GmbH, Mülheim, Deutschland
Tocopherol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Propylparaben Standard	Sigma Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Methylparaben Standard	Sigma Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Imiquimod Standard	United States Pharmacopeia, Maryland, USA
Imiquimod Related Compound A Standard	United States Pharmacopeia, Maryland, USA
Imiquimod Related Compound B Standard	United States Pharmacopeia, Maryland, USA
Imiquimod Related Compound C Standard	United States Pharmacopeia, Maryland, USA
Imiquimod Related Compound D Standard	United States Pharmacopeia, Maryland, USA
Imiquimod Related Compound E Standard	United States Pharmacopeia, Maryland, USA
Einwegpipetten	Pasteur Pipetten 7 ml, VWR International, Pennsylvania, USA
Universal Indikatorpapier	Sigma Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Einweg-Spritzen	Luer-Lock 60 ml „Omnifix“, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
	Luer-Lock 10 ml „Injekt“, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
HPLC-Vials mit Deckel	Braunglas, Flachboden, 31 x6 mm inklusive Inlet (200 µl Mikroinsert, 31 x 6 mm), inklusive Deckel (10 mm PP-SK, schwarz), VWR International, Pennsylvania, USA
HPLC-Septum	10 mm Scheibe, PTFE virginial, VWR International, Pennsylvania, USA
Rollrand-Schnappdeckelgläser	20 ml, braun, weithals, inklusive Deckel aus PE, transparent, VWR International, Pennsylvania, USA
Injektionskanülen	Sterican Ø 2,10 x 80 mm, 14G x 3 1/8“, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Aluminiumtuben	Aponorm 7 ml, WEPA APOTHEKENBEDARF GmbH & Co KG, Hillscheid, Deutschland
	Kienzle-Tuben 35 ml, CTA GmbH, Bietigheim-Bissingen, Deutschland
	Kienzle-Tuben 172 ml, CTA GmbH, Bietigheim-Bissingen, Deutschland

Fortsetzung Tabelle 8 Auflistung der verwendeten Materialien und Chemikalien

Trifluoressigsäure	Sigma Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Ethanol	LiChrosolv®, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Essigsäure	Sigma Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Acetatpuffer	Sigma Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Hämalaunlösung sauer, nach Mayer	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Eosin-Lösung G 1%	Sigma Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Tyrode	Elektrolyt- und Glukose-Lösung, pH-Wert 6,6; Univ.-Prof. Dr. Kiezmann, Institut für Pharmakologie, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover, Hannover, Deutschland

3.4 Methoden

Die verwendeten Methoden untergliedern sich vorerst nach Formulierung und folgend in ein technologisches und ein biopharmazeutisches Kapitel. Innerhalb der technologischen Fragestellungen wurden Aufgaben der Formulierungsentwicklung und der dazugehörigen Problematiken beleuchtet. Die biopharmazeutische Komponente wiederum behandelt die Anwendung beider Formulierungen in präklinischen Hautmodellen und die mikrobielle Stabilität des Emulsionsgels.

3.4.1 Technologische Entwicklung von ImiGEL

Im Mittelpunkt der Qualitätskontrolle stand die Entwicklung und Etablierung einer HPLC-Analytik bezüglich des Wirkstoffs, seinen Verunreinigungen sowie des Konservierungsmittels und wird hier entsprechend ausführlich behandelt. Ergänzt wird die quantitative Analytik um eine validierte Reinigungsmethode für den Hochdruckhomogenisator und eine toxikologische Einschätzung des Abriebs durch Mahlwerkzeuge.

3.4.1.1 Entwicklung einer validierten HPLC-Methode bezogen auf den Wirkstoff

Zur Überprüfung der chemischen Stabilität und zur späteren Reinigungsvalidierung der produktberührenden Teile des Emulsiflex Hochdruckhomogenisators war die Entwicklung einer qualitativen und quantitativen HPLC-Analytik für den Wirkstoff Imiquimod essentiell. Als Grundlage dienten die Monographien Imiquimod und Imiquimod-Creme der USP. In den Tabellen Tabelle 8, Tabelle 9 und Tabelle 10 sind auszugsartig die Verdünnungsreihen der Referenzlösungen, die Medien und wichtigsten Analyseinstellungen angegeben. Bezüglich Imiquimod wurden sowohl interday- als auch intraday-Daten erhoben und verglichen. Es wurden folgende Parameter bestimmt bzw. validiert:

- Substanz-Identifikation: Genereller Versuch die Substanz mit der verwendeten Methode in ausreichender Empfindlichkeit zu registrieren. Hierzu wurde der offizielle Imiquimod Standard der USP verwendet und auf die gewünschten Konzentrationen verdünnt.
- Linearität: Definierter Messbereich, der statistisch betrachtet einen zuverlässigen Zusammenhang zwischen Messsignal und Konzentration einer Probe darstellt.
- Präzision: Kriterium zur Wiederholbarkeit einer Messung. Sie gibt das Maß der Streuung an, kann aber keine Aussagen zur Richtigkeit der Ergebnisse machen. Ein sehr präzises Verfahren liefert bei mehrmaliger Injektion der gleichen Konzentration nahezu gleiche Ergebnisse. Für diese Versuchsreihe wurde ein Annahmekriterium von $CV \leq 10 \%$ festgelegt.

- Richtigkeit: Kriterium zum Abstand des erhaltenen Ergebnisses zum richtigen oder wahren Wertes $[\mu]$. Hierzu wurden die erhaltenen Flächen entsprechend der Geradengleichung in Konzentrationen zurück überführt und jeweils gemittelt. Die Berechnung der Bias-Werte erfolgte nach Gleichung 4. Als Akzeptanzkriterium wurden Abweichungen innerhalb des Intervalls von $\pm 15\%$ zugelassen.

Berechnungen des arithmetischen Mittels erfolgten über Gl. 7; Berechnungen der Standardabweichung über Gl. 8. Die Berechnung des Variationskoeffizienten erfolgte über Gl. 9. Über Gl. 10 und Gl. 11 wurden die Genauigkeit und Richtigkeit berechnet.

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i \quad \text{Gl. 7 (80)}$$

$$s = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i^2} \quad \text{Gl. 8 (80)}$$

$$CV [\%] = \frac{s}{\bar{x}} \times 100 \quad \text{Gl. 9 (81)}$$

$$\text{Genauigkeit [\%]} = \frac{(MW - \mu) \cdot 100}{\mu} \quad \text{Gl. 10 (15)}$$

$$\text{Richtigkeit} = |MW - \mu| \quad \text{Gl. 11 (15)}$$

3.4.1.2 Entwicklung einer validierten HPLC-Methode bezogen auf die Verunreinigungen des Wirkstoffs

Entsprechend der vorläufigen US-Monographie zu Imiquimod-Creme, wurde ebenfalls eine Validierung der produktionsbedingten Verunreinigungen (Imiquimod Related Compounds) durchgeführt. Hierzu wurden Analysen der Referenzsubstanz, als auch einer Mischung aller fünf Verunreinigungen durchgeführt. Prozessiert wurden die Daten der Linearität, Substanzidentifikation und Präzision. Bei offiziellen Arzneibuchmethoden gewähren die ICH-Guidelines eine Kurzvalidierung mit drei Messkonzentrationen, um die generelle Anwendbarkeit des maschinellen Aufbaus zu überprüfen (78). Im hier gewählten Setup wurden die Verunreinigungen in USP-Qualität einzeln in vier verschiedenen Konzentrationen validiert und als Mischung in einer Konzentration analysiert. Die praktischen Untersuchungen

wurden durch Jonas Pielenhofer (Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie der Johannes Gutenberg-Universität Mainz) durchgeführt.

3.4.1.3 Entwicklung einer validierten HPLC-Methode bezogen auf den Gehalt der verwendeten Konservierungsmittel

Die quantitative Analyse von Methyl- und Propylparaben wurde in Anlehnung an eine von *Imamovic* (82) entwickelte HPLC-Methode zur gleichzeitigen quantitativen Bestimmung verschiedener Parabene durchgeführt. Entsprechend ihrer Konzentration im Endprodukt wurden Verdünnungsreihen sowohl der Einzelstoffe als auch einer Mischung beider PHB-Ester durchgeführt. Die Tabelle 8, Tabelle 9 und Tabelle 10 geben einen Überblick zur durchgeführten Methode. Die Referenzlösungen wurden von der EDQM bezogen.

Sämtliche Messlösungen wurden täglich frisch aus der jeweiligen Stammlösung zubereitet und direkt vermessen. Jede Messkonzentration wurde dreifach vermessen und Mittelwert (Gl. 7), Standardabweichung (Gl. 8) und Variationskoeffizient (CV, Gl. 9) bestimmt. Die Mittelwerte und Standardabweichungen wurden grafisch dargestellt. Der CV sollte unter 15 % liegen. Alle Kurvendiagramme wurden mit der HPLC-Software Borwin gefittet und die Flächen integriert. Die integrierten Flächenwerte wurden in Microsoft Excel übertragen und hier weiter bearbeitet.

Tabelle 8 Verdünnungsreihe der Kalibrierkonzentrationen

Methyl- und Propylparaben wurden parallel in einem Durchlauf bestimmt. Die Quantifizierung der fünf Verunreinigungen fand sowohl separat als auch als Mischung (Mix) der Standards statt. Der Mix enthielt hierbei alle Verunreinigungen zu je gleichen Teilen.

	Imiquimod [ng/ ml]	Verunreinigungen Mix [ng/ ml]	Methylparaben [µg/ ml]	Propylparaben [µg/ ml]
Verdünnung 1	1.791,00	6.000	69,85	62,80
Verdünnung 2	895,50	4.000	34,93	31,40
Verdünnung 3	597,00	2.000	17,46	15,70
Verdünnung 4	298,50	1.000	8,73	7,85
Verdünnung 5	162,82	800	4,37	3,93
Verdünnung 6	85,29	400	2,18	1,96
Verdünnung 7	68,88	-/-	-/-	-/-
Verdünnung 8	35,12	-/-	-/-	-/-

Tabelle 9 Auszug der wichtigsten Analyseparameter aller Analyten
Dargestellt sind Imiquimod, seine Verunreinigungen und die Parabene.

	Imiquimod	Imiquimod Verunreinigungen	Parabene
Quelle der Vorschrift	USP-Pending Monograph Imiquimod-Cream	USP-Pending Monograph Imiquimod-Cream	In Anlehnung an <i>Imamovic et al. (82)</i> HPLC determination of some frequently used parabens in sunscreens
Säule	Zorbax 4,6 mm x 15 cm, 5 µm, L7	Inertsil ODS-3; RP C18; 250 x 4,6; 5 µm	Zorbax 4,6 mm x 15 cm, 5 µm, L7
UV-Detektion (λ) [nm]	254	320	254
Flussrate [ml/ min]	1,5	1,2	1
Injektions-volumen [µl]	20	20	20
Methodenzeit [min]	15	60	10

Tabelle 10 Zusammensetzung der Fließmittel und Diluenten
Die originalen Vorschriften sind der USP-Monographie zu entnehmen. FMA/ B /C = Fließmittel A/ B oder C, q.s. quantum satis.

Vorschrift	Medium	Bestandteil	Menge auf je 1 L
Imiquimod USP	Fließmittel	Heptan-1-sulfonsäure Natriumsalz	2 g
		Acetonitril	250 ml
		Wasser	750 ml
		Phosphorsäure, konz.	q.s. bis pH auf 2,7
		Triethylamin	1,5 ml
	Diluent	Acetonitril	250 ml
		Wasser	750 ml
Imiquimod Impurities USP	Fließmittel	Heptan-1-sulfonsäure Natriumsalz	FMA/ B: 1 g FMC: 0,5 g
		Natriumlaurylsulfat	FMA/ B: 0,8 g FMC: 0,4 g
		Di-Kaliumhydrogenphosphat	FMA/ B: 1 g FMC: 0,5 g
		Acetonitril	FMA: 0,2 L FMB: 0,6 L FMC: 0,75 L
		Wasser	FMA: 0,8 L FMB: 0,4 L FMC: 0,25 L
		Phosphorsäure, konz.	q.s. bis pH auf 6,4
	Diluent	Acetonitril	650 ml
		Wasser	350 ml
		Phosphorsäure, konz.	1 ml
Parabene	Fließmittel	Methanol	600 ml
		Wasser	400 ml
	Diluent	Ethanol	900 ml
		Wasser	100 ml

3.4.1.4 Anwendung der HPLC Methoden auf ImiGEL

Nach Abschluss der Methodenetablierung mithilfe der Standard-Lösungen, wurden diese Arbeitsanweisungen auf das Produkt übertragen. Dementsprechend wurde das Emulsionsgel mithilfe der oben validierten Methoden analysiert. Es wurden sowohl der Gehalt des Wirkstoffes als auch der der Verunreinigungen entsprechend USP-Monographie untersucht. Zur Gehaltsmessung des Wirkstoffes wurde ein Formulierungs-Äquivalent zu 10 mg Wirkstoff (200 mg ImiGEL) in einem 50 ml Messkolben unter Bewegung und Hitze in einer phosphorsauren Acetonitril-Wasser-Mischung gelöst, mithilfe eines 0,45 µm Nylon-Filter filtriert und gegen eine Wirkstoff-Standardlösung (1791 ng/ ml) vermessen. Über die Gl. 12 wurde ein prozentualer Gehalt an Wirkstoff bestimmt, der im Akzeptanzbereich von 90-110 % liegen musste. Ebenso wurde bei den Verunreinigungen verfahren, wobei hier das verwendete Äquivalent mit 20 mg Wirkstoff angegeben wurde. Zusätzlich verrechnet die USP einen vorgegebenen *relative response factor* für die einzelnen Verunreinigungen.

$$Result_{WS} = \frac{r_u}{r_s} \times \frac{c_s}{c_u} \times 100 \quad \text{Gl. 12 (83)}$$

$$Result_{IRC} = \frac{r_u}{r_s} \times \frac{c_s}{c_u} \times \frac{1}{F} \times 100 \quad \text{Gl. 13 (83)}$$

Hierbei stellen r_u = Peakfläche Probe, r_s = Peakfläche Standardlösung, c_s = Konzentration Standardlösung, c_u = Konzentration Probe, F = *relative response factor* dar. Dieser ist für Quinolinol-Analoga (IRC-A) mit 0,80 und für jegliche andere nicht spezifizierte Verunreinigung mit 1,0 definiert (83). IRC-B bis IRC-E wurden nicht definiert.

Zur Bestimmung der Konservierungsmittel-Konzentration wurde 1 g Zubereitung in 100 ml Diluent (EtOH/ Wasser) unter Schütteln aufgelöst und durch einen Nylon-Filter (0,45 µm Porenweite) gegeben. Nach Verwerfen der ersten 3 ml wurde das Filtrat auf die zwei verwendeten Parabene analysiert. Die prozentuale Abweichung wurde durch Vergleich der gefundenen gegen die theoretisch berechnete Menge an Paraben entsprechend Gl. 14 berechnet.

$$Result_{Parabene} = \frac{(Konz_{.soll} - Konz_{.ist})}{Konz_{.soll}} \times 100 \quad \text{Gl. 14 (83)}$$

$Konz_{.soll}$ stellte die berechnete theoretische Konzentration an p-Benzoessäureester dar, während $Konz_{.ist}$ das Analysenergebnis widerspiegelt. Für die Gehaltsmessung der Parabene wurde als Akzeptanzkriterium eine prozentuale Differenz von ≤ 15 % angegeben.

3.4.1.5 Entwicklung einer validierten Reinigung der produktberührenden Teile im Emulsiflex

Nicht zuletzt aufgrund einer vielseitigen Nutzung des Emulsiflex Hochdruckhomogenisators und damit drohenden Kreuzkontaminationen, musste eine Reinigungsvorschrift erstellt werden, die sicherstellte, dass nach beendeter Produktion Imiquimod aus den produktberührenden Leitungssystemen nachweislich und in ausreichendem Maße entfernt werden konnte. Die Reinigung wurde in zwei Phasen unterteilt: Innerhalb der ersten Phase wurde eine kontinuierliche maximale Reinigung angestrebt, um ein sauberes theoretisch werksneues Gerät zu erhalten. Dieser Nullpunkt sollte dann in der Validierungsphase wiederholt erreicht werden. Hierzu wurde der Hochdruckhomogenisator mit einer Charge Imiquimod-Suspension mehrfach verunreinigt.

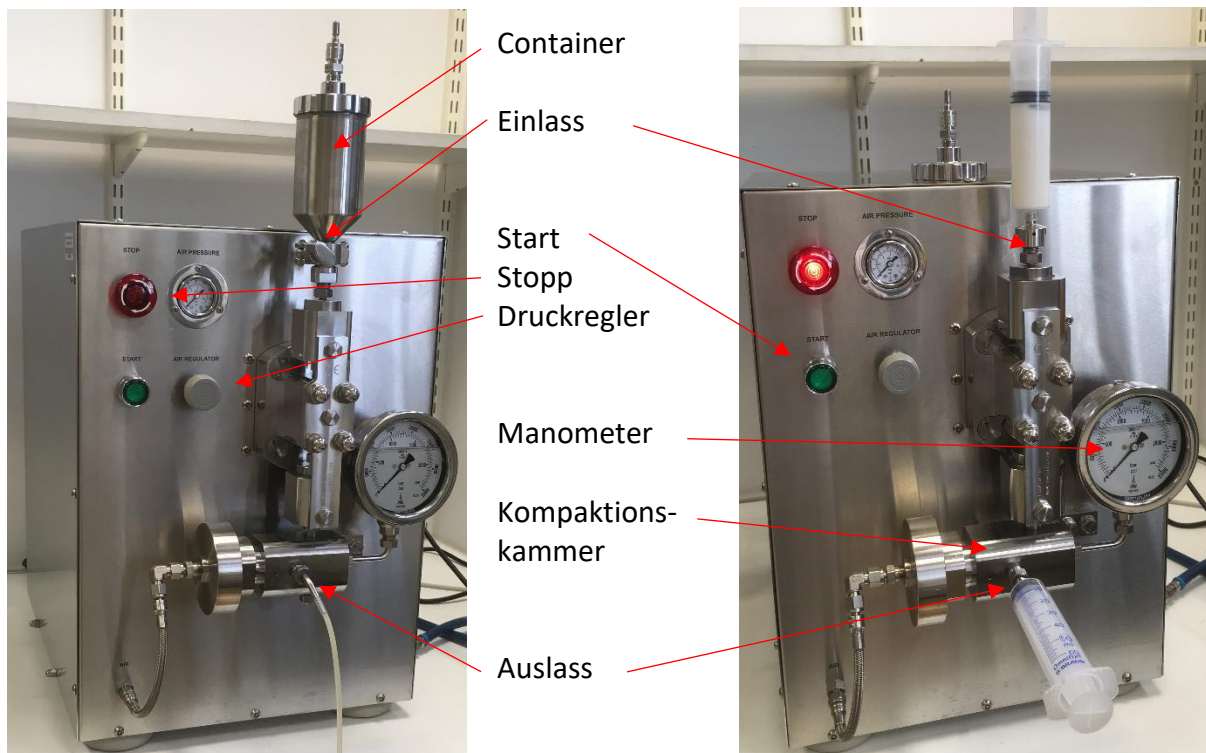


Abbildung 21 Avestin C3-Emulsiflex vor (li.) und während (re.) der Produktion
 Der Container und Auslass werden gegen Luer-Lock-Verbindungsstücke getauscht, um die Blasenspritzen dicht aufsetzen zu können. Nicht abgebildet ist der öl-freie Druckluftkompressor.

Phase I

Tabelle 11 gibt einen Überblick über die systematische Erprobung der als wichtig erachteten Betriebsparameter. Hierzu gehören neben der Anzahl der Waschvorgänge auch das Volumen der Waschlösung, der Einsatz von Druck sowie die Temperatur der Waschflüssigkeiten. Zur groben Säuberung wurden ca. 600 ml Leitungswasser (doppeltes Containervolumen) durch das System geleitet und damit leicht anhaftende Reste ausgespült. Zur Feinsäuberung wurde der Emulsiflex erst mit heißem Leitungswasser (ca. 900 ml, dreifaches Containervolumen, ca. 80 °C) auf Temperatur gebracht, später dann mit erwärmtem Diluent (ca. 50 °C) gereinigt. Aufgrund des enthaltenen Acetonitrils war eine höhere Erwärmung des Diluenten nicht möglich. Über den Druckregler wurde mehrfach ein Druck von mindestens 500 bar auf die Waschlösung aufgebracht und sofort wieder gelöst. Durch diesen Druckwechsel konnten schnell leicht anhaftende Rezepturpakete abgelöst werden. Solange der HDH mit ImiGEL behaftet war, waren weißliche nebelartige „Wolken“ im Auffanggefäß des Auslasses

sichtbar, die zu einer Trübung bzw. Färbung der Waschflüssigkeit führten. Die optische Reinheit wurde also durch Ausbleiben dieser Wolken definiert. Hiernach wurde, um eine quantitative Bestimmung durchzuführen, ein definiertes Volumen an Diluent (USP-Monographie Imiquimod Cream) über zwei Blasenspritzen durch den Homogenisator geführt. Ein Waschdurchgang bestand aus fünf Wiederholungen mit jeweils dem gleichen Medium. Das Volumen und der häufige Wechsel des Waschmediums wurden so gewählt, dass sich jeweils keine gesättigte Lösung bilden konnte. Die Waschmedien wurden daraufhin per HPLC auf Imiquimod analysiert.

Mit Abschluss der Analyse vom dritten Tag wurde der Emulsiflex mit einer wirkstoffhaltigen Mahlsuspension entsprechend Herstellungsanweisung verunreinigt und das oben erwähnte Reinigungsverfahren durchgeführt.

Tabelle 11 Versuchsplan Phase I

Die Waschungen erfolgten kontinuierlich. Je Durchgang wurden fünf Wiederholungen (Wdh.) mit demselben Lösungsmittel durchgeführt. Zusätzlich wurden Einflüsse durch Druck und/ oder Temperatur (s. Text) überprüft. Der Druck wurde durch den Emulsiflex übertragen, der Temperatureinfluss wurde durch Erhitzen der Medien erzeugt. Sofern Temperatur und/ oder Druck in der Tabelle verneint wurden, fand weder eine Druckausübung noch eine Erwärmung des Diluenten statt. Vor den hier aufgeführten Waschungen erfolgt die im Text beschriebene Grobreinigung durch Leitungswasser.

Durchgang	Wdh	Volumen [ml]	Druck	Temperatur	Bedingungen	
A	1	5	20	Nein	Nein	Tag 1: Waschung mit USP-Diluent (Raumtemperatur)
	2	5	10	Nein	Nein	
	3	5	15	Ja	Nein	
	4	5	15	Ja	Nein	
	5	5	20	Ja	Ja	Tag 2: Waschung mit erwärmten Diluent
	6	5	20	Ja	Ja	
	7	5	20	Ja	Ja	
	8	5	20	Ja	Ja	
	9	5	20	Ja	Ja	Tag 3: Kompaktionskammer mit heißem destillierten Wasser auf <i>handwarm</i> vorgewärmt, dann mit erwärmten Diluent gewaschen
	10	5	20	Ja	Ja	
	11	5	20	Ja	Ja	
	12	5	20	Ja	Ja	
B	1	5	20	Nein	Nein	Tag 4: Verunreinigung mit einer Charge Imiquimod-Wasser-Tween-80-Suspension; Spülung mit 2 Container Wasser (kalt); Erwärmung des Emulsiflex mit heißem Aqua bidest., bis Kompaktionskammer <i>handwarm</i> ; Waschung mit Diluent (Raumtemperatur)
	2	5	20	Nein	Nein	
	3	5	20	Nein	Nein	
	4	5	15	Nein	Nein	

Phase II

Die zweite Phase umfasste die nachfolgenden Versuchsreihen C 1-4, D 1-4 und E 1-4. Nach jeweils vier Waschungen wurde das System erneut durch Einspritzen der Mahlsuspension verunreinigt und gereinigt. Der Einfluss von Druck und Temperatur wurde aus den ersten

Versuchen übernommen und für die Reinigung als wichtig eingestuft. Weitere Details sind Tabelle 12 zu entnehmen. Die Waschmedien wurden nach erfolgter Reinigung wieder per HPLC auf Imiquimod analysiert und die Ergebnisse grafisch ausgewertet.

Tabelle 12 Versuchsplan Phase II

Die Waschungen erfolgten diskontinuierlich. Nach je vier Durchgängen wurde eine gezielte Verunreinigung durch Einspritzung der Rezeptur durchgeführt. Die folgende Reinigung wurde wie in Phase I entwickelt und durchgeführt. Das in E 4 verwendete kleinere Volumen stellt einen Durchführungsfehler dar, der bei der Berechnung der Konzentration wieder aufgefangen wurde.

Durchgang	WDH	Volumen [ml]	Druck	Temperatur	Bedingungen	
C	1	5	20	Ja	Ja	Tag 5: Verunreinigung mit einer Charge Imiquimod-Wasser-Tween80-Suspension; Spülung mit 2 Container Wasser (kalt); Erwärmung des Emulsiflex mit heißem Aqua bidest., bis Kompaktionskammer handwarm; Waschung mit erwärmten Diluent
	2	5	20	Ja	Ja	
	3	5	20	Ja	Ja	
	4	5	20	Ja	Ja	
D	1	5	20	Ja	Ja	Tag 6: Verunreinigung mit einer Charge Imiquimod-Wasser-Tween80-Suspension; Spülung mit 2 Container Wasser (kalt); Erwärmung des Emulsiflex mit heißem Aqua bidest., bis Kompaktionskammer handwarm; Waschung mit erwärmten Diluent
	2	5	20	Ja	Ja	
	3	5	20	Ja	Ja	
	4	5	20	Ja	Ja	
E	1	5	20	Ja	Ja	Tag 7: Verunreinigung mit einer Charge Imiquimod-Wasser-Tween80-Suspension; Spülung mit 2 Container Wasser (kalt); Erwärmung des Emulsiflex mit heißem Aqua bidest., bis Kompaktionskammer handwarm; Waschung mit erwärmten Diluent
	2	5	20	Ja	Ja	
	3	5	20	Ja	Ja	
	4	5	15	Ja	Ja	

3.4.1.6 Charakterisierung und toxikologische Einschätzung des Abriebs der Mahlwerkzeuge

Die Verwendung von Mühlen, hier insbesondere von Kugelmühlen, geht immer mit einem Abrieb der Mahlwerkzeuge einher. Um eine Abschätzung des toxikologischen Risikos zu ermöglichen, wurden das Ausmaß und der toxikologische Einfluss des Abriebs untersucht.

Auch diese Analyse gliederte sich in zwei Versuchsphasen. Im ersten Versuchsteil wurden die Zirkoniumoxid-Kugeln nur mit Wasser vermahlen. Die gravimetrische Bestimmung umfasste sowohl die Kugeln als auch den Mahlbecher und –deckel. Im zweiten Teil wurde die Wirkstoff suspension entsprechend der Herstellungsanweisung vermahlen. Aufgrund des geringen Abriebs wurden die Messungen vierfach im wässrigen Medium und achtfach im wirkstoffhaltigen Medium durchgeführt. Zur Durchführung wurden jeweils die Kugeln vor dem Mahlen eingewogen, zur Mahlung verwendet und von der Flüssigkeit bzw. der Suspension durch eine neu eingeführte Glasnutsche abgetrennt. Folgend im Trockenofen bei 35 °C getrocknet und nach Erkalten wieder gewogen. Die Differenz beider Wägungen ergab den Abrieb, welcher in Prozent angegeben wurde. Das Mahlprogramm wurde identisch zu den Angaben der Herstellungsanweisung von ImiGEL durchgeführt; 650 rpm, 7 x 20 min Mahlung, 6 x 10 min Pause um einer Überhitzung des Produktes vorzubeugen. Somit wurde das Material insgesamt 140 Minuten pro Mahlvorgang gestresst.

3.4.2 Biopharmazeutische Entwicklung von ImiGEL

ImiGEL wurde innerhalb der biopharmazeutischen Untersuchungen auf sein Penetrationsvermögen in verschiedenen Hautmodellen getestet. Während im Maus-Modell sowohl lebendige als auch tote Haut betrachtet wurde, konnte beim Test am Schweineohr nur auf totes Gewebe zurückgegriffen werden. Des Weiteren wurden Stabilitätsuntersuchungen aus der geschlossenen wie geöffneten Tube zu verschiedenen Zeitpunkten durchgeführt. Hierbei wurde neben der chemischen Indifferenz, vor allem die mikrobielle Resistenz untersucht.

3.4.2.1 Penetrationsversuche in Maus- und Schweinehaut

ImiGEL wurde im Rahmen von in-vivo-Penetrationsversuchen verwendet, um eine prädiktive Aussage über ein späteres Verhalten der Formulierung innerhalb klinischer Studien am Menschen zu treffen. Hierzu wurden verschiedene Haut-Modelle verwendet, die sowohl modellabhängig, als auch rezepturabhängig miteinander verglichen wurden. Die Versuche untergliederten sich hierbei in Tesafilm® Strip-Abrisse und Kryogen-Schnitte, deren Wirkstoffkonzentration mittels HPLC vermessen wurde. Als Extraktionsmedium diente ein Essigsäure-Acetatpuffer-Ethanol-Gemisch (pH-Wert 3,6 / Verhältnis 7:3). Die Wirkstoffquantifizierung erfolgte in der HPLC über eine PerfectSil-Säule (RP-C8, 4,6 x 250 mm, 5 µm). Eine Vorsäule wurde nicht installiert. Das Fließmittel enthielt 0,0125 % Trifluoressigsäure und Acetonitril im Verhältnis 7:3 (pH 2,9). Die Fotografien der Schnitte dienten der Überprüfung der Praktikabilität des Versuchs generell und zur Kontrolle des Fortschritts der Zellablösung auf der Haut. Vorangegangene Untersuchungen von *Gogoll* (59) hatten bereits Daten zum Franz-Zell-Modell geliefert und damit Permeationsdaten der Zubereitungen behandelt. Die hier beschriebenen Versuche können dementsprechend als Fortführung verstanden werden. Die praktischen sowie analytischen Arbeiten mit Maushaut und Schweineohr wurden von *Alexander Solimann* von der Abteilung Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie der Johannes Gutenberg-Universität Mainz durchgeführt.

Hautmodell Mäusrücken

Die verwendeten Mäuse wurden einen Tag vor Auftragung der Formulierung im Rückenbereich vollständig rasiert. Durch den zeitlichen Abstand zum Versuchstag konnte sich die eventuell verletzte Haut rehabilitieren und eine intakte Hautbarriere zum Beginn der Testreihe gewährleistet werden. Die Versuchstiere wurden vor Auftragung der Formulierungen mit einer Mischung aus Ketamin und Rompun narkotisiert (43). Anschließend wurde mit einem Marker ein rechteckiges Behandlungsfeld von 6 cm² auf den Rücken eingezeichnet (s. Abbildung 22). Auf diese Flächen wurden mit der Fingerspitze 50 mg Aldara® respektive ImiGEL (entsprechend 416,67 µg/cm² Imiquimod) gleichmäßig einmassiert, bis die Formulierungen als transparenter Überschuss auf der Hautoberfläche sichtbar wurden.

Zu den Zeitpunkten 10 min, 60 min und 180 min nach Auftragung der Formulierung wurden die Mäuse durch CO₂-Einströmung getötet und die Formulierungsüberschüsse mit Watte abgenommen. Die folgenden Untersuchungen wurden nach der Euthanasie durchgeführt. Hierbei wurde die komplette rechteckige Fläche mit insgesamt 15 Tesafilm®-Streifen überdeckt, mit einem Andruckroller (30 mm Breite aus Gummi) gleichmäßig aufgedrückt und anschließend von der Haut abgezogen. Die Tesafilm®-Abrisse wurden folgend durch ein mit Glasperlen gefülltes Becherglas gezogen, um ein Verkleben der Filme untereinander zu verhindern. Für die Extraktion wurden die Klebstreifen, wie auch die Watte, daraufhin in 100 ml Braunglasflaschen verschlossen, mit Medium (Acetatpuffer pH 3,6/ Ethanol im Verhältnis

7:3) übergossen und über 24 Stunden bei Raumtemperatur dauerhaft geschüttelt. Das Medium wurde folgend auf Gehalt per HPLC untersucht. Der verbleibende Hautrest des Versuchstieres wurde entsprechend der markierten Fläche exzidiert und nach Kryogenisierung teils zur Extraktion, teils zur histologischen Kontrolle (vollständige Entfernung des *Stratum corneum*, SC) verwendet. Die erhaltenen histologischen Prüfmuster wurden auf der Schnellgefrierplatte des Mikrotoms mit der Hautoberfläche nach unten eingefroren. Nach Einbettung in einem Kryo-Mold mit Kryo-Medium, konnten 25 µm dicke Gefrierschnitte angefertigt werden. Die parallel zur Hautoberfläche geführten Schnitte wurden der Extraktion zugeführt. Die senkrecht geführten Schnitte wurden folgend mit Hämalaun-Eosin-Lösung eingefärbt, um die einzelnen Hautschichten sichtbar zu machen. Eine Fotodokumentation wurde angefertigt (s. Abbildung 33 und Abbildung 34).



Abbildung 22 Vorbereitung einer Maus für die Behandlung
Auf dem rasierten Rücken wird eine Fläche von 6 cm² markiert. Nach Euthanasie der Maus wird die Haut exzidiert und Kryogen-Schnitte angefertigt sowie auf Gehalt an Imiquimod geprüft.

Die Extraktionsversuche an den Mäusen wurden in drei Phasen untergliedert. In ersten Vorversuchen wurde die Extraktion des Wirkstoffs aus Watte und die Feststellung der benötigten Anzahl an Tesafilm®-Abrissen, um das SC abzulösen, überprüft. Nachdem eine generelle Praktikabilität gewährleistet werden konnte, stellten die Wiederfindungsrate des Wirkstoffes und der Einfluss lebendiger gegenüber toter Haut die Schwerpunkte der zweiten und dritten Phase der Untersuchungen dar. Die Methodik der Extraktion aus dem Gewebe war identisch zum Verfahren mit den Tesafilm®-Streifen (Acetatpuffer pH 3,6/ Ethanol im Verhältnis 7:3).

Hautmodell Schweineohr

Als Surrogat für Humanhaut wurde das Schweineohr-Modell gewählt. Grundlage für diese Auswahl war neben der leichteren Verfügbarkeit und der großen histologischen Ähnlichkeit auch die geringere Neigung zur Kontraktion der follikulären Öffnungen. Letzteres liegt darin begründet, dass die Schweinehaut des Ohres auf einer Knorpelschicht fest aufliegt, sodass die Haut auch nach einer Euthanasie und Abtrennung vom Schweinekörper in ihrer natürlichen Ausdehnung für die Penetrationsuntersuchungen erhalten bleibt (84; 58; 85). Das Schweinehautmodell eignet sich hierdurch insbesondere auch zur Betrachtung des follikulären Penetrationsweges. Die Untersuchungen der Penetration am Schweineohr wurden größtenteils analog zur Durchführung an der Maushaut durchgeführt. Es wurden je Formulierung und je Zeitpunkt (1 Stunde, 3 Stunden und 5 Stunden) drei Flächen á 6 cm² auf

der Rückseite desselben Schweineohres markiert (s. Abbildung 23). Die verwendeten Ohren stammten vom deutschen Hausschwein und wurden ungebrüht samt Ohrmuschel bezogen. Die Schweineohren wurden vor Auftragung der jeweiligen Formulierung und während der weiteren Versuchszeit im Brutschrank auf 32 °C temperiert und hier zur Vermeidung von Austrocknung in eine Plastikbox gelegt. Es wurden 30 Tesafilm®-Abrisse zu den oben erwähnten Zeitpunkten genommen und in drei Fraktionen aufgeteilt (1-10; 11-20; 21-30). Die Haut wurde ebenfalls exzidiert und zur Erstellung von Tiefenprofilen, zur Kontrolle des *Stratum corneums* sowie für eine direkte Extraktion aus dem Hautstück verwendet. Für die Erstellung von Penetrationstiefenprofilen wurde mit einer Lochstanze (Durchmesser 12 mm), aus dem nach Exzidierung erhaltenen Hautrest, ein kleineres Hautstück ausgestanzt. Dieses wurde anschließend auf der Schnellgefrierplatte des Mikrotoms mit der Hautoberfläche nach unten eingefroren und unter Verwendung eines Kryo-Molds in Kryomedium eingebettet. Anschließend wurden 25 µm dicke Gefrierschnitte bis zu einer Tiefe von 750 µm oberflächenparallel angefertigt. Hierbei wurden jeweils zehn Gefrierschnitte zu einer Fraktion für die Extraktion zusammengeführt. Die Extraktion erfolgte für alle Fraktionen über 24 Stunden bei Raumtemperatur unter dauerhaftem Schütteln. Die Arzneistoffquantifizierung erfolgte identisch zu den Mausversuchen aus dem Medium. Ebenfalls identisch zur Maus wurden senkrechte Schnitte zur Bildgebung mit Hämalaun-Eosin-Lösung eingefärbt, siehe Abbildung 43.

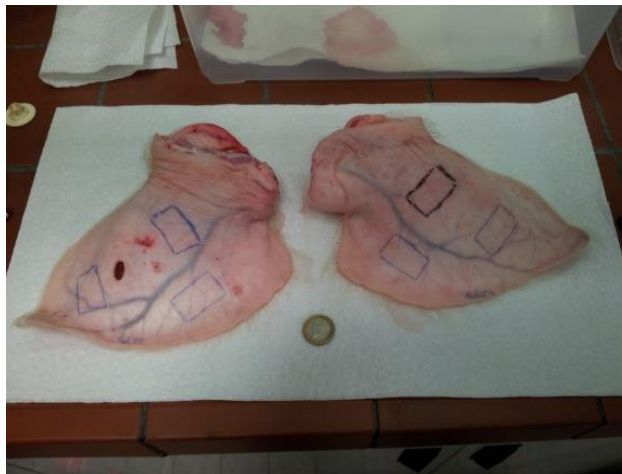


Abbildung 23 Versuchsaufbau Penetration am Schweineohr
Die Ohren sind ungebrüht und mit drei Feldern á 6 cm² markiert. Nach Auftragung der Formulierungen werden Hautschnitte und Tesa®-Strips angefertigt.

3.4.2.2 Überprüfung der chemischen und mikrobiologischen Stabilität

Die sichere Verwendung eines Arzneimittels macht es notwendig, Informationen über dessen chemische sowie mikrobiologische Stabilität zu besitzen. Hierzu gibt die Ph.Eur. verschiedene Vorgaben bezüglich Humidität und Temperatur. Entsprechend der Einteilung nach Klimazonen und der Art des Stresses des Arzneimittels, wurde für ImiGEL *Intermediate*-Parameter festgelegt (30 °C/ 65 % relative Feuchte). Die spätere Lagerung und Anwendung während der geplanten klinischen Studie soll bei Raumtemperatur erfolgen. Um zusätzlich zur veranschlagten Anwendungszeit (vier Wochen) die Lagerzeiten ab Produktion bis Freigabe mit abdecken zu können, wurde eine Überprüfungsphase kongruent zur ICH von sechs Monaten festgelegt. Innerhalb dieses Zeitraumes sollten deshalb die chemische und mikrobielle Stabilität überprüft werden. Aufgrund der Primärverpackung (Aluminiumtube) konnte der Einfluss der Luftfeuchtigkeit ausgeschlossen werden, so dass eine definierte Lagerung im

Trockenofen als ausreichend angesehen wurde. Die fachgerechte Überprüfung der Mikrobiologie fand bei BioChem - Labor für biologische und chemische Analytik GmbH in Karlsruhe statt. Überprüft wurde die vorhandene Keimbelastung sowie die Abwesenheit der Keime *Pseudomonas aeruginosa* und *Staphylococcus aureus* über die beschriebenen Prüfungen 2.6.12 und 2.6.13 der Ph.Eur.

Die Gehaltsmessungen wurden in der Abteilung Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie der JGU in Mainz durchgeführt und wurden entsprechend den Anforderungen der aktuellen USP-Pending-Monographie für „Imiquimod Cream“ bewertet. Die jeweilige Testung erfolgte aus der geschlossenen Tube.

3.4.2.3 Überprüfung der mikrobiellen Stabilität nach Anbruch

Zur Überprüfung der angebrochenen Tuben auf ausreichende Konservierung nach Ph.Eur. 5.1.3, wurden Chargen mit verschiedenen Konzentrationen an Konservierungsmitteln hergestellt. Zusätzlich zur originalen Paraben-Gesamtkonzentration von 0,04 % bezogen auf die gesamte Zubereitung, wurden Formulierungen mit 0,07 %, 0,1 % und 0,15 % Konservierungsmittel bei BioChem GmbH untersucht. Je Konservierungsmittelkonzentration wurde ein Blindwert direkt nach Herstellung auf mikrobielle Kontamination aus der Produktion analysiert.

Innerhalb der folgenden vier Wochen wurden den Tuben je dreimal pro Woche 250 mg Creme entnommen und verworfen. Dieses Vorgehen simulierte eine Entnahme durch den Patienten. Die Lagerung zwischen den Entnahmen fand unter *Intermediate*-Konditionen (s.o.) statt.

Die Prüfvorschrift 5.1.3 des Ph.Eur. schreibt eine Beimpfung der Zubereitung mit mindestens *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *Candida albicans* und *Aspergillus brasiliensis* und deren Bebrütung bei gegebenen Temperaturen vor. Nach vier Wochen (28 Tagen) erfolgt eine Keimzählung, wobei eine Keimreduktion obligatorisch ist (38).

Nach Prüfung der Ergebnisse des Konservierungsmittelbelastungstests wurde eine Feststellung der mikrobiellen Kontamination nach Anbruch über zwei Wochen von behördlicher Seite aus gefordert. Diesem Wunsch wurde nachgekommen und entsprechend der Langzeitstudie drei Chargen auf mikrobiellen Befall nach Anbruch zu den Zeitpunkten T_0 , $T_{1\text{Woche}}$ und $T_{2\text{Wochen}}$ geprüft. Den Tuben wurde entsprechend geplante Medikationsplan dreimal wöchentlich eine Masse von 250 mg entnommen. Die Auszählung und Bestimmung der Keime wurde bei BioChem GmbH nach Ph.Eur.-Vorschrift 2.6.12 und 2.6.13 durchgeführt. Diese Vorschriften fordern die Bestimmung der Gesamtkeimzahl (TAMC), die Bestimmung der Anzahl von Hefen und Schimmelpilzen (TYMC), sowie eine Prüfung auf Abwesenheit von *P.aeruginosa* und *S.aureus*.

3.4.3 Technologische Entwicklung von ImiSOL

Die Resorption des Wirkstoffes über die Haut in ungelöster Form ist sowohl stark von der Lipophase als auch von dessen Partikelgröße abhängig. Hierbei erzielte ImiGEL mit Wirkstoffpartikeln von $400 \text{ nm} \pm 200 \text{ nm}$ Größe und Jojobaöl eine sehr langsame Permeation durch die Haut, während ImiSOL mit $600 \text{ nm} \pm 200 \text{ nm}$ und Squalen als Lipophase mittlere Aufnahmezeiten erreichte. Die schnellste Permeation zeigte Aldara® mit gelöst vorliegendem Wirkstoff. Ausgehend von einem schnelleren Anfluten des Wirkstoffes im Zielgewebe könnte eine stärkere Wirkung abgeleitet werden. Allerdings verursachte ImiSOL trotz mittlerer Geschwindigkeit eine signifikant höhere Abwehrstimulierung im Vergleich zu den beiden anderen Zubereitungen (60). Dementsprechend war es wichtig innerhalb des Herstellungsprozesses die Partikelgrößen zu analysieren. Die Untersuchung wurde per DLS

und NTA vergleichend für verschiedene Konzentrationen und Partikelgrößen durchgeführt. Hierzu wurde eine Imiquimod-Suspension hergestellt und entlang des Workflows (s. 2.4.3) mit ihren unterschiedlichen Korngrößen vermessen. Es wurden die Korngrößen im Rohzustand, nach dem Mahlen und nach Hochdruckhomogenisation ermittelt und mithilfe zweier Messmethoden verglichen. Der Zetasizer (DLS) gab zusätzlich zur Korngröße, im Gegensatz zum NTA, einen Polydispersitätsindex an. Aufgrund der Messmethoden war eine Zugabe der Lipophase nicht möglich, sodass nur die wässrigen Suspensionen vermessen werden konnten. Die Konzentrationen wurden empirisch auf 1 mg/ml, 0,3 mg/ml, 0,1 mg/ml und 0,05 mg/ml festgelegt.

3.4.4 Biopharmazeutische Entwicklung von ImiSOL

Bezüglich der biopharmazeutischen Charakterisierung von ImiSOL wurden zwei verschiedene präklinische Testmodelle zur Wirkstoff-Penetration verwendet und verglichen. Es wurde untersucht ob eine prädiktive Aussage zu in-vivo-Versuchen anhand der hier gewählten Tiermodelle (Maus und Rindereuter) möglich ist. Die praktischen Arbeiten zur Maus wurden von *Alexander Solimann* (Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie der JGU Mainz), die Versuche zum Euter-Modell von *Prof. Dr. Kietzmann* und seinem Arbeitskreis an der Tierärztlichen Hochschule Hannover durchgeführt.

Maus

Im vergleichenden Experiment von Aldara® und ImiSOL wurde wie oben beschrieben (siehe (bio-)pharmazeutische Komponente von ImiGEL), Rückenhaut der Maus verwendet. Das experimentelle Vorgehen ist identisch zu dem vorherig benannten.

Rindereuter

Die Verwendung des Rindereuters als prädiktives Hautmodell zur Anwendung der hier beschriebenen Imiquimod-Zubereitungen am Menschen, besitzt gewisse Grenzen. Morphologie bzw. Penetrationspotenzial des Euters entspricht der menschlichen Rückenhaut aber nicht der üblichen Impfstellen am Oberarm oder Oberschenkel. Bei den durchgeführten Vorversuchen stand allerdings neben der generellen Umsetzbarkeit der Penetrationsversuche und der analytischen Auswertung der Wirkstoffkonzentrationen zusätzlich ein weiterer Faktor im Vordergrund. Die natürliche, lebensfähige Säugetierhaut bietet die Möglichkeit, die zelluläre, irritative Reaktion nach Penetration von Chemikalien expositionsabhängig (Dauer und Stärke) zu untersuchen. Der Schwerpunkt der Vorhersage des Modells ist auf die akute und chronische Reaktion fokussiert, d.h. welcher Grad der Hautverträglichkeit nach einmaligem oder wiederholtem Kontakt zu erwarten ist. Nach Abnahme des Euters wurde dieser mit Tyrode (86) (Elektrolyt- und Glukose-Lösung) gleichzeitig perfundiert und über drei Stunden am Leben gehalten. Eine 25 cm² große Fläche wurde jeweils auf der rechten wie linken Seite eingezeichnet und mit 250mg Zubereitung behandelt. Jeweils zehn Tesafilm®-Strip-Abrisse und jeweils elf Kryogen-Schnitte wurden zu den Zeitpunkten 2,5 Stunden und 5 Stunden je Seite angefertigt. Die Schnitte wurden parallel zur Hautoberfläche horizontal in 20 µm Stärke angefertigt, nachdem eine 10 mm Biopsiestanze angefertigt wurde. Zusätzlich wurde pro Zeitpunkt eine Kontrollmessung, d.h. eine unbehandelte Hautstelle, analysiert.

4 Ergebnisse

Beginnend bei den analytischen Untersuchungen zu ImiGEL werden die technologischen und im Folgenden die biopharmazeutischen Erkenntnisse dargestellt. Weiterführend werden die Untersuchungen an der gefriergetrockneten Formulierung ImiSOL in gleicher Art präsentiert.

4.1. HPLC Validierung

Das Ergebnis der Flüssigchromatographie war der Nachweis der effizienten und reproduzierbaren Durchführung von Substanzbestimmungen im qualitativen wie quantitativen Sinne. Hierzu wurde das System auf Identität, Linearität, Richtigkeit und Präzision analysiert und validiert. Alle Prüfungen konnten erfolgreich beendet und damit die Methoden in Prozessverfahren und Produktspezifikationen implementiert werden.

4.1.1 Analytik Imiquimod

Substanzidentifizierung

Entsprechend der in der USP beschriebenen Methode war, mit den gegebenen Gerätschaften, die Registrierung und Zuordnung des Signals zum Wirkstoff für alle Konzentrationen möglich. Beispielhaft soll in Tabelle 13 und Abbildung 24 das Ergebnis der höchsten validierten Konzentration dargestellt werden. Die Kalibriergerade wurde aus dem offiziellen Imiquimod-Standard-Material der USP vermessen. Das Diagramm wurde mit der Borwin-Integrator-Software erzeugt.

Tabelle 13 Auswertung der HPLC-Analyse mithilfe der Borwin Integrations Software.

Test-Substanz	c [$\mu\text{g}/\text{ml}$]	RT [min]	Area [$\mu\text{V}\cdot\text{s}$]
Imiquimod	1,791	12	113431

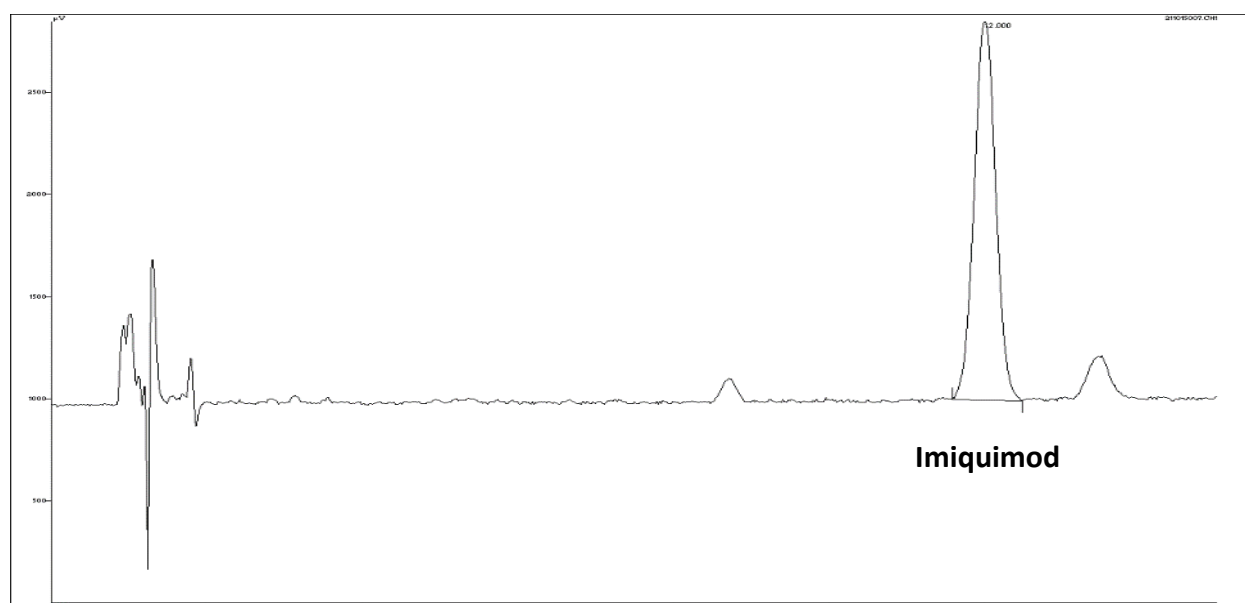


Abbildung 24 UV/VIS-Kurvendiagramm von Imiquimod

Der Stoff eluiert bei zwölf Minuten. Für die Methode siehe Kapitel 3.4.1. Die vermessenen Lösungen wurden am Tag der Messung frisch hergestellt. Die zwei weiteren Peaks sind nicht weiter definiert, waren aber auch im Blindwert, d.h. im reinen Fließmittel zu sehen, sodass hier auf eine Verunreinigung des USP-Diluents zu schließen ist.

Linearität

Zur Überprüfung der Linearität wurden die Konzentrationen 35 ng/ ml bis 1791 ng/ ml neunfach vermessen, Mittelwert, Standardabweichung und CV bestimmt. Die gemittelte Auswertung ist in Tabelle 14 und Abbildung 25 einzusehen, die Messwerte der einzelnen Serien sind im Anhang 12.1 eingefügt.

Tabelle 14 Gemittelte Flächen der Absorptionskurven von Imiquimod der Serien A-C.

Konz [ng/ ml]	MW der Flächen der Serien A-C
35,12	2369,56
68,88	4532,56
85,29	5415,89
162,82	9910,89
298,5	18198,56
597	35601,44
895,5	53380,78
1791	114843,67

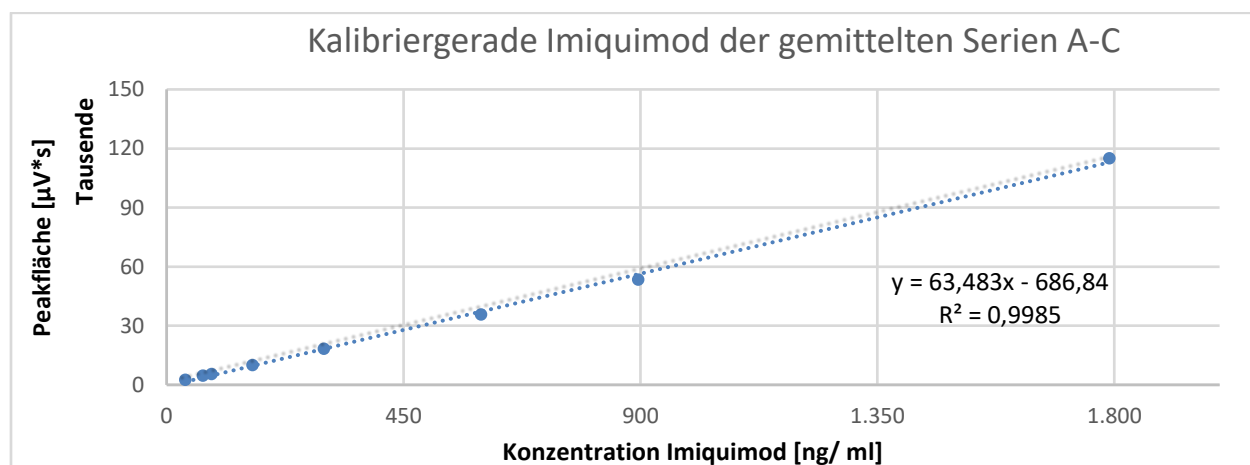


Abbildung 25 HPLC-Kalibriergerade Imiquimod

Die Analytik folgt der USP-Methode im Konzentrationsbereich zwischen 35 und 1800 ng/ ml. Die Geradengleichung wurde für alle Konzentrationsberechnungen der HPLC-Methodik verwendet.

Präzision

Die Präzision wurde durch insgesamt neun Messungen bestimmt und die Ergebnisse innerhalb eines Tages (Intraday) und zwischen drei Versuchstagen (Interday) verglichen. In Tabelle 13 und Tabelle 14 sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der Peakflächen für Imiquimod über dessen Kalibrierkonzentrationen aufgeführt. Entsprechend der Vorgabe von $CV \leq 10\%$, kann für jede Konzentration von einer sehr präzisen Messung ausgegangen werden. Die tatsächlichen Abweichungen variierten innerhalb eines Messtages zwischen 0,86 % und 7,71 %; zwischen den einzelnen Tagen war die Spanne der Abweichungen mit 0,07 – 5,94 % noch geringer. Zur Einsicht der vollständigen Daten siehe Anlage 12.1.

Tabelle 15 Vergleich der Variationskoeffizienten Intraday

Auf Basis der Berechnungen aus Mittelwert und Standardabweichung innerhalb eines Messtages (vgl. Gl. 7, Gl. 8 und Gl. 9). Entsprechend der Vorgabe von $CV \leq 10\%$ wurde diese Prüfung bestanden.

Intraday			
Konz [ng/ ml]	CV [%] Tag A	CV [%] Tag B	CV [%] Tag C
35,12	6,62	7,71	3,20
68,88	4,16	0,86	4,57
85,29	6,97	6,77	5,92
162,82	5,78	4,05	4,16
298,50	2,80	4,20	3,31
597,00	2,47	2,99	2,93
895,50	1,44	3,22	1,48
1791,00	2,07	7,23	3,83

Tabelle 16 Berechnung der Messwertstreuung zwischen den Versuchstagen

Hierzu wurden die gemittelten Flächen und Standardabweichungen prozessiert. Auch hier liegen die Variationskoeffizienten unter der 10 %-Vorgabe.

Interday			
Konz [ng/ ml]	MW Flächen A-C	MW StAW	CV [%]
35,12	2369,56	140,68	5,94
68,88	4532,56	3,36	0,07
85,29	5415,89	56,13	1,04
162,82	9910,89	392,21	3,96
298,50	18198,56	991,72	5,45
597,00	35601,44	350,31	0,98
895,50	53380,78	2145,18	4,02
1791,00	114843,67	1384,09	1,21

Wurde in der vorangegangenen Prüfung die Streuung der Ergebnisse um einen beliebigen Wert behandelt, überprüft die Richtigkeit die Abweichung eines Ergebnisses zum wahren Wert. Die Kongruenz der ermittelten Konzentrationen und der Sollwerte sind in Tabelle 17 dargestellt. Die Berechnung der Richtigkeit erfolgte mit Hilfe der Gl. 11. Die Berechnung der Genauigkeit erfolgte über Gl. 10 (15). Zur Einsicht der vollständigen Daten wird auf Anlage 12.1 verwiesen.

Tabelle 17 Berechnung der Richtigkeit und Genauigkeit

Über den kalibrierten Messbereich von Imiquimod Reinsubstanz liegen die Konzentrationen 35,12 ng/ ml und 68,88 ng/ ml weit oberhalb der Akzeptanzgrenze. Im Anhang 12.1 (Tabelle 38) sind die Grunddaten dargestellt, die für diese Berechnungen herangezogen wurden.

Konzentration Imiquimod (Soll-Wert) [ng/ ml]	MW Ist-Wert [ng/ ml]	Richtigkeit [ng/ ml]	Genauigkeit [%]
35,12	48,021	12,90	36,735
68,88	82,146	13,27	19,260
85,29	96,090	10,8	12,663
162,82	166,922	4,10	2,519
298,5	297,354	-1,15	-0,384
597	571,869	-25,13	-4,210
895,5	852,089	-43,41	-4,848
1791	1819,631	28,63	1,599

Aufgrund des Nichtbestehens der Akzeptanzkriterien von $\pm 15\%$ der kleinsten Konzentrationen, wurde eine zweite Berechnung der Genauigkeit durchgeführt (siehe Tabelle 18). In dieser zweiten Betrachtung wurde der Kalibrierbereich verkleinert und die beiden höchsten Konzentrationen nicht mit einbezogen. Hierdurch verbessert sich die Treffgenauigkeit über den gesamten Messbereich deutlich. Selbst die eigentlich ausgeschlossenen Werte zeigen eine Übereinstimmung von unter 10 %. Dementsprechend sollte für weitere Gehaltsbestimmungen nur noch die Gleichung der „kleinen“ Kalibriergerade verwendet werden, sofern der erwartete Wirkstoffgehalt innerhalb der hier getesteten Konzentrationen liegt. Eine untere Detektionsgrenze (Limit of Detection, LOD) wurde nicht definiert, lag aber bei ca. 5 ng/ ml (Daten zu LOQ und LOD nicht gezeigt).

Bei weiteren experimentellen Versuchen mit Konzentrationen unter 35 ng/ ml (~ 20 ng/ ml) stiegen die Variationskoeffizienten über die selbst gewählten Akzeptanzgrenzen hinaus. Gleiches gilt für Konzentrationen weit über 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Gemessene Lösungen mit 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ konnten die Versuchsphase nicht überstehen. Die Linearität wurde somit im Bereich 35-1791 ng/ ml mit einem sehr guten Regressionsfaktor (0,999) nachgewiesen. Die späteren Gehaltsbestimmungen aus ImiGEL wurden nach einem Cremeschmelzverfahren in diesen validierten Bereich verdünnt und vermessen.

Insgesamt konnte die Validierung auf der Jasco HPLC-Anlage erfolgreich abgeschlossen werden. Sämtliche Parameter lagen innerhalb der Akzeptanzkriterien. Die Identifizierung des Wirkstoffes konnte über sämtliche hier angegebenen Konzentrationen erfolgen. Die in Abbildung 24 dargestellte Kurve zeigt drei Peaks. Während der erste und dritte Ausschlag ($\sim 8:30$ min und $\sim 13:30$ min) undefinierte Fremdstoffe aus dem Fließmittel (Blindwert positiv) darstellen, konnte die Fläche des Peaks bei 12 min zur Konzentrationsberechnung von Imiquimod herangezogen werden. Je nach Fließmittelzusammensetzung zeigte sich das Phänomen des leichten Tailings bzw. leichten Frontings, ohne die ordnungsgemäße Flächenberechnung zu beeinträchtigen. Die Retentionszeit variierte mit Wechsel des Fließmittels leicht.

Tabelle 18 Zweite Kalibriergerade Imiquimod Reinsubstanz

Die Abweichungen werden unter Nichtbeachtung der zwei höchsten Konzentrationen 895,5 ng/ ml und 1791 ng/ ml im Vergleich zu Tabelle 17 insgesamt kleiner. Von den aufgeführten Werten werden die selbstgesteckten Kriterien erfüllt.

Konzentration Imiquimod (Soll-Wert) [ng/ ml]	MW Ist-Wert [ng/ ml]	Richtigkeit [ng/ ml]	Genauigkeit [%]
35,12	33,614	-1,51	-4,288
68,88	70,263	1,38	2,007
85,29	85,174	-0,12	-0,136
162,82	161,299	-1,52	-0,934
298,5	301,301	2,80	0,939
597	595,961	-1,04	-0,174
Geradengleichung der Trendlinie	$y = 1x - 2e^{-5}$		
Bestimmtheitsmaß	$R^2 = 0,9999$		

4.1.2 Analytik Imiquimod Verunreinigungen

Substanzidentifikation

Die grafische Darstellung der fünf USP-monographierten Verunreinigungen erfolgte sowohl simultan (Mix) als auch in separaten Einzelmessungen, um eine eindeutige Zuordnung vornehmen zu können. Abbildung 26 zeigt die Auswertung aller herstellungsbedingten Imiquimod related compounds (IRC's) über ein Chromatogramm von 65 min. Während die gemittelten Retentionszeiten sowie die Flächeninhalte der Einzelstoffe Tabelle 19 zu entnehmen sind, können die gemittelten Daten der Mischung in Tabelle 20 eingesehen werden.

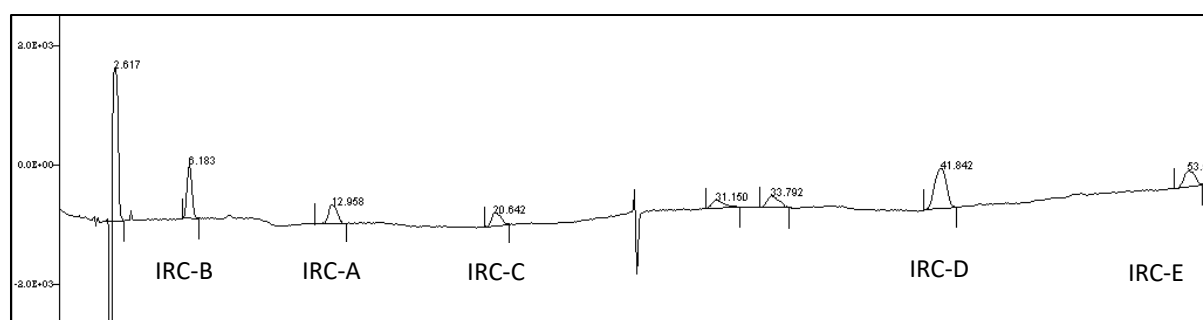


Abbildung 26 Ausschnitt des Chromatogramms der monographierten Verunreinigungen

Die HPLC-Retentionszeiten werden wie folgt angegeben: IRC-B 6,18 min, IRC-A 12,96 min, IRC-C 20,66 min, IRC-D 41,84 min und IRC-E 53,58 min. Die Peaks zwischen 30-34 Minuten sind Verunreinigungen des Fließmittels.

Linearität

Die Linearität der sechsfach vermessenen Konzentrationen konnte im Bereich von 0,4-6 µg/ ml für die jeweilige einzelne Verunreinigung mit entsprechendem Regressionsfaktor von 1 nachgewiesen werden.

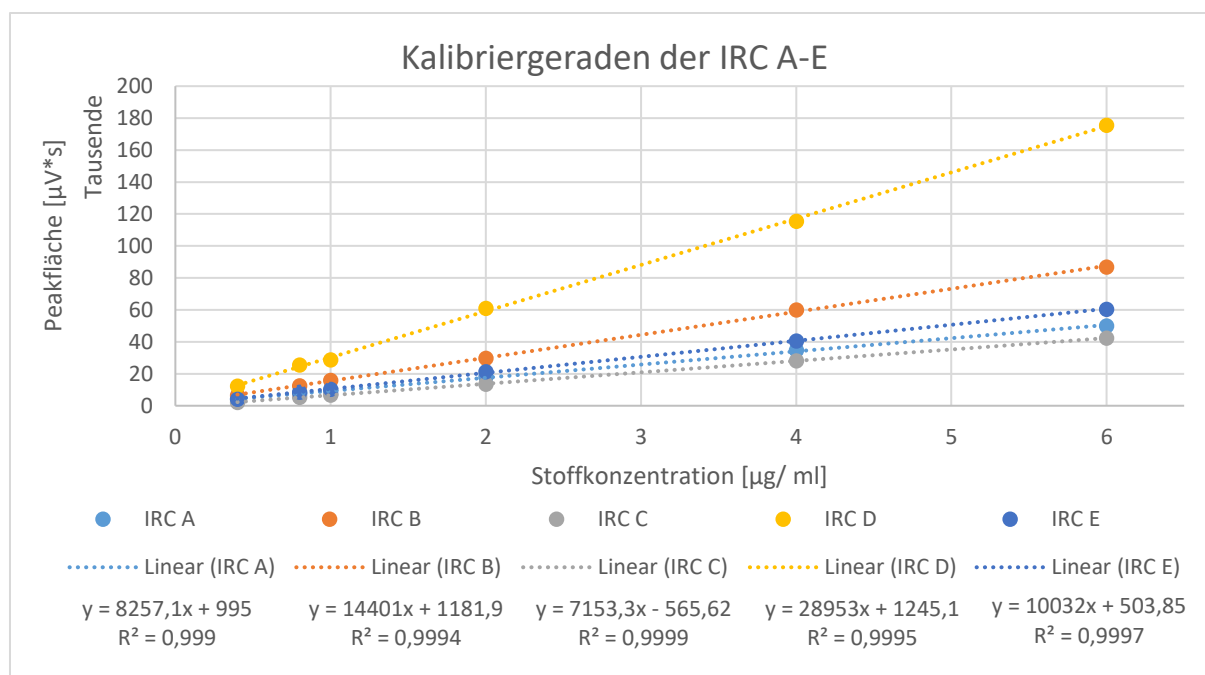


Abbildung 27 Kalibriergeraden der IRC A-E

Die Verunreinigungen wurden in den unter Tabelle 19 angegebenen Konzentrationen per UV/ VIS-HPLC-Analytik vermessen und analysiert. Die Regressionsfaktoren aller IRC's liegen bei über 0,999.

Präzision

Analog zum Wirkstoff wurden, um die Präzision der Messung darzustellen, die gemittelten Flächen und deren Standardabweichungen zu einem Variationskoeffizienten prozessiert. Das Akzeptanzkriterium wurde hierbei intern auf Ergebnisse unter 15 % gesetzt.

Tabelle 19 Gemittelte Daten der IRC zur Einschätzung der Präzision

Identisch zum Wirkstoff wird die Präzision mithilfe des Variations-koeffizienten eingeschätzt. Die originalen Datensätze sind der Anlage 12.2 zu entnehmen.

Konz. IRC A [μg/ ml]	Ret-Zeit Ø [min]	Fläche Ø [μV*s]	StAW [μV*s]	CV [%]
0,4	19,78	4317,33	580,32	13,44
0,8		7442,50	211,85	2,85
1		8600,83	487,88	5,67
2		18151,67	837,92	4,62
4		34722,67	352,37	1,01
6		49985,17	596,27	1,19

Konz. IRC B [μg/ ml]	Ret-Zeit Ø [min]	Fläche Ø [μV*s]	StAW [μV*s]	CV [%]
0,4	5,93	6426,67	204,91	3,19
0,8		12474,17	277,08	2,22
1		15999,67	469,88	2,94
2		29829,67	607,93	2,04
4		60087,17	891,16	1,48
6		86764,67	2785,95	3,21

Fortsetzung Tabelle 19 Gemittelte Daten der Imiquimod-Verunreinigungen zur Einschätzung der Präzision

Konz. IRC C [$\mu\text{g}/\text{ml}$]	Ret-Zeit $\bar{\phi}$ [min]	Fläche $\bar{\phi}$ [$\mu\text{V}^*\text{s}$]	StAW [$\mu\text{V}^*\text{s}$]	CV [%]
0,4	31,11	2193,33	298,26	13,60
0,8		5314,20	571,65	10,76
1		6671,17	426,50	6,39
2		13486,50	541,65	4,02
4		28225,67	2154,89	7,63
6		42292,17	1180,98	2,79

Konz. IRC D [$\mu\text{g}/\text{ml}$]	Ret-Zeit $\bar{\phi}$ [min]	Fläche $\bar{\phi}$ [$\mu\text{V}^*\text{s}$]	StAW [$\mu\text{V}^*\text{s}$]	CV [%]
0,4	39,90	12258,83	773,50	6,31
0,8		25610,67	1390,71	5,43
1		28765,83	1359,43	4,73
2		60958,83	840,75	1,38
4		115487,17	719,09	0,62
6		175526,17	10956,63	6,24

Konz. IRC E [$\mu\text{g}/\text{ml}$]	Ret-Zeit $\bar{\phi}$ [min]	Fläche $\bar{\phi}$ [$\mu\text{V}^*\text{s}$]	StAW [$\mu\text{V}^*\text{s}$]	CV [%]
0,4	50,00	4197,50	250,44	5,97
0,8		8417,50	246,00	2,92
1		10412,00	867,98	8,34
2		21302,40	710,14	3,33
4		40660,00	860,05	2,12
6		60491,17	962,64	1,59

Nach den Einzelmessungen wurde eine Mischung der Verunreinigungen mit jeweils 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ hergestellt und damit eine simultane Analyse durchgeführt. Sie diente der Überprüfung von gegenseitigen Einflüssen der IRC's untereinander in Bezug auf Retentionszeit und Peakfläche. Tabelle 20 gibt einen Überblick über die wichtigsten Parameter. Die ausführlichen Messergebnisse der Einzel- und Mischanalysen sind der Anlage 12.2 zu entnehmen.

Tabelle 20 Auswertung des Chromatogramms einer Mischung der Verunreinigungen.

Die IRC's lagen jeweils in einer Konzentration von 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ vor. Die Mittelwerte wurden aus je drei Messungen ermittelt. Die zugrundeliegenden Rohdaten können dem Anhang Tabelle 43 entnommen werden.

IRC Mix [2 $\mu\text{g}/\text{ml}$]	Ret.-Zeit $\bar{\phi}$ [min]	Fläche $\bar{\phi}$ [$\mu\text{V}^*\text{s}$]	StAW [$\mu\text{V}^*\text{s}$]	CV [%]
A	13,11	16810,67	780,82	4,64
B	6,23	32557,33	1576,62	4,84
C	20,83	13907,00	241,06	1,73
D	40,41	52475,33	3343,14	6,37
E	52,63	21134,00	1327,13	6,28

4.1.3 Analytik Parabene

Die Etablierung einer analytischen Methode zur parallelen Bestimmung von Methyl- und Propylparaben stellte aufgrund der vielfältigen schon bestehenden europäischen und amerikanischen Arzneibuchmethoden kein Hindernis dar. Aus technischen Gründen wurde die Vorschrift einer experimentellen Bestimmung der beiden Paraben-Derivate in

Sonnencremes verwendet und erfolgreich übernommen. Die Methode macht eine simultane Analyse der beiden p-Hydroxybenzoate und darüber hinaus zwei weiterer Strukturverwandter möglich (82). Die Konzentrationen der Kalibrierung wurden entsprechend der Anteile der Zubereitung gewählt und lagen zwischen 2 µg/ ml und 35 µg/ ml. Es wurden je Konzentration drei Analysen durchgeführt sowie die jeweiligen Peakflächen und Retentionszeiten ermittelt. Es wurden Mittelwert, Standardabweichung und CV berechnet, sowie eine graphische Darstellung angefertigt. Mit den jeweiligen Regressionsfaktoren von über 0,999 kann von einem stark linearen Zusammenhang innerhalb des untersuchten Konzentrationsintervalls ausgegangen werden. Die Variationskoeffizienten liegen alle unter 10 % und treffen damit die festgelegten Kriterien. Der vollständige Datensatz ist in Anlage 12.3 hinterlegt.

Tabelle 21 Tabellarische Darstellung der Kalibriergeraden der Konservierungsmittel

Die Mittelwerte ergeben sich aus drei separaten Läufen. Es wurde eine Mischung beider Parabene für die Analyse verwendet, die im Laufe der Testung weiter verdünnt wurde.

Konz. M-Paraben [µg/ ml]	Ret-Zeit Ø [min]	Fläche Ø [µV*s]	StAW [µV*s]	CV [%]
34,93	3,00	7703791,33	71851,01	0,933
17,46		3929129,00	47161,81	1,200
8,73		1972318,33	48310,28	2,449
4,37		1004895,00	39932,95	3,974
2,18		540928,00	33249,57	6,147

Konz. P-Paraben [µg/ ml]	Ret-Zeit Ø [min]	Fläche Ø [µV*s]	StAW [µV*s]	CV [%]
31,40	5,42	6167823,33	80044,98	1,298
15,70		3216517,00	289276,64	8,993
7,85		1559306,00	82267,16	5,276
3,93		774686,33	32707,24	4,222
1,96		417367,33	20096,81	4,815

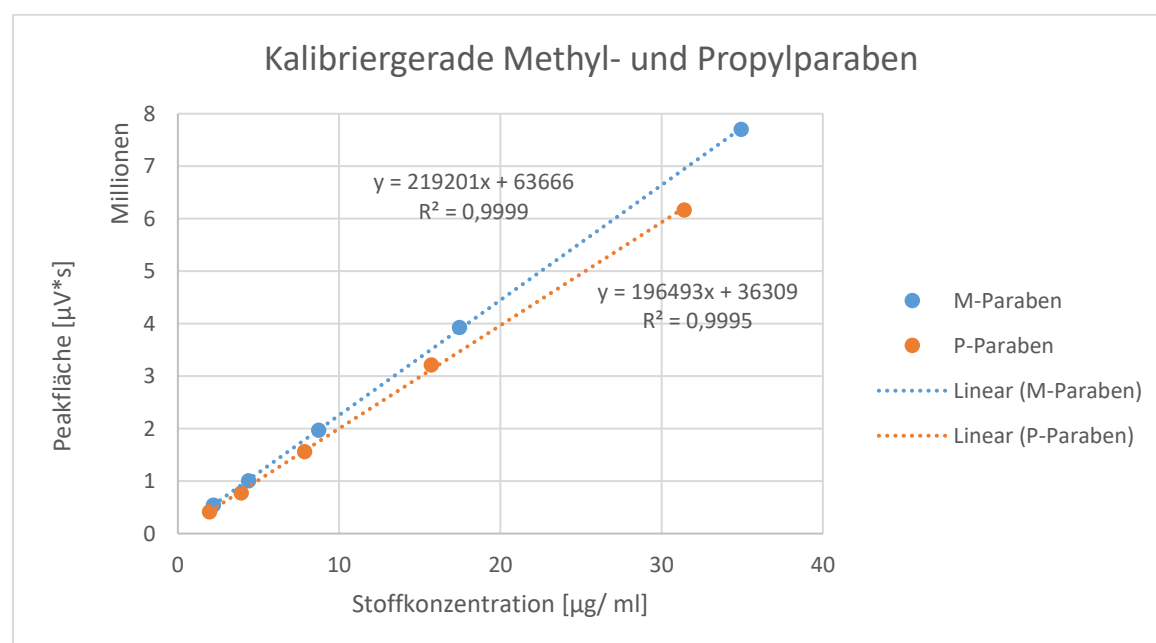


Abbildung 28 Graphische Darstellung der Kalibriergeraden Methyl- und Propylparaben

Zur Analyse wurde eine Mischung beider Konservierungsmittel verwendet. Die verwendete Methodik wird in Kapitel 3.4.1.3 dargestellt.

4.1.4 Anwendung auf ImiGEL

Die Umsetzung der bereits etablierten Methoden auf die später zu analysierenden Produktionschargen soll hier exemplarisch an der Charge ImiGEL mit 0,1 % Parabengehalt dargestellt werden, die folgend als „Tube 0,1 %“ bezeichnet wird.

Nach Einwaage und Analysevorbereitung von 220,64 mg ImiGEL wurde für den Wirkstoff ein Tuben-Gehalt von 100 % erhalten. Entsprechend USP-Methodik zur Bestimmung der Verunreinigungen, wurde eine zweite Probe vorbereitet und untersucht. Zum Zeitpunkt der Analyse zeigte das Chromatogramm keine Peaks. Somit befanden sich keine herstellungsbedingten Verunreinigungen des Wirkstoffes in der Charge. In Bezug auf die Konservierungsmittel wurde stoffspezifisch eine Differenz von 8,7 % für Methylparaben und -1,8 % für Propylparaben ermittelt. Alle Abweichungen liegen innerhalb der gesetzten Akzeptanzkriterien für die PHB-Ester. Die ermittelten Konzentrationen liegen allerdings weit außerhalb des kalibrierten Bereichs und sind damit nicht aussagekräftig. Die detaillierten grundlegenden Daten sind den Anlagen 12.1 und 12.3 zu entnehmen.

Tabelle 22 Daten zur Berechnung des Wirkstoffgehalts in Tube „0,1 %“

	Einwaage ImiGEL	Fläche [$\mu\text{V} \cdot \text{s}$]	Konz. berechnet [mg/ ml]	Akzeptanzkriterium [%]
Imiquimod Standard [ng /ml]	1791	116541,5	0,0018	90,0 - 110,0
„Tube 0,1 %“ [mg]	220,64	17151237	0,2702	100,585

Tabelle 23 Darstellung der gemittelten Ergebnisse der Parabene aus Tube „0,1 %“

Tube „0,1 %“	Ret-Zeit [min]	Fläche [$\mu\text{V} \cdot \text{s}$]	Konz. berechnet [g/ ml]	Einwaage ImiGEL (g)	Konz. soll [g/ ml]	Diff. [%]
M-Paraben	2,983	2117833	9,37 E-06	1,197	8,55 E-06	8,69
P-Paraben	5,388	586718	2,80 E-06	1,082	2,85 E-06	-1,77

4.2 Reinigungsvalidierung Hochdruckhomogenisator

Die Reinigung des Emulsiflex C3 erfolgte in zwei Phasen. Während in der ersten Phase eine Methodenfindung erprobt wurde, konnte in der zweiten Phase eine Validierung der Methode durchgeführt werden.

Phase I

Zum Start der kontinuierlichen Reinigung wurde verstärkt der Einfluss von Temperatur und Druck untersucht. In Tabelle 24 sind die per HPLC gemessenen Konzentrationen und die jeweiligen Reduzierungen dargestellt. Zu sehen ist ein exponentieller Abfall mit Ausreißern bei Waschgang 5 und 9. Diese Peaks sind mit dem Einsatz von Druck (Messung 5) und Temperatur über das gesamte System (Messung 9) zu erklären. Beim anfänglichen Einsatz von erwärmtem Medium im Emulsiflex, der zuvor Raumtemperatur hatte, kann davon ausgegangen werden, dass das Medium im Gerät recht schnell abgekühlt wurde. Sofern aber die gesamte Einheit, hier vor allem die Kompaktionskammer, mit heißem Leitungswasser vorgewärmt wurde, kann die Waschlösung ihr erhöhtes Lösungsvermögen ausnutzen.

Tabelle 24 Ergebnisse Imiquimod im Emulsiflex; Kontinuierlicher Modus.

Die Gehaltsbestimmung erfolgte durch HPLC-Analytik. Die Berechnung der ersten Reduzierung und der ersten beiden Faktoren ist aus logischen Gründen nicht möglich und wurden demnach hier entwertet.

Versuch	Waschung	Gehalt Imiquimod [µg/ ml]	Reduzierung zur Vorstufe [µg/ ml]	Faktor
A	1	10,27	-/-	-/-
	2	3,40	6,88	-/-
	3	2,52	0,88	7,82
	4	1,92	0,59	1,49
	5	2,85	-0,91	-0,65
	6	1,66	1,18	-0,77
	7	0,70	0,96	1,23
	8	0,93	-0,24	-4,09
	9	1,48	-0,55	0,43
	10	1,00	0,48	-1,14
	11	0,98	0,02	21,08
	12	1,06	-0,08	-0,29

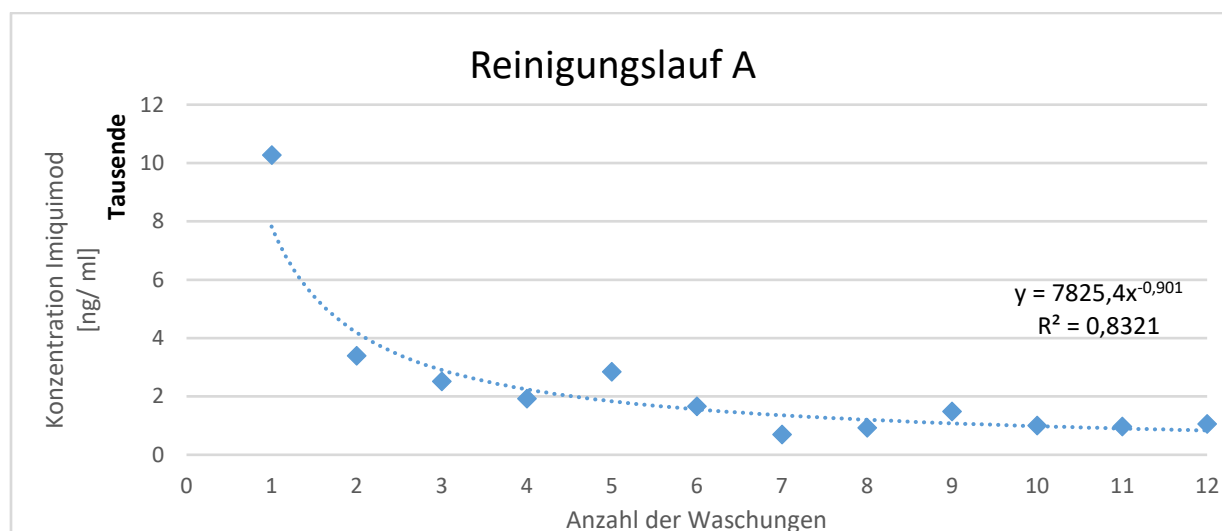


Abbildung 29 Ermittlung eines Minimums an Imiquimod im HDH-System

Die Abnahme der Wirkstoffkonzentration im kontinuierlichen Modus kann durch einen potentiellen Verlauf dargestellt werden, wobei durch die wechselnden Bedingungen (vgl. Waschung 5) nur ein vergleichsweise schlechter Fit erhalten wird.

Nach Abschluss der kontinuierlichen Phase konnte ein konstanter Restgehalt von $1,011 \mu\text{g}/\text{ml} \pm 0,042 \mu\text{g}/\text{ml}$ (gemittelte Waschungen 10, 11, 12; siehe Tabelle 24) als Nullpunkt festgelegt werden. Nach erneuter Verunreinigung des Geräts mit Wirkstoffsuspension wurde mit Hilfe der vorher entwickelten Methode für die Waschungen B1-B4 (Tabelle 25) eine Reduzierung der Wirkstoffbelastung auf $0,36 \mu\text{g}/\text{ml}$ erzielt.

Tabelle 25 Belastungsreduzierung des Wirkstoffs, Lauf B

Die Wiederholung der Verunreinigung und die erneute Reinigung des Systems sind erste Schritte zu einer validierten Reinigungsmethodik.

Versuch	Waschung	Gehalt Imiquimod [$\mu\text{g}/\text{ml}$]	Reduzierung zur Vorstufe [$\mu\text{g}/\text{ml}$]	Faktor
B	1	5,83	-/-	-/-
	2	1,17	4,66	-/-
	3	0,27	0,90	5,17
	4	0,36	-0,09	-9,65

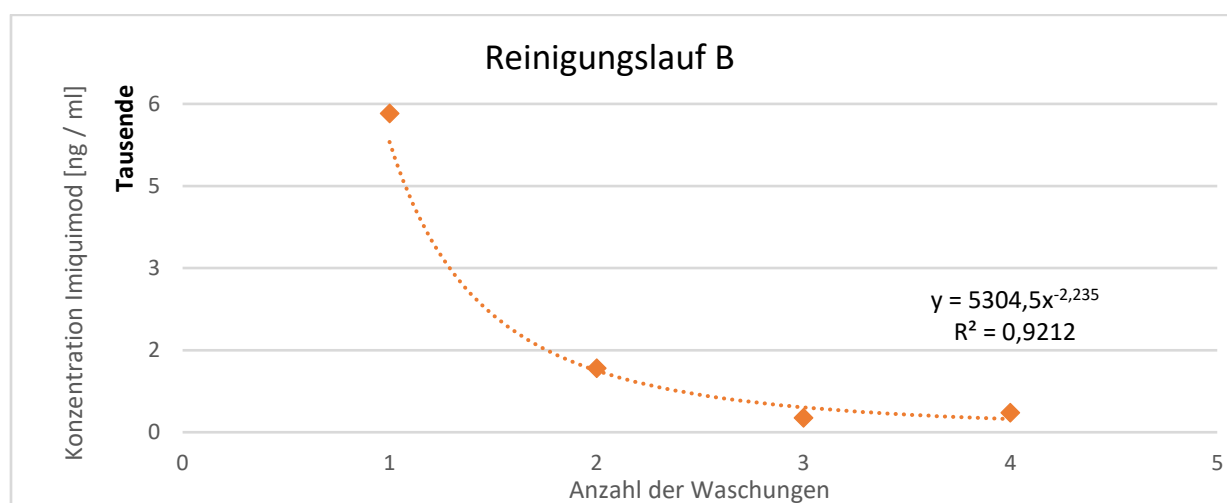


Abbildung 30 Reduktion Imiquimod im HDH-System nach Verunreinigung

Die gefittete Kurve zeigt mit einem Regressionsfaktor von 0,9 einen guten potentiellen Zusammenhang der erhaltenen Werte.

Phase II

Innerhalb der zweiten Phase wurden drei Reinigungsdurchläufe durchgeführt. Vor jedem dieser Durchläufe wurde der Emulsiflex C3 erneut durch viermalige Einspritzung der WS-Suspension verunreinigt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 26 und Abbildung 31 dargestellt.

Für jede Kurve wurde eine Trendlinie mit zugehöriger Kurvengleichung und Regressionsfaktor erstellt. Dem zuvor verifizierten potentiellen Abfall des Wirkstoffgehaltes folgend, kann eine Reduzierung der Kontamination von $7,24 \mu\text{g}/\text{ml}$ (\emptyset) auf $1,24 \mu\text{g}/\text{ml}$ (\emptyset) mit $6 \mu\text{g}/\text{ml}$ beziffert werden. Die Unterschiede der einzelnen Endergebnisse sind auf ihren Kontaminationsgrad bei Verschmutzung zurückzuführen. So erscheint bei höherer Verschmutzung auch eine höhere Endkontamination und umgekehrt. Werden die oben erhaltenen Messwerte der Läufe B-E je Waschung gemittelt und diese Mittelwerte als Kurvengleichung dargestellt, ergeben sich nach Neuberechnung die in Abbildung 32 dargestellten Wirkstoff-Profile. Trotz unterschiedlicher Startkontamination wird ein gemittelter theoretischer Restgehalt von $913,82 \text{ ng}/\text{ml} \pm 159,81 \text{ ng}/\text{ml}$ nach vier Waschdurchläufen erreicht. Die Methode als solche konnte sich somit als solide gegenüber Ausreißern erweisen und wurde nach Auswertung der oben dargestellten Daten abgeschlossen und implementiert.

Tabelle 26 Ergebnisse Imiquimod im Emulsiflex; diskontinuierlichen Modus

Bestimmt wurde neben dem Wirkstoffgehalt der Waschlösung per HPLC, die Reduzierung zur Vorstufe und der Reinigungsfaktor.

Versuch	Waschung	Gehalt Imiquimod [µg/ ml]	Reduzierung zur Vorstufe [µg/ ml]	Faktor
C	1	8,50	-/-	-/-
	2	3,21	5,29	-/-
	3	1,66	1,54	3,43
	4	1,94	-0,27	-5,65
D	1	6,83	-/-	-/-
	2	1,71	5,12	-/-
	3	1,04	0,66	7,71
	4	1,27	-0,22	-2,96
E	1	7,79	-/-	-/-
	2	2,01	5,78	-/-
	3	1,09	0,92	6,30
	4	1,40	-0,31	-2,99

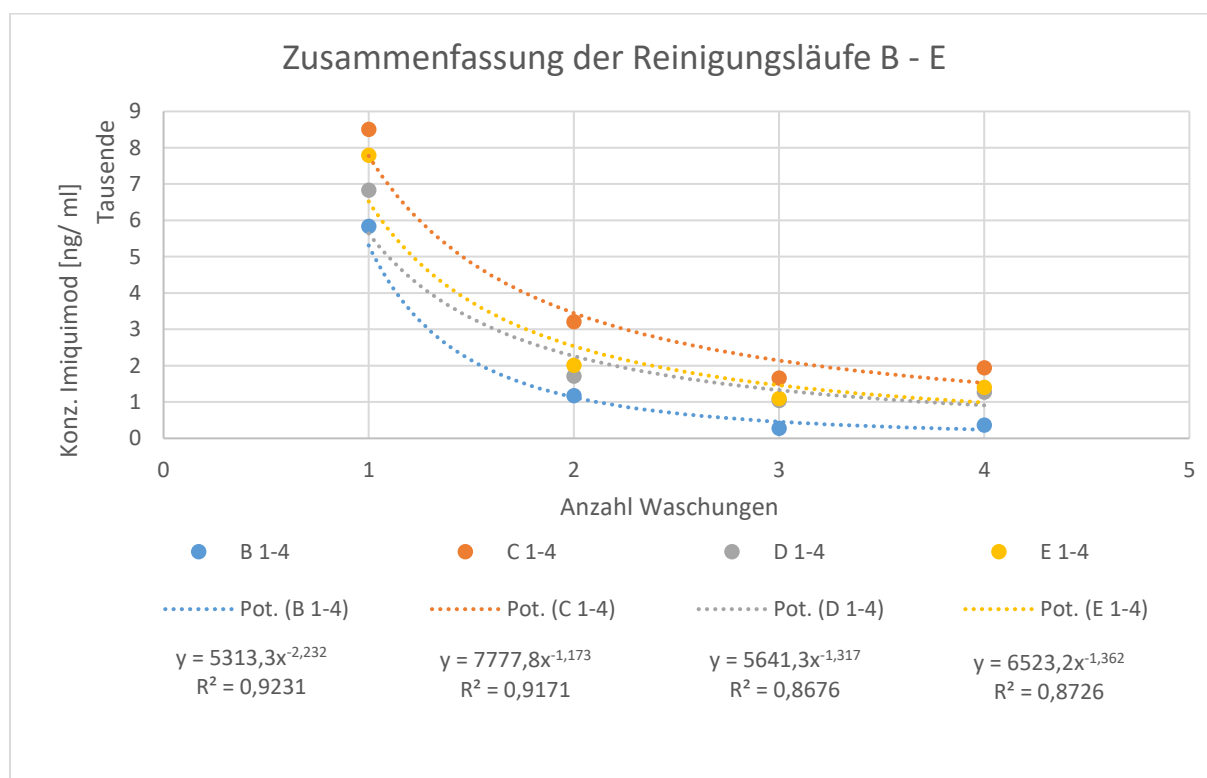


Abbildung 31 Zusammenfassung der Reduzierung des Wirkstoffs im HDH-System

Reinigung erfolgte nach wiederholter Verunreinigung mit WS-Suspension. Darstellung der diskontinuierlichen Durchläufe B 1-4, C 1-4, D 1-4 und E 1-4 mit Regressionsfaktoren und Kurvengleichung. Aufgrund der unterschiedlichen Startbelastung werden nach den vier Waschläufen unterschiedliche Endbelastungen erhalten.

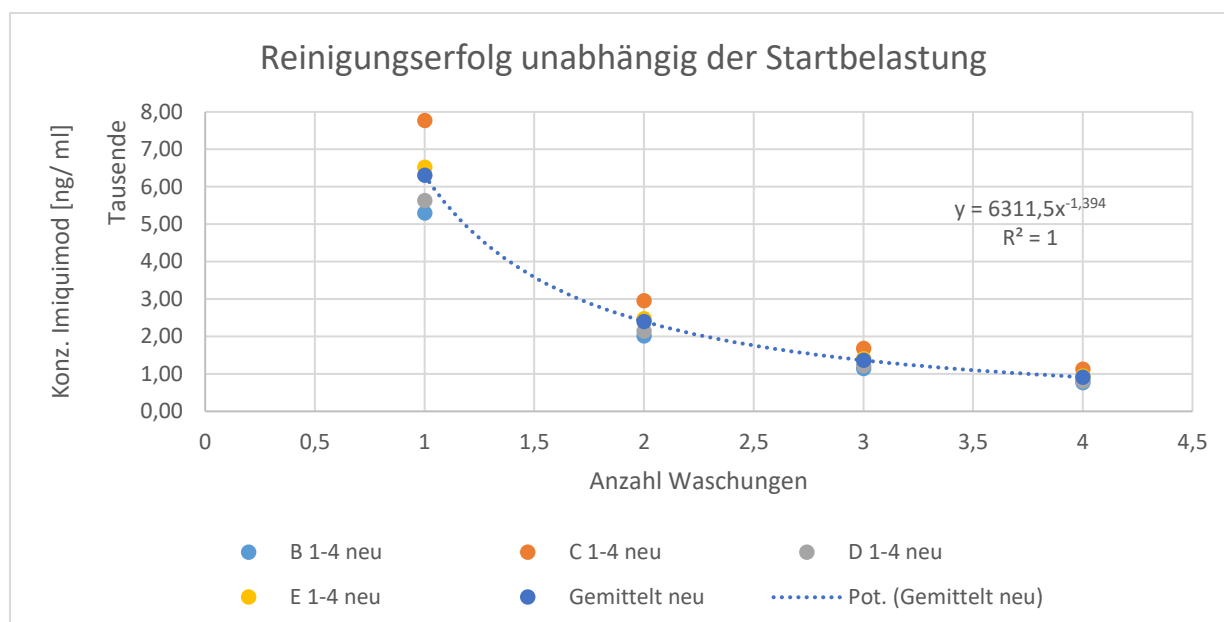


Abbildung 32 Darstellung des Reinigungserfolgs unabhängig von der Ausgangsbelastung

Die Neuberechnung der Wirkstoffbelastung des Systems ergibt einen theoretischen Abfall der unterschiedlichen Startkonzentrationen zu einer Zielkonzentration von $913,82 \text{ ng/ ml} \pm 159,81 \text{ ng/ ml}$. Es kann also von einem validen und gleichwertigen Reinigungserfolg unabhängig der Startbelastung ausgegangen werden. Regressionsfaktor und Kurvengleichung sind für die gemittelte Kurve (blau) angezeigt. Tabelle 40 stellt im Anhang die zugrundeliegenden Daten dar.

4.3 Abrieb

Vermahlen im rein wässrigen Medium

Zur Überprüfung des Abriebs der Zirkonium-haltigen Mahlwerkzeuge wurden Becher, Kugeln und der Deckel überprüft. Die Kugeln wurden auf einer Analysenwaage gewogen, während die beiden anderen Werkzeuge durch ihr Eigengewicht nur auf der Rezepturwaage gewogen werden konnten. Das Zerkleinerungsprogramm wurde entsprechend Herstellungsverfahren übernommen, sodass das Material insgesamt 140 min bei 650 rpm gestresst wurde. In Tabelle 27 und Tabelle 28 sind die Ergebnisse der Wägungen, eine Verlustberechnung und eine prozentuale Umrechnung angegeben. Mahlbecher und Deckel hatten einen Verlust von 7 mg bzw. 0,01 ‰ ihrer Massen zu verzeichnen, während die Kugeln 36 mg Verlust bzw. 0,14 ‰ Abrieb erlitten.

Tabelle 27 Gravimetrische Bestimmung des Abriebs der Kugeln in wässrigem Medium.

Der Mittelwert über vier Messungen ergab einen Verlust von 36 mg, der 0,1 ‰ entspricht.

Messung	Vor Mahlung [g]	Nach Mahlung [g]	Differenz [g]	Differenz [%]
1	25,3018	25,2932	0,0089	0,0341
2	25,2932	25,2544	0,0361	0,1427
3	25,2544	25,1930	0,0614	0,2430
4	25,1930	25,1534	0,0396	0,1571
MW	-/-	-/-	0,0364	0,1442

Tabelle 28 Vierfache Vermessung des Abriebs des Bechers und des Deckels

Die Wägung fand auf einer Rezepturwaage statt. Der Verlust an Material ist für die beiden Komponenten zu vernachlässigen.

Messung	Vor Mahlung [g]	Nach Mahlung [g]	Differenz [g]	Differenz [%]
1	517,71	517,71	0,00	0,00
2	517,71	517,71	0,00	0,00
3	517,71	517,68	0,03	0,01
4	517,68	517,68	0,00	0,00
MW	-/-	-/-	0,0075	0,0014

Vermahlen im wirkstoffhaltigen Medium

Die Messung in rein wässrigem Medium diente als Stresstestmessung. In diesem System konnten die Kugeln ihre kinetische Energie nicht an ein Mahlgut zur Zerkleinerung übertragen, sondern lediglich an sich selbst entladen. Um einen realistischeren Wert des Abriebs nach der Mahlung zu erhalten, wurde eine nach Herstellungsvorschrift zubereitete Wirkstoffsuspension als Mahlgut verwendet. Diese enthielt 17 g Tween-80-Wasser-Lösung, 3 g Imiquimod und 25 g Mahlkugeln. Die im Vorversuch verwendeten Einstellungen der Mühle sowie die nachfolgenden Auswertungsmethoden blieben identisch. Eine Beurteilung des Bechers und des Deckels fanden aufgrund des minimalen Abriebs im Stresstest nicht statt.

Tabelle 29 Gravimetrische Bestimmung des Abriebs der Kugeln

Die Wägung fand auf der Analysenwaage statt. Mit 15 mg fällt der Abrieb in der Wirkstoffsuspension halb so hoch aus wie in wässrigem Medium.

Messung	Vor Mahlung [g]	Nach Mahlung [g]	Differenz [g]	Differenz [%]
1	25,2712	25,2691	0,0021	0,0083
2	25,2691	25,2646	0,0044	0,0176
3	25,2148	25,1908	0,0240	0,0950
4	25,1908	25,1906	0,0002	0,0009
5	25,1906	25,1875	0,0031	0,0125
6	25,6301	25,6000	0,0301	0,1175
7	25,6000	25,5438	0,0562	0,2197
8	25,5438	25,5396	0,0043	0,0166
MW	-/-	-/-	0,0156	0,0610

Die Auswertung über acht Chargen ergab einen Abrieb von 15,6 mg bzw. 0,06 % und liegt damit halb so hoch wie die Messungen im wässrigen Medium. Eine Beurteilung des toxikologischen Risikos wurde anhand einer Literaturrecherche und dem Vergleich der darin befindlichen Expositionsdaten innerhalb des Diskussionsteils vorgenommen.

4.4 Penetrationsversuche ImiGEL in den Haut-Modellen Maus und Schwein

Maus

Die Versuche mit Mäusen wurden in drei Phasen unterteilt. In einer ersten Phase wurde die Probenvorbereitung sowie die Realisierbarkeit in Bezug auf die Wirkstoff-Wiederfindung aus den unterschiedlichen Matrices untersucht. So musste zunächst die notwendige Anzahl an Tesafilm®-Abrissen zur vollständigen Entfernung des SC für die gecremte Haut ermittelt werden. Nach erfolgreichem Abschluss wurde die Anzahl der Versuchstiere auf jeweils drei erhöht. Um einen Einfluss lebender Haut gegenüber totem Gewebe zu erfassen wurde ein Versuchstier vor der Applikation getötet, die Zubereitung aufgebracht und danach analysiert. Die Zeitpunkte zum Probenzug wurden auf 10, 60 und 180 Minuten festgesetzt. Analytisch erfasst wurden die Mengen an Wirkstoff in den einzelnen Tesafilm®-Strips sowie das mit Watte abgenommene überschüssige Material. Aus diesen kumulativen Konzentrationen konnte eine Gesamtwiederfindung berechnet werden. Um zusätzlich quantitative Verluste bemessen zu können, wurden die Mengen anhaftender Rezeptur an den Handschuhen untersucht.

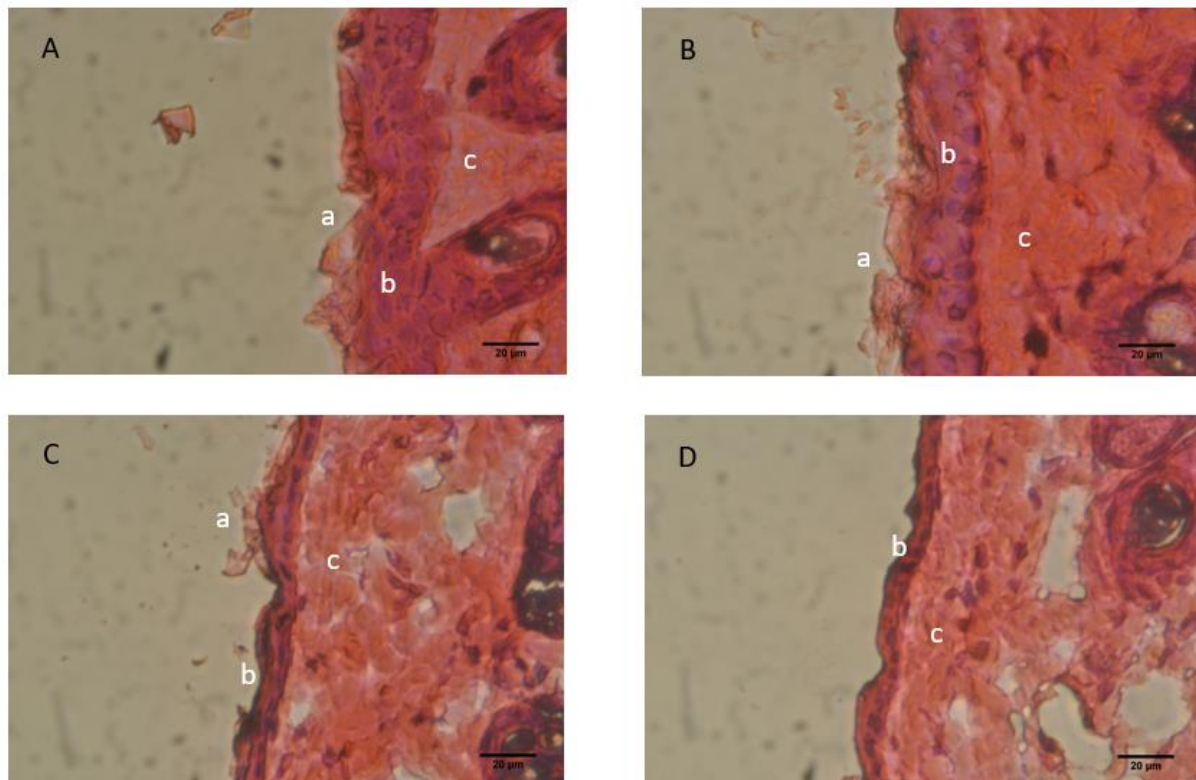


Abbildung 33 Querschnitte der Maushaut nach einstündiger Einwirkung von Aldara®
Anschließendes Anfärben durch HE-Lösung und 400fache Vergrößerung. Skalierungsbalken gibt 20 µm an. A Kontrolle, nur rasiert. B Nach fünf Strips. C Nach zehn Strips. D Nach 15 Strips. a Stratum corneum SC, b Stratum granulosum SG, c Stratum spinosum SS.

Phase I

Um die notwendige Anzahl an Klebestreifen zur Entfernung des SCs zu ermitteln, wurden beide Formulierungen (ImiGEL und Aldara®) verwendet, da der Einfluss der Formulierungen auf die Eigenschaften des SC nicht abzuschätzen war. Nach einer Stunde Einwirkzeit wurden nach jeweils fünf Tesafilm®-Strips Querschnitte des jeweiligen Hautareals angefertigt und mittels einer HE-Färbung kenntlich gemacht. Die Abbildung 33 A-D zeigen mit Aldara® und

Abbildung 34 A-D mit Emulsionsgel behandelte Hautquerschnitte. Nach 15 Tesafilm®-Abrissen war augenscheinlich kein SC mehr vorhanden, während die nachfolgende Schicht, das Stratum granulosum, erhalten blieb.

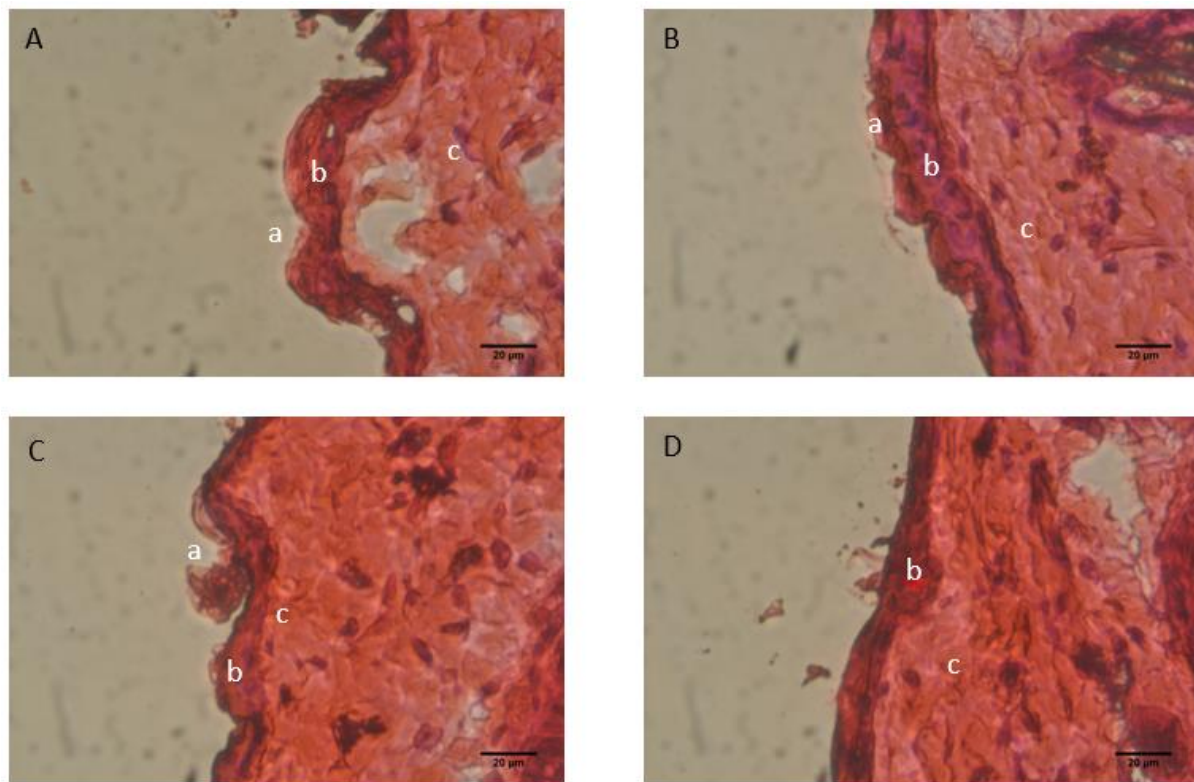


Abbildung 34 Querschnitte der Maushaut nach einstündiger Einwirkung von ImiGEL. Anschließendes Anfärben durch HE-Lösung und 400fache Vergrößerung. Skalierungsbalken gibt 20 µm an. A Kontrolle, nur rasiert. B Nach fünf Strips. C Nach zehn Strips. D Nach 15 Strips. a Stratum corneum SC, b Stratum granulosum SG, c Stratum spinosum SS.

Des Weiteren zeigt Tabelle 30 die Praktikabilität der HPLC-Bestimmung aus mit Watte aufgenommenen Zubereitung für ImiGEL und der Referenzzubereitung (Methodik Extraktion aus Watte siehe Kapitel 3.4.2.1). Mit einer Wiederfindung von über 90% kann von einer quantitativen Bestimmung ausgegangen werden.

Tabelle 30 Extraktion von Imiquimod-Zubereitung aus Watte
Als Extraktionsmedium diente ein Essigsäure-Acetatpuffer-Ethanol-Gemisch (siehe Kapitel 3.4.2.1)

Matrix	Zubereitung	Peak area [µV*s]	Imiquimod berechnet [µg]	Imiquimod Einwaage [µg]	Extrahiert [%]
Watte +	Aldara®	2094003,55	2397,39	2597,50	92,30
	ImiGEL	2292299,96	2641,51	2680,00	98,56

Im Zuge dessen wurden folgend die ersten Mäuse behandelt, getötet und analysiert. Die Abbildung 35 und Abbildung 36 geben die Verteilung der Formulierung innerhalb der ersten 15 Hautschichten und des Überstands wieder. Hierzu wurde je Maus eine bestimmte Anzahl Hautschichten entfernt und die restlich verbliebene Haut vermessen oder für Kryogen-Schnitte vorbereitet. Die Wiederfindung stellt die aufsummierten Mengen Imiquimod aus den

Fractionen Oberfläche und aller Strips dar, während der Verlust-Balken die berechnete Differenz zum Formulierungsauftrag wider gibt.

Beide Formulierungen zeigen einen vergleichsweise großen Überstand auf der Haut, der damit prozentual die größte Fraktion darstellt. Die Versuche mit lebender Haut zeigen eine Penetration bis unter das *Stratum corneum*, wobei die Wirkstoffspiegel sowohl mit der Zeit als auch mit steigender Anzahl entfernter Hautschichten abnehmen. Ausgehend von einem Auftrag von $416,67 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ Zubereitung konnte für ImiGEL zu jedem Zeitpunkt eine bessere Wiederfindung erzielt werden, als bei der Aldara®-Zubereitung.

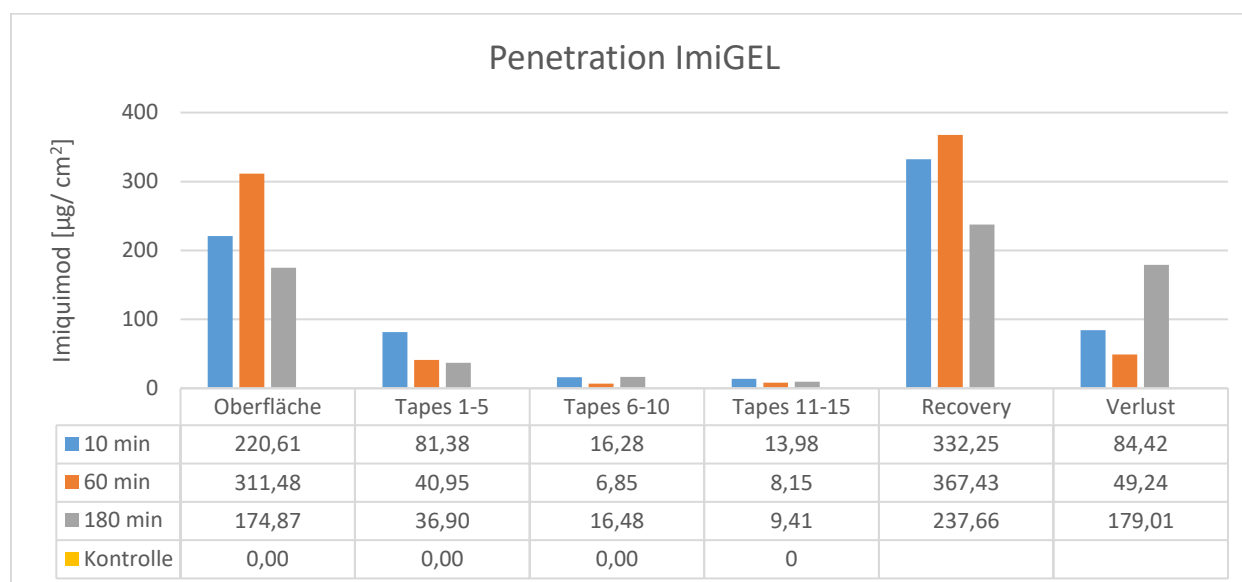


Abbildung 35 Penetration von Imiquimod aus ImiGEL in lebende Maushaut (n=1)

Es wurden Daten zu den ersten 15 Hautschichten und dem Überstand gesammelt. Hierzu wurden Tesafilm®-Strips zu je fünf Abrissen gebündelt bzw. die überstehende Formulierung direkt vor den Strip-Versuchen mit Watte abgenommen. Recovery stellt die aufsummierten Mengen Wirkstoff der Strips und der Oberfläche dar. Aus der aufgetragenen Menge und der Wiederfindung wurde der theoretische Verlust berechnet, des sich somit zu 20 % (10 min), 12 % (60 min) und 43 % (180 min) berechnet.

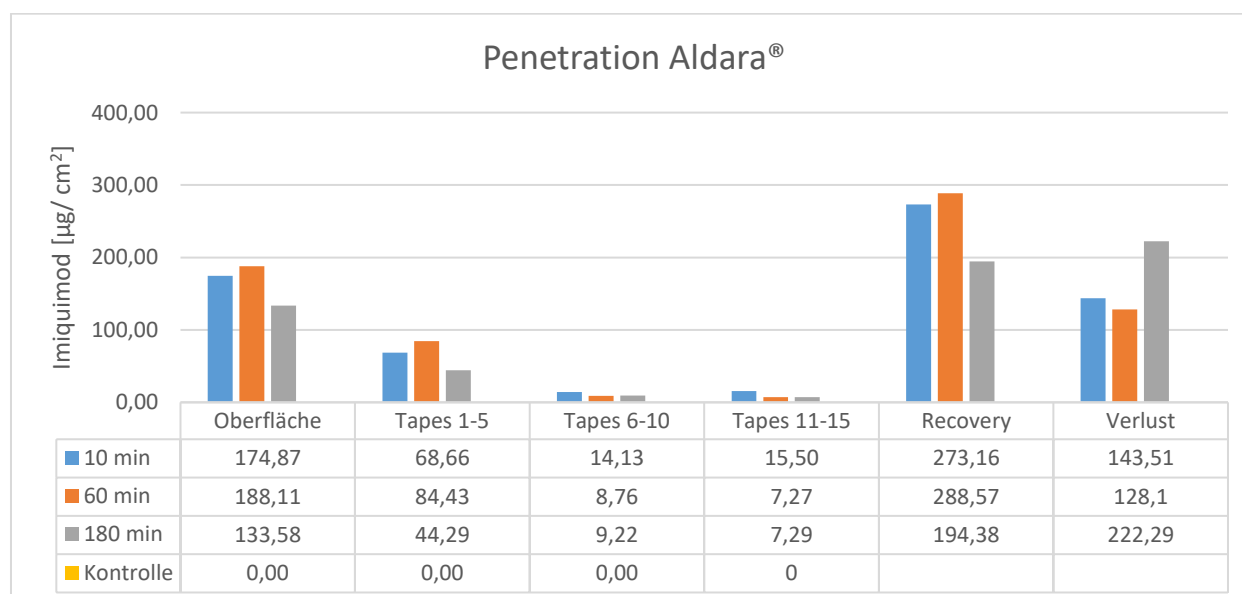


Abbildung 36 Penetration von Imiquimod aus Aldara® in lebende Maushaut (n=1)

Die Methodik ist identisch zu der unter Emulsionsgel beschriebenen. Auch hier stellt die Wiederfindung die Summe der vorgefundenen Fraktionen dar. Für die jeweiligen Zeitpunkte ergeben sich 34 % (10 min), 31 % (60 min) und 53 % (180 min) theoretischer Verlust, der die rechnerische Differenz zur Auftragsmenge wiedergibt.

In einem weiteren Versuch wurden die Imiquimod-Zubereitungen nach 60 min Einwirkzeit miteinander verglichen. Aldara® zeigte zu jedem Probenzug einen höheren Gehalt an Wirkstoff (siehe Abbildung 37). Die Referenz kann also schneller in die Haut eindringen und hinterlässt auf der Oberfläche weniger Imiquimod als die langsamer permeierende ImiGEL-Zubereitung. Die scheinbar hohen Verluste des sogenannten Goldstandards Aldara® sind seiner schnellen Penetration in tieferes Gewebe geschuldet. Mit der Auswertung und dem Vergleich der beiden Formulierungen wurde die Praktikabilität des Versuchsaufbaus bewiesen und Phase 2 begonnen.

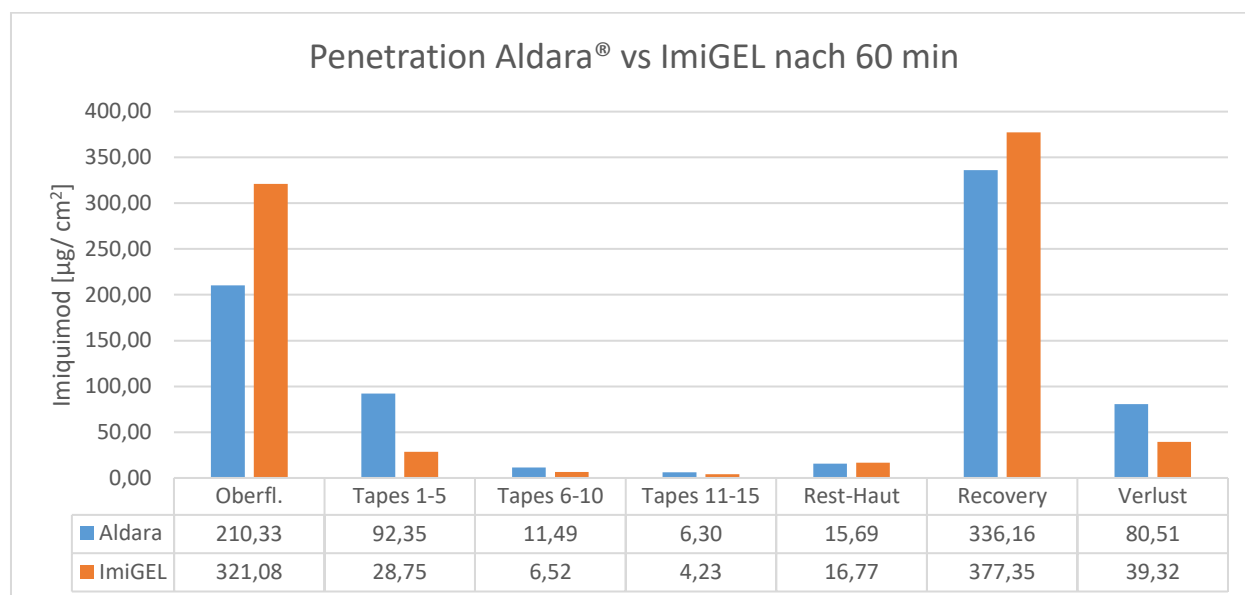


Abbildung 37 Vergleichende Darstellung beider Formulierungen nach einer Stunde

Der separate Versuch ($n=1$ je Produkt) zeigt die schnelle Penetration Aldara®s durch die oberen Hornschichten, wohingegen ImiGEL langsam in die Haut eindringt. In tieferen Schichten gleichen sich die Wirkstoffspiegel wieder an. Die Verluste werden mit 19 % (Aldara®) und 9 % (ImiGEL) beziffert.

Phase 2

Während der prinzipielle Versuchsaufbau nicht verändert wurde, konnte durch die Vergrößerung der Anzahl von Versuchstieren individuelle Fehlerquellen statistisch verringert werden. Je Versuchsaarm wurden nun drei Tiere behandelt und analysiert. Die Datenlage nach Quantifizierung blieb bestehen (s. Abbildung 38 und Abbildung 39): Aldara® zeigt nach drei Stunden Einwirkzeit eine 2,5fach niedrigere Wirkstoffkonzentration auf der Oberfläche als ImiGEL. Auch in den restlichen Hautschichten (Tape 1-5 und Hautrest) kann Aldara® nach 3 Stunden mit ca 50 % mehr Imiquimod eine schnellere Penetration aufweisen. Die Wiederfindungsrate bzw. die berechneten Verluste lagen ähnlich hoch wie in Phase 1 (nicht dargestellt).

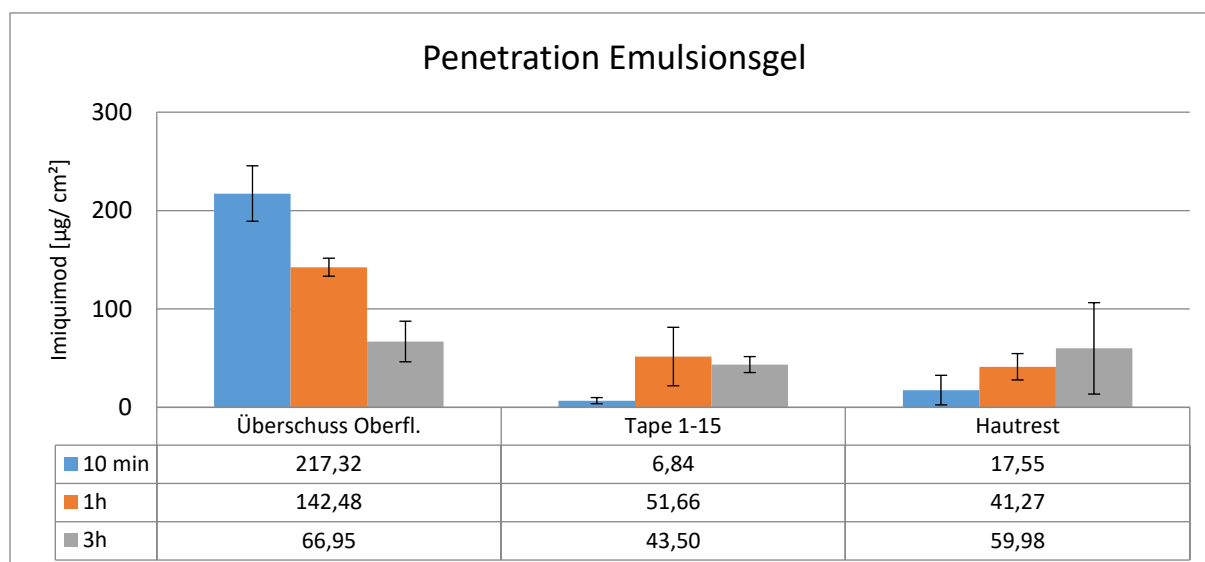


Abbildung 38 Statistische Auswertung der Permeation von Imiquimod aus ImiGEL

Die Vorversuche konnten durch Vergrößerung der behandelten Gruppe bestätigt werden ($n=3$). Die Probenzüge zu 10, 60 und 180 min blieben gleich.

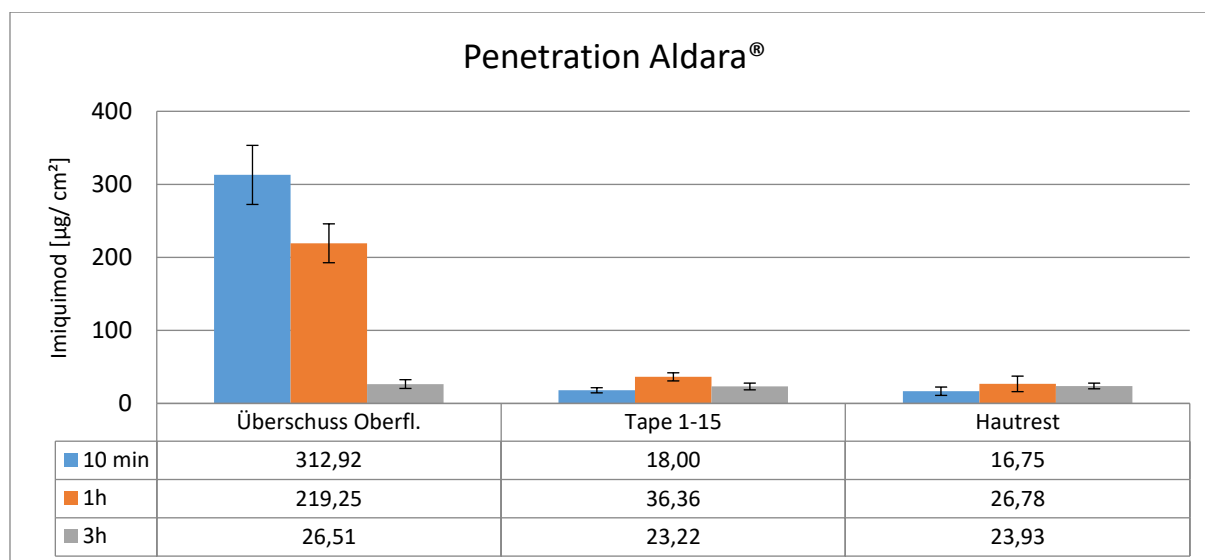


Abbildung 39 Statistische Überprüfung des Vorversuchs für Aldara®

Die neuen Ergebnisse ($n=3$) kongruieren mit den Daten der Vorversuchen.

Phase 3

Innerhalb der ersten beiden Phasen wurden hohe Verluste an Wirkstoff festgestellt. Dies wurde durch am Handschuh bzw. der cremenden Hand anhaftende Zubereitung begründet. Deshalb wurde im letzten Stadium dieser Penetrationsreihe zusätzlich diese für den Hautversuch defizitäre Menge identifiziert. Des Weiteren wurde der Einfluss des Penetrationsvermögens zwischen lebendigem oder totem Gewebe verglichen. Mit allen drei Formulierungen wurden diese Penetrationsversuche durchgeführt. Die Ergebnisse zu ImiSOL befinden sich unter 4.3.1 *Permeation von ImiSOL auf Maushaut*.

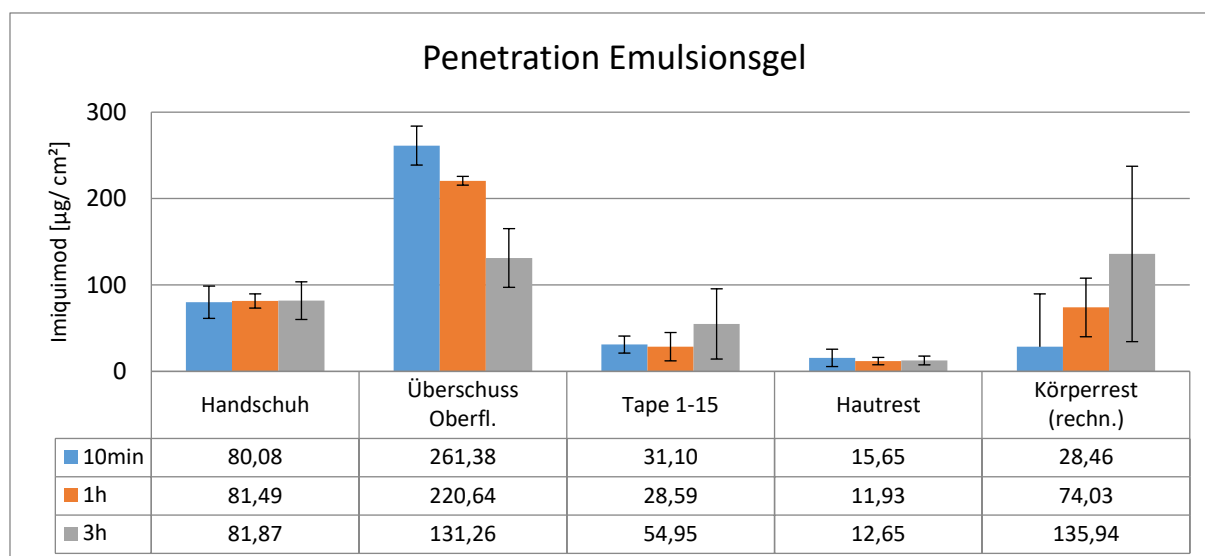


Abbildung 40 Analyse von ImiGEL auf mehreren Versuchstieren in Phase 3

Mit Verlustbestimmung durch die Anwendung selbst (n=3). Die theoretisch bestimmte Menge an Wirkstoff „Körperrest“ stellt die Differenz des wiedergefundenen Gehalts an Imiquimod zum anfänglichen Auftrag dar.

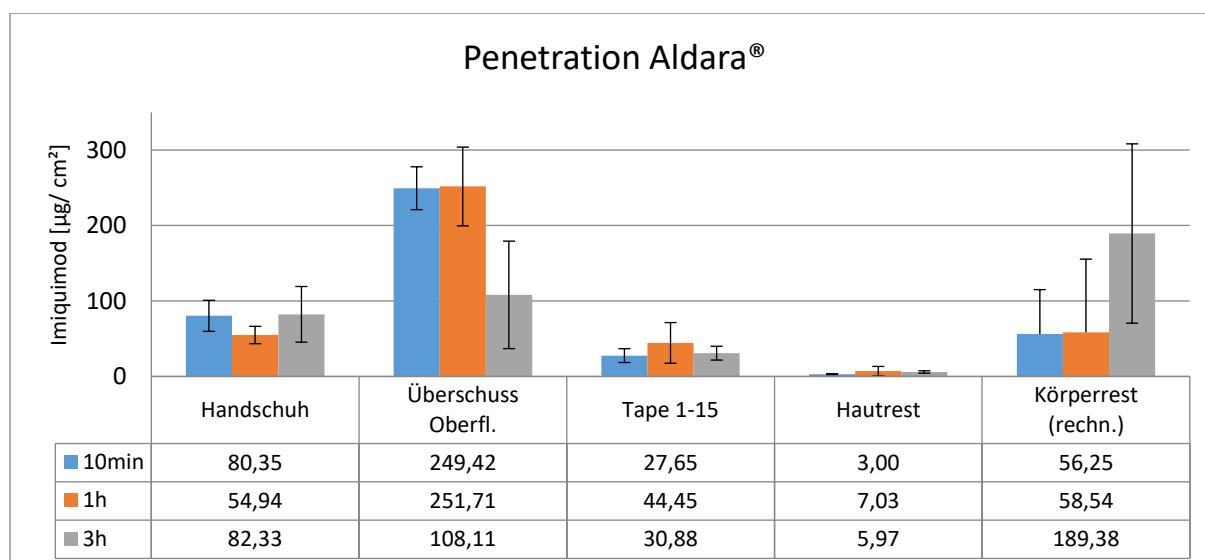


Abbildung 41 Bestimmung der Verluste an Aldara® in Phase 3 (n=3)

Die Überprüfung verlief parallel und identisch zum beschriebenen Verfahren für ImiGEL (Abbildung 40).

Abbildung 40 und Abbildung 41 zeigen eine auf den Gehalt bezogene deutliche Verbesserung der „Handschuh-Verluste“ im Vergleich zu den ersten beiden Phasen. Während sich die Verteilung von Imiquimod auf und im Gewebe kaum verändert hat, zeigt die Gehaltsbestimmung, dass die am Handschuh bzw. an der Hand des Probanden verbleibenden Zubereitung nach zehn Minuten knapp 20 % beträgt. Wahrscheinlich verweist die Patienteninformation auch aus diesem Grund auf eine Reinigung der Hände durch Abwaschen mit milder Seife nach Auftragung hin.

Um den Einfluss physiologischer Prozesse auf die Penetration zu bestimmen, wurde die Methode an einer toten Maus praktiziert. Hierzu wurde die Maus zuerst getötet und danach mit ImiGEL nach Protokoll (s. Kapitel 3.4.2.1) bearbeitet. Nach drei Stunden wurde die Haut entsprechend prozessiert und analysiert. In Abbildung 42 sind deutliche Unterschiede zu den vorherigen Ergebnissen zu sehen. Die Überreste am Handschuh lagen um 35 % höher als im vorherigen Versuch, wobei hier kein Zusammenhang zwischen toter und lebender Haut

besteht. Der Überschuss auf der Hautoberfläche lag um 45 % höher als das gemittelte Ergebnis aller vorherigen Versuche. Die Analyse der Klebestreifen ergab einen ca. 68 %igen Abfall des Gehalts für Imiquimod, während die Hautschichten unter dem Stratum corneum fast 98 % weniger Wirkstoff aufgenommen haben. Rein rechnerisch würde eine Differenz von 44 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ auf die tieferen Hautschichten.

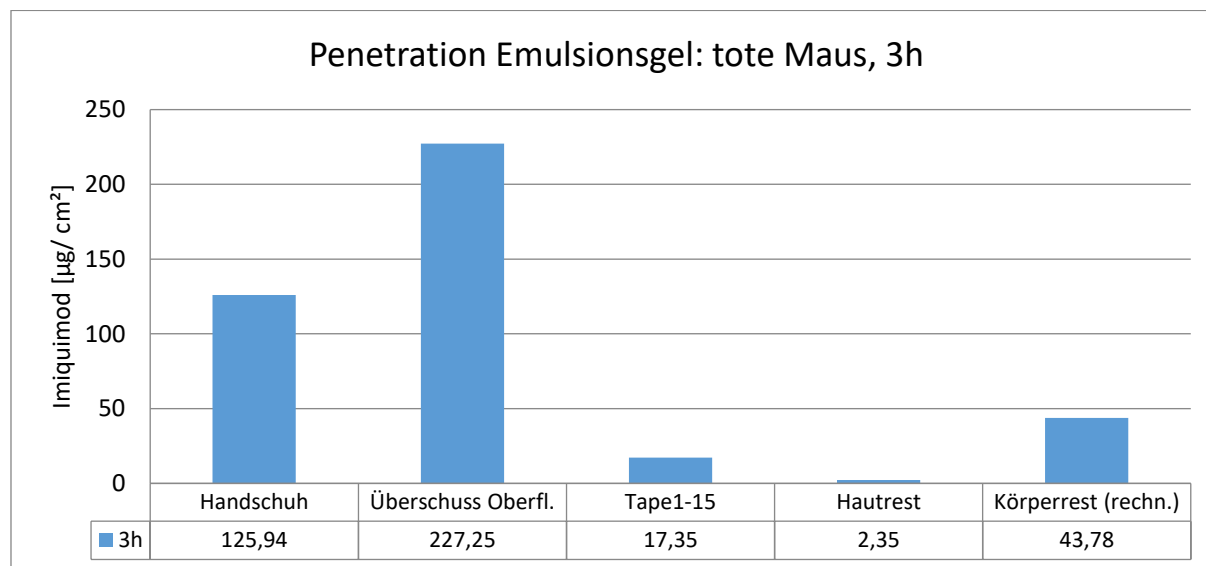


Abbildung 42 Analyse des physiologischen Einflusses

Untersuchung der Penetration von Imiquimod am Beispiel von ImiGEL (n=1) durch totes Gewebe. Die Maus wurde vor Auftragung geopfert und entsprechend oben beschriebenen Muster präpariert und analysiert.

Schwein

Auch bei den Versuchen am Schweineohr wurde die Praktikabilität der Versuchsreihe vorab überprüft. Hierzu wurden Literaturwerte bezüglich der Anzahl von Tesafilm®-Abrissen übernommen (87). Bei eigener Betrachtung der Gefrierschnitte stellte sich allerdings heraus, dass 20 Abrisse ausreichen, um das Stratum corneum zu entfernen (vgl. Abbildung 43 A, C-E). Darüber hinaus wurde festgestellt, dass die Haare des Schweineohrs nicht mit einem elektrischen Rasierer entfernt werden sollten, da wie in Abbildung 43 B dargestellt, das SC bereits abgelöst wird. Es empfiehlt sich stattdessen die Haare mit einer Schere abzuschneiden. Inwiefern sich das Einfrieren der Ohren auf den Zustand des *Stratum corneums* auswirkt, konnte an dieser Stelle nicht abschließend bearbeitet werden.

Aufgrund der dickeren Haut im Vergleich zur Maus wurden die Zeitpunkte der Probenahme am Schweineohr auf 1 Stunde, 3 Stunden und 5 Stunden festgelegt und je Ohr drei Felder präpariert (siehe Abbildung 23). Die Beladung der Haut mit Formulierung war identisch zum Vorversuch (416,67 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ Imiquimod). Die Ergebnisse des *Tape-Strippings* wurden in Abbildung 44 und Abbildung 45 einzeln aufgelistet, sowie zu einer Fraktion zusammengeführt.

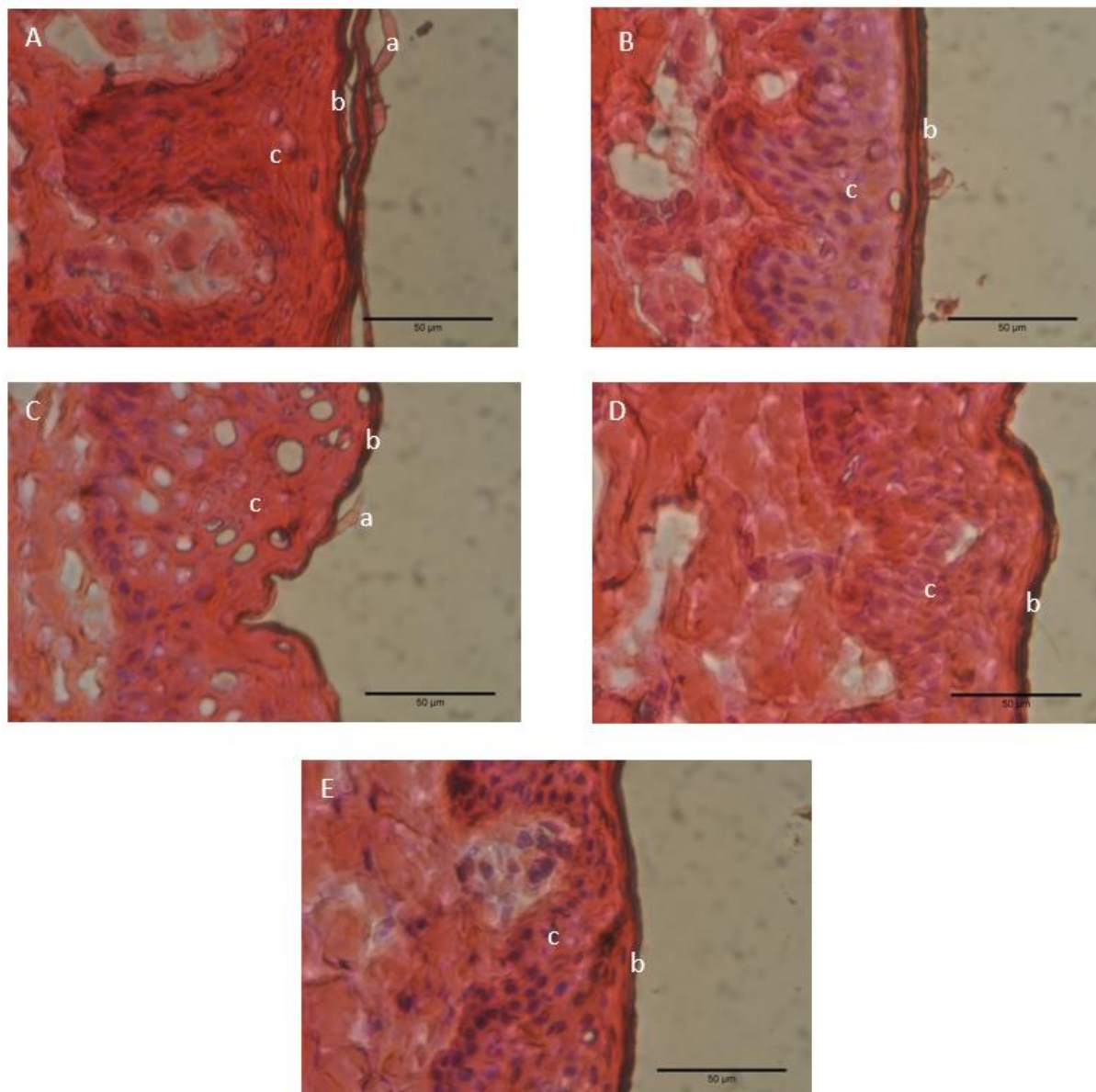


Abbildung 43 Querschnitte des Schweineohrs nach einstündiger Einwirkung von ImiGEL. Anschließendes Anfärben durch HE-Lösung und 400fache Vergrößerung ermöglicht eine Differenzierung der Hautschichten. Der Skalierungsbalken gibt 50 µm an. A Kontrolle, unrasiert. B Kontrolle, rasiert. C Nach zehn Tesa®-Strips. D Nach 20 Tesa®-Strips. E Nach 30 Tesa®-Strips. a Stratum corneum SC, b Stratum granulosum SG, c Stratum spinosum SS.

Bei Verwendung von ImiGEL fällt vordergründig der hohe Verlust an der Oberfläche auf. Mit zunehmender Tiefe und Zeit enthält das SC (Strips 1-20) einen Wirkstoffgehalt von ca. 70 µg/cm². Die tieferen Hautschichten können nach maximaler Versuchszeit nur 1,86 µg bzw. unter der Epidermis nur 1,66 µg Imiquimod pro Fläche aufweisen. Aldara® als Vergleichspräparat, zeigte mit der größten Fraktion auf der Oberfläche ein ähnliches Bild. Die Penetrationsmengen an Wirkstoff liegen in umgekehrter Form zu ImiGEL vor. Während hier die Wirkstoffdeposition mit der Zeit zunimmt, fällt diese bei Aldara® über die Zeit ab. Bis auf den Ein-Stunden-Wert (37,07 µg/cm²) liegen die Konzentrationen im Vergleich zur Gel-Zubereitung weit darunter. In beiden Fällen sind die Verluste an Zubereitung durch die Anwendung selbst bzw. durch Fehler während der Durchführung vergleichbar mit den ermittelten Ergebnissen in der Maus.

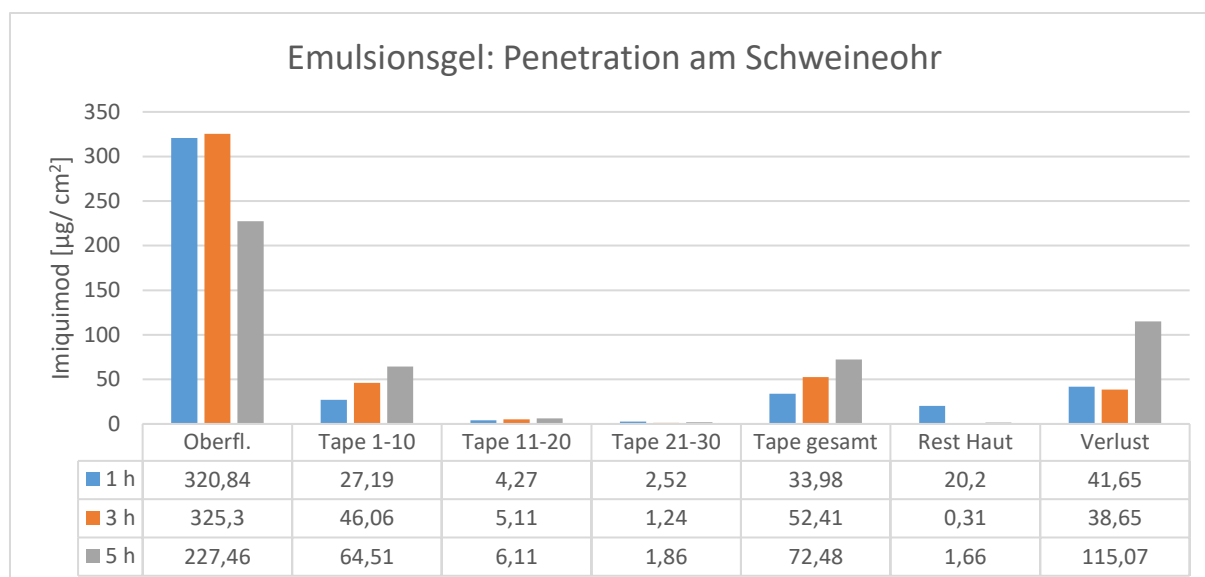


Abbildung 44 Penetration ImiGEL am Model Schweineohr

Die Klebestreifen sind kumuliert in Zehnerschritten als auch summiert (Tape gesamt) dargestellt. Ausgehend von einem Auftrag von $416,67 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ stellt die Oberflächenfraktion den größten Anteil mit ca. 75 % nach 3 Stunden und ca. 55 % nach 5 Stunden dar.

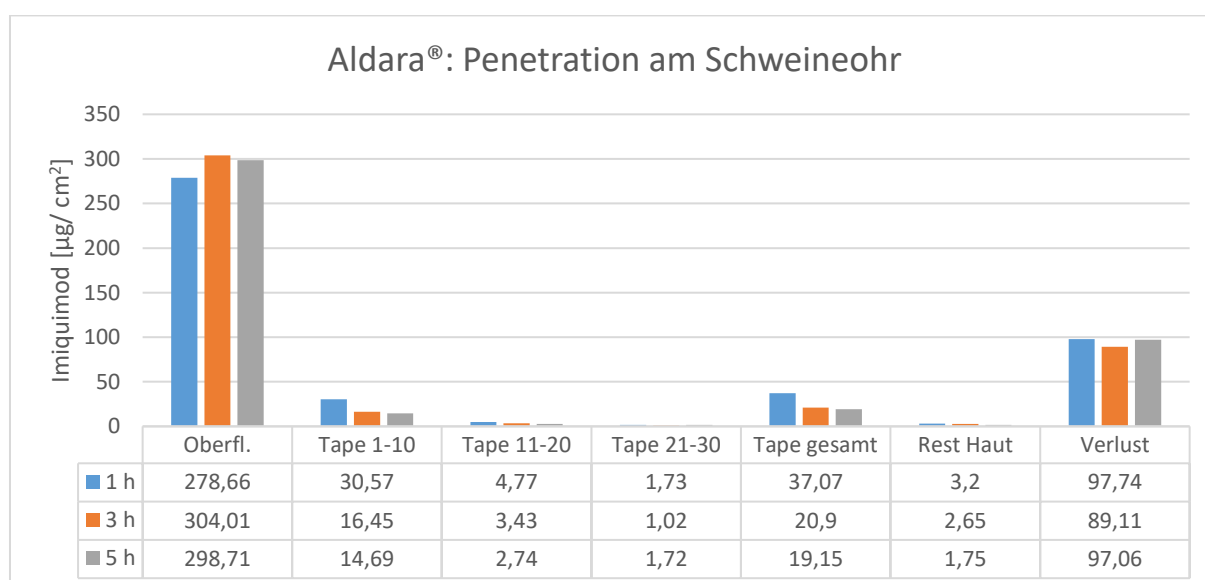


Abbildung 45 Penetration von Imiquimod aus Aldara® am Modell Schweineohr

Auch hier erfolgt die Darstellung der Klebestreifen sowohl kumuliert als auch in Summe. Es ergibt sich ein ähnliches Fraktionsbild wie bei der Auswertung von ImiGEL.

4.5 Betrachtung der chemischen und mikrobiologischen Stabilität von ImiGEL

Unter Intermediate-Konditionen (30 °C/ 65 % r. F.) gelagert, wurden nach einem halben Jahr Untersuchungen zur chemischen sowie mikrobiologischen Stabilität durchgeführt. Hierzu wurde eine Validierungscharge monatlich nach Herstellung auf Gehalt getestet und zu den Zeitpunkten T1 (ein Monat nach Herstellung), T3 (drei Monate nach Herstellung), und T6 (sechs Monate nach Herstellung), auf mikrobiellen Befall untersucht. Die Ergebnisse wurden in Tabelle 31 zusammengefasst. Akzeptanzkriterien für die chemische Stabilität wurden auf 85-115 % Gehalt Wirkstoff festgesetzt und konstant eingehalten. Es wurde kein Abbau festgestellt. Selbst zu einem späteren Zeitpunkt von acht Monaten wiesen die vermessenen

Proben noch einen Gehalt von 98 % auf (Daten nicht gezeigt). Die Akzeptanzkriterien der Mikrobiologie wurden entsprechend Ph.Eur., wie folgt festgelegt: TAMC $\leq 10^2$ KBE/ g und TYMC $\leq 10^1$ KBE/ g Zubereitung (38). Weiterhin war die Abwesenheit von *P.aeruginosa* und *S.aureus* gefordert. Zusätzlich wurden von BioChem GmbH Ergebnisse zu sonstigen Keimen pro g Zubereitung aufgeführt.

Tabelle 31 Zusammenfassung der chemischen und mikrobiellen Stabilität von ImiGEL

Die Zeitpunkte geben die Zeit nach Herstellung in Monaten an. Eine engmaschige Überprüfung der Keimzahlen ist aus biologischer Sicht nicht sinnvoll und wurde demnach bei Beginn, Mitte und Ende der Versuchsreihe durchgeführt. Aus organisatorischen Gründen wurde die mikrobielle T0-Messung auf T1 verschoben. N.b. nicht bestimmt.

Zeitpunkt	Chemischer Gehalt Imiquimod [% gegen Standard]	Mikrobiologische Kontamination	Sonstige Keime
T0	99,85	n.b.	n.b.
T1	100,07	Entspricht den Anforderungen	Nicht nachweisbar
T2	100,03	n.b.	n.b.
T3	100,05	Entspricht den Anforderungen	Nicht nachweisbar
T4	100,03	n.b.	n.b.
T6	100,08	Entspricht den Anforderungen	Nicht nachweisbar

MW (T0-T6)	100,02
STAW (T0-T6)	0,09
CV	0,09

Die Untersuchung zeigt, dass die Zubereitung über 6 Monate einen gemittelten Gehalt von 100 % \pm 0,1 % besitzt und daher eine chemische Stabilität als gewährleistet anzusehen ist. Sofern die Zubereitung also bei Raumtemperatur gelagert wird, erfüllt die Formulierung innerhalb des Zeitraums von Herstellung bis Anwendung durch den Probanden die Qualitätsanforderungen.

Die Produktion von ImiGEL fand in einer Reinraumklasse D statt und wurde durch hausinterne mikrobielle Analytik während der Produktion überwacht. Eine Freigabe der Produktion erfolgte nach bestandener Ermittlung der Keimzahlen der eingesetzten Sedimentations- und Abklatschplatten der Räumlichkeiten sowie der Hände der Herstellenden. Diese Freigabeprüfung (Daten nicht gezeigt) sowie die Prüfungen nach einem halben Jahr wurden bestanden. Zusätzliche Keimbelastungen bezogen auf ein Gramm Rezeptur wurden nicht festgestellt. Die Prüfberichte der BioChem GmbH liegen der Anlage 12.4 bei.

4.6 Anbruch-Stabilität und Konservierungsmittelbelastungstest (KBT)

Zur Durchführung des KBT wurde die originale Rezeptur (0,04 % Parabengehalt) nach Ph.Eur. 5.3.1 mit je einem Inokulum von *P.aeruginosa*, *S.aureus*, *C.albicans* und *A.brasiliensis* mit definierter Keimzahl beimpft. Die Prüfung gilt als bestanden, wenn eine definierte Keimzahlreduktion innerhalb eines bestimmten Zeitraums erfolgt ist. Geplant waren eine Blindwertbestimmung zu T_0 und die eigentliche Prüfung zu $T_{4\text{Wochen}}$. Innerhalb des Zeitraums von 28 Tagen sollten einer Tube zwölf Anwendungseinheiten á 250 mg entnommen und so das geplante Medikationsschema simuliert werden. Der Nachweis der ausreichenden Konservierung konnte bereits für den 0,04 %igen Blindwert nicht erbracht werden, sodass zum einen die eigentliche Prüfung gestrichen und zum anderen drei weitere höher konservierte Zubereitungen (0,07 %, 0,1 % und 0,15 %) entsprechend Prüfvorschrift getestet wurden. Auch hier fand nur eine Blindwert-Bestimmung statt, da auch diese den Vorgaben nicht entsprach. Tabelle 32 fasst die Endergebnisse der Blindwertbestimmungen zusammen; die Prüfberichte sind dem Anhang 12.4 zu entnehmen.

Tabelle 32 Ergebnisse KBT der Blindwert-Chargen nach 28 Tagen

Grün hinterlegte Felder haben die Prüfung bestanden, rote Felder entsprechen nicht den Vorgaben des europäischen Arzneibuches. Überprüft wurde die Wirksamkeit steigender Konzentrationen an Konservierungsmittel von 0,04-0,15 %.

Keim	Anzahl der Beimpften KBE/ ml oder g	Anzahl der KBE nach 28 Tagen				Vorgabe Ph.Eur.
		0,04 %	0,07 %	0,1 %	0,15 %	
<i>P.aeruginosa</i>	10 ⁵ -10 ⁶	< 100	< 100	< 100	10 ⁵	Entspricht nicht den Anforderungen
<i>S.aureus</i>		10 ²	10 ³	10 ³	10 ³	Entspricht nicht den Anforderungen
<i>C.albicans</i>		10 ⁴	10 ²	< 100	10 ⁵	Entspricht nicht den Anforderungen
<i>A.brasiliensis</i>		10 ⁵	10 ⁴	10 ⁴	10 ⁴	Entspricht nicht den Anforderungen

Differenzierter betrachtet konnten die Proben 0,04 % und 0,1 % Gehalt an Konservierungsmittel die besten Ergebnisse erzielen, wobei alle Formulierungen letztendlich den Vorgaben nicht entsprachen (vgl. Tabelle 35). Ausgehend von diesen Ergebnissen wurde eine Aufbrauchsfrist von maximal 14 Tagen von behördlicher Seite bestimmt, sofern ein entsprechender Test zur Anbruch-Stabilität durchgeführt und bestanden würde. Hierzu wurde identisch zur mikrobiellen Langzeitstudie eine Keimzählung zu den Zeitpunkten T_0 , $T_{1\text{Woche}}$ und $T_{2\text{Wochen}}$ ab Produktion über drei Chargen durchgeführt, wobei innerhalb dieser beiden Wochen sechs Produktentnahmen je Charge entsprechend Medikationsplan simuliert wurden.

Tabelle 33 Ergebnisse mikrobieller Befall nach Anbruch

Hierbei wurde eine Produktentnahme entsprechend Medikationsplan simuliert.

Charge	Mikrobiologische Kontamination		
	T_0	T_1 Woche	T_2 Wochen
A	Entspricht den Anforderungen	Entspricht den Anforderungen	Entspricht den Anforderungen
B	Entspricht den Anforderungen	Entspricht den Anforderungen	Entspricht den Anforderungen
C	Entspricht den Anforderungen	Entspricht den Anforderungen	Entspricht den Anforderungen

Aus den in Tabelle 33 zusammengefassten Ergebnissen geht hervor, dass die Vorgaben der Ph.Eur. erfüllt wurden und eine Verwendung des Präparates innerhalb von zwei Wochen nach Anbruch mikrobiologisch stabil und damit unbedenklich ist. Die Chargenergebnisse liegen je Keim und Charge unter 10 KBE/g und weisen keine weitere Kontamination auf. Die detaillierten Prüfberichte zu Konservierungsbelastungstest und mikrobiellem Befall sind der Anlage 12.4 im Anhang zu entnehmen.

4.7 Penetration von ImiSOL

Maus

Die Auftragung von ImiSOL auf lebende Maushaut führte zu einem ähnlichen Ergebnis wie bei ImiGEL. Die Verluste am Handschuh mit 70 µg lagen nahezu identisch hoch und beweisen mit der konstanten Datenreihe inklusive dem Standardpräparat Aldara® einen systematischen Fehler. Die mit Watte abgenommenen Formulierungsreste liegen mit 288 µg bis 184 µg zum jeweiligen Probenzug höher als bei ImiGEL und Aldara®, aber niedriger im Vergleich zum toten Gewebe. Die gefriergetrocknete Rezeptur schafft es nicht in gleichem Maße in das Gewebe einzudringen und weist im direkten Vergleich zu den anderen beiden Formulierungen weniger Wirkstoff innerhalb der oberen Hautschichten (Klebestreifen) und der restlichen Haut auf. Entsprechend höher ist der rechnerische Verlust an das Kompartiment „Körperrest“.

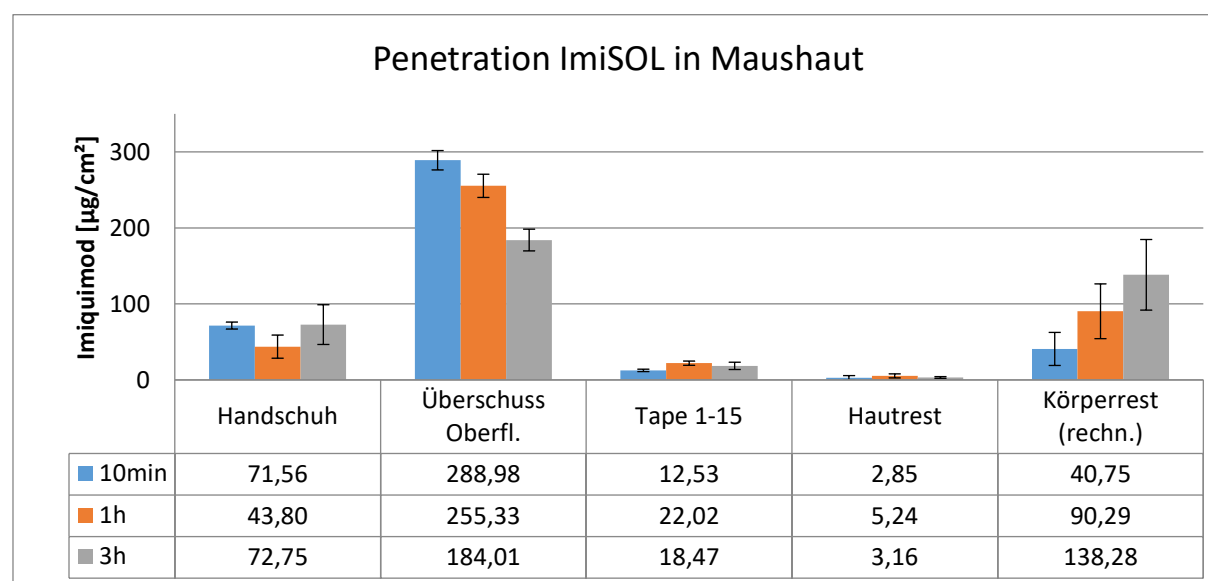


Abbildung 46 Penetrationsverhalten von ImiSOL auf lebende Maushaut (n=3)

Identisch zu den vorher durchgeführten Versuchen wurde der Gehalt an ImiSOL nach 10, 60 und 180 min in verschiedenen Gewebetiefen und den Handschuhen vermessen.

Rindereuter

Insgesamt wurden 60 Tesafilm®-Strips und 66 Kryogen-Schnitte in der HPLC auf Imiquimod Gehalt untersucht. Hierzu wurden die Proben jeweils dreifach vermessen und ein Mittelwert errechnet, der dann graphisch in den Abbildung 47 und Abbildung 48 dargestellt ist. Rationale hinter diesem Versuch war die generelle Praktikabilität zu überprüfen und ein zweites lebendes Modellsystem, neben der Maus, zu analysieren.

Innerhalb der Versuchszeit von fünf Stunden wurden weder Rötungen noch Reizungen durch ImiSOL auf der Euterhaut ausgemacht. Die Ergebnisse der Tape-Strips zeigen wie erwartet,

abhängig von Zeit und Gewebetiefe, eine Reduktion der Konzentration an Imiquimod. Die Kontrollmessungen auf unbehandelter Haut lieferten für die 2,5 Stunden-Serie keine Ergebnisse; nach 5 Stunden lagen die Gehaltsmessungen gemittelt über die gesamte Messtiefe bei $34,98 \text{ ng/cm}^2$. Nach Auftragung von $12,5 \text{ mg Imiquimod (ImiSOL)}$ wurden nach 2,5 Stunden insgesamt $896,75 \text{ ng/cm}^2$ wiedergefunden, sowie nach 5 Stunden ein kumulativer Gehalt von $388,83 \text{ ng/cm}^2$.

Die Aufbereitung der Kryogen-Schnitte wurde identisch zum Procedere der Klebefilme durchgeführt. Die Auswertung der $20 \text{ }\mu\text{m}$ dicken Hautschnitte erwies sich als Indikator zur Penetration des Wirkstoffs in tiefere Gewebsschichten und damit verbunden einer eventuellen ungewünschten systemischen Aufnahme. Während nur die ersten zwei bis drei Schnitte die Deposition in der Epidermis darstellen, zeigen die restlichen gemessenen Konzentrationen die Penetration tief in die Dermis und damit in kapillarisiertes Gewebe an. Generell verliefen die Profile wie erwartet und wie in den anderen Versuchen beschrieben, entsprechend einer Zeit-Gewebstiefen-Achse, mit abfallenden Konzentrationen. Wider Erwarten weist der erste Schnitt nach fünf Stunden eine mehr als doppelt so hohe Wirkstoffkonzentration auf, als nach der halben Beobachtungszeit. Im Verlauf gleichen sich die Wirkstoffkonzentrationen allerdings einander an. In den tieferen Schichten ($140\text{-}180 \text{ }\mu\text{m}$) kann nur zu Beginn Imiquimod gefunden werden, während die tiefsten Schichten zu keiner Zeit Wirkstoff beinhalten. Beide Kontrollflächen sind über den Versuchszeitraum frei von Wirkstoff.

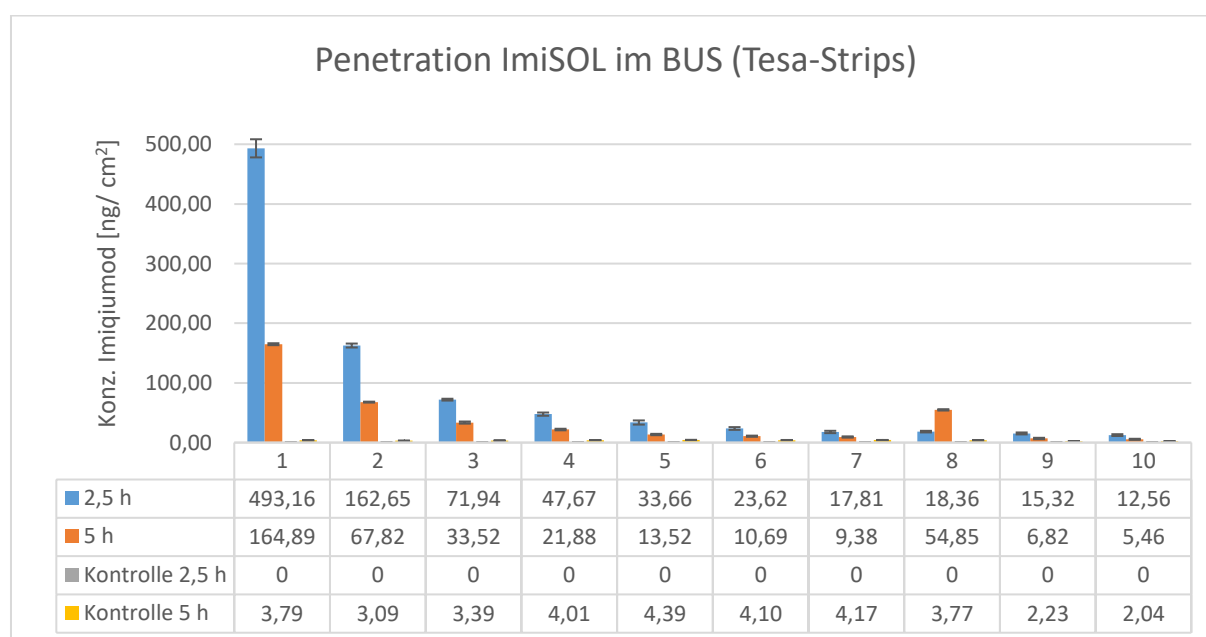


Abbildung 47 Gemittelte Werte aus der linken und rechten Euterhälfte
Auftragung von 250 mg ImiSOL auf 25 cm^2 . Je Seite wurden eine behandelte und eine Kontrollfläche per Tesa®-Strip-Methode analysiert ($n=1$). Auf die Darstellung der Kontrolle nach 2,5 h wurde verzichtet, da über das gesamte Tiefenprofil keine Wirkstoffspiegel ermittelt wurden. Die Analyse der 5-Stunden-Kontrolle zeigte durchweg eine leichte Kontamination mit dem Wirkstoff. Inwieweit es sich hier um Bearbeitungsfehler am Euter, in der Analytik oder aber Transporte innerhalb des lebenden Systems Euter handelt, konnte nicht aufgeklärt werden. Die Abkürzung BUS steht für Bovine Udder System.

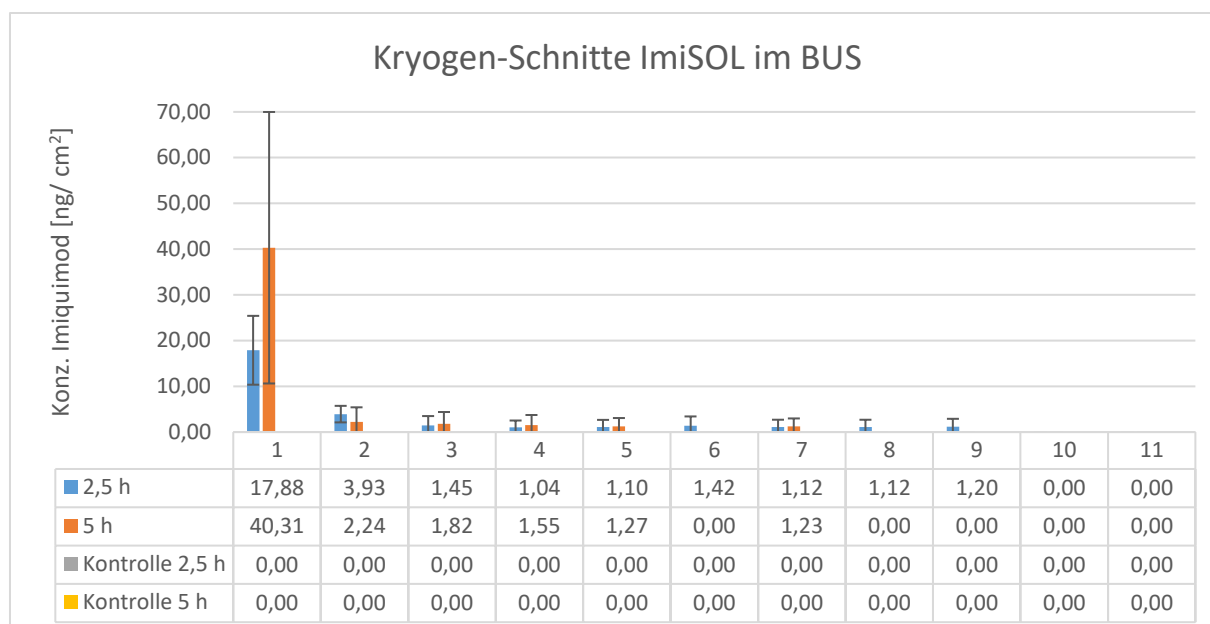


Abbildung 48 Kryogen-Schnitte des Rindereuters

Nach Anfertigung von 10 mm Biopsie-Stanzen ($n=1$) wurden insgesamt 66 Schnitte je 20 μm Dicke parallel zur Hautoberfläche durchgeführt. Dargestellt sind die gemittelten Konzentrationen Imiquimods (ImiSOL) aus der linken und rechten Euterhälfte.

4.8 Partikelgrößenbestimmung im DLS und NTA

Die Soll-Partikelgröße von ImiSOL wurde in der Herstellungsanweisung mit $600 \text{ nm} \pm 200 \text{ nm}$ spezifiziert. Zur Überprüfung dieses Parameters, wurden zwei Messgeräte vergleichend verwendet und eine Methode entwickelt, die später in eine In-Prozess-Kontrolle umgesetzt wurde. Vermessen wurde eine wässrige Imiquimod-Sucroseester-Suspension vor und nach dem Mahlen sowie nach 24 Homogenisations-Schritten entsprechend der Herstellungsverfahren mit $8 \times 500 \text{ bar}$, $12 \times 1000 \text{ bar}$ und $4 \times 1500 \text{ bar}$. Zur Vermessung der Partikel wurde die Mahlsuspension vor Versuchsstart von $16,67 \text{ mg/ml}$ auf 1 mg/ml Wirkstoff mit demineralisiertem Wasser verdünnt. Sie konnte allerdings nur im DLS vermessen werden, da die Partikel zu stark reflektierten, um eine Messung per Kamera zu ermöglichen. Durch die Spiegelungen entstanden Lichtbögen um die eigentlichen Kristalle, die wiederum als eigenes Partikel erkannt wurden. So erzeugte ein einzelnes Korn mehrere Scheinpartikel, die die Auswertung verfälschten. Um dennoch eine Auswertung zu ermöglichen, wurden drei Verdünnungen hergestellt und nach arithmetischem Mittel analysiert. Der Zerkleinerungsgrad (ZG, vgl. Gl. 1) wurde durch Division der Ausgangskorngröße durch die Korngröße nach Zerkleinerung erhalten und in Tabelle 34 angegeben. So stellt ZG 1 die Zerkleinerung der Mühle und ZG 2 die des Emulsiflex dar.

Der Zetasizer gibt für alle drei Fraktionen einen Polydispersitätsindex (PDI) von weit über 0,3 an, wobei dieser mit jedem Zerkleinerungsschritt abnimmt. Ein PDI über 0,3 deutet auf eine polydisperse Verteilung hin, sodass ein unter 0,3 liegender Wert erstrebenswert ist. Durch Homogenisierung kann eine Reduzierung der Korngröße um das Dreifache des vorher erhaltenen Mahlkorns erzielt werden. Die gemessene Partikelgröße nimmt von ca. $2 \mu\text{m}$ auf ca. 500 nm ab und befindet sich damit innerhalb der gewünschten Kriterien.

Ausgehend von einer homogenen Verteilung verschieden großer Partikel in der Mahlsuspension, können nach notwendigem Verdünnungsschritt für die gemittelten Proben der NTA-Messung ein ZG_1 von 1,05 und ein ZG_2 von 1,25 berechnet werden. Die

Partikelgrößen reduzieren sich innerhalb dieser Messmethode von gemittelten 316,87 nm auf 304,1 nm und schließlich auf 247,13 nm.

Ein Vergleich der beiden Methoden ist mit dem hier gewählten Setting nicht möglich. Während die hohen Konzentrationen nur im Zetasizer analysierbar sind, verzerrt der Nanosight durch den notwendigen Verdünnungsschritt das Ergebnis zugunsten kleiner Partikel. Eine Vermessung der Verdünnungsreihen mit Hilfe des DLS zeigte ähnlich kleine Feststoffgrößen mit dem Software-Hinweis einer zu starken Verdünnung der Probe.

*Tabelle 34 Partikelgrößen nach Mahlung und Homogenisierung
Aufführung nach Messgerät bzw. Methode. ZG Zerkleinerungsgrad.*

DLS	Konzentration [mg/ ml]	Roh	Mühle	HDH	ZG 1	ZG 2
z-Average	1	1973 nm	1708 nm	490,9 nm	1,155	3,479
PDI	-/-	1	0,917	0,368	-/-	-/-

NTA						
Mean	0,03	370,8 nm	285 nm	288,1 nm	1,301	0,989
Mean	0,01	278,6 nm	316,1 nm	208,9 nm	0,881	1,513
Mean	0,005	301,2 nm	311,2 nm	244,4 nm	0,968	1,273

5 Diskussion

5.1 HPLC Validierung

Als Grundlage der meisten in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen, diente die Bestimmung der jeweiligen Stoffkonzentration durch Flüssigchromatographie in Kombination mit einer UV-Detektion. Entsprechend wurden HPLC-Methoden für den Wirkstoff, seine Verunreinigungen und die Konservierungsmittel aus der Literatur recherchiert.

Imiquimod und seine Verunreinigungen

Das Hauptaugenmerk lag auf der Validierung der HPLC-Analytik von Imiquimod. Eine Recherche zur Gehaltsbestimmung ergab eine Vielzahl an Methoden, die seit 2000 veröffentlicht wurden. *Soria et al.* beschrieb zur Jahrtausendwende eine Bestimmungsmethode von Imiquimod aus dem humanen Serum nach oraler und subkutaner Gabe (88). *Harrison et al.* analysierten vier Jahre später Urin- und Serumproben nach topischem Auftrag einer halbfesten Imiquimod-Formulierung (89). 2010 gelang es *Kulp et al.* (45) Imiquimod und seine Hauptmetabolite S-26704 und S-27700 aus Human-Serum zu bestimmen. Die Extraktion durch Proteinpräzipitation verlief nach einer Methode, die durch Hanke entwickelt wurde (90). Alle drei verwendeten ein LC-MS-System, das untere Bestimmungsgrenzen von 50-100 pg/ ml ermöglichte. Linearität, Präzision und Richtigkeit lagen weit unter den selbstgesteckten Akzeptanzkriterien von 20 %. 2006 veröffentlichte *Donnelly et al.* (91) seine Arbeiten zur Untersuchung der Penetration und Permeation von Imiquimod aus einem Pflaster. Hierzu verwendete er eine Kombination aus HPLC und Fluoreszenz-Detektor, die er aufgrund der Arbeiten von *Skoog* (92) als sensibler gegenüber einer UV-Detektion darstellte. Dieser Arbeit stellte *De Paula* (93) 2008 eine neu entwickelte UV-Methodik entgegen und präsentierte eine validierte Kalibriergerade von 20-800 ng/ ml Imiquimod. Er analysierte den Stofftransport durch Schweineohrhaut aus drei verschiedenen Propylenglycol-Wasser-Mischungen im Franz-Zell-Modell und konnte für die wichtigsten analytischen Parameter Variationskoeffizienten von jeweils unter 2 % erreichen. Hierbei stellte er die Wichtigkeit von Mindestmengen an Acetonitril und Diethylamin im Fließmittel heraus, um eine Retentionszeit von vier Minuten zu generieren. *Gogoll et al.* etablierte 2014 (59) eine eigene Analytik mittels UV-Detektion und einer Fließmittelzusammensetzung aus Acetonitril, Wasser und Trifluoressigsäure. Die Retentionszeit lag in diesem Setup bei 5:30 Minuten. Bereits 2011 erfolgte die hier verwendete Veröffentlichung des *authorised USP Pending Monograph* zu *Imiquimod Cream*. Nach einer kurzen Sichtungs- und Umsetzbarkeitsstudie konnte aufgrund der technischen Gegebenheiten die Methodvalidierung nur mithilfe der USP erfolgreich abgeschlossen werden. Entsprechende Monographien im europäischen Arzneibuch zur Bestimmung von Imiquimod wurden noch nicht veröffentlicht.

Ebenso wenig macht die Ph.Eur. Vorgaben zur Bestimmung der Verunreinigungen von Imiquimod. Die HPLC-Bestimmung der fünf Imiquimod related compounds A-E wurde bisher nur in der USP-Vorschrift und zwei weiteren Veröffentlichungen behandelt (94; 95).

Das amerikanische Arzneibuch stellte 2011 innerhalb der gleichen Monographie *Imiquimod Cream* eine umständliche Methode mit drei zeitlich koordinierten Fließmittelzusammensetzungen auf, die eine Gesamtdauer von ca. 50 min in Anspruch nimmt. *Hussain et al* (94) entwickelte die Analyse 2016 weiter und konnte mit gleichem Säulen-Setup eine Halbierung der Analysenzeit, sowie die Reduzierung von drei auf zwei

Fließmittelkomponenten erreichen. Während die USP ein Phosphatpuffersystem mit oberflächenaktiven Komponenten einsetzt, erweiterte *Hussain* den Phosphat-Puffer, in Anlehnung an *De Paula's* voran gegangenen Erfolge, um 0,1 % Triethylamin. Ein dritter, eigenständiger Ansatz mit Trifluoressigsäure konnte die Methodenzeit nochmals mehr als halbieren, scheiterte allerdings in der Validierungsphase. Aus Gründen der vorhandenen Technik und der Einheitlichkeit bezüglich der Methodenvorschrift wurde trotz des hohen Zeitaufwands die USP-Methodik umgesetzt und erfolgreich etabliert.

Eine Gegenüberstellung der Literaturdaten und der hier aufgeführten Ergebnisse zeigt eine gute Übereinstimmung in Bezug auf den validierten Konzentrationsbereich unter Verwendung der UV-Detektion. Für Imiquimod wurde dieser bei 20-800 ng/ ml beschrieben, während die hier vorgestellte Validierung von 35-1791 ng/ ml reichte. Mit einem validierten *Limit of Quantification* von 0,4 µg/ ml für alle Verunreinigungen konnten die Literaturwerte (IRC-A 1,75 µg/ ml, IRC-B 2 µg/ ml, IRC-C 0,75 µg/ ml, IRC-D 2,25 µg/ ml, IRC-E 5,25 µg/ ml) ebenso bestätigt bzw. deutlich unterschritten werden. Somit liegen die vorgestellten Ergebnisse mittels UV-Detektion im Bereich der veröffentlichten Analytik oder darunter. Generell war dieses Ergebnis aber aufgrund der verwendeten Arzneibuchmethode zu erwarten gewesen.

Parabene

Die Alkylester der p-Hydroxybenzoesäure werden heutzutage vielfältig eingesetzt. Neben der Kosmetik als Haupteinsatzgebiet, finden die vielfältigen Paraben-Derivate Anwendung in pharmazeutischen Produkten und vermehrt in Lebensmitteln. Aufgrund ihrer ähnlichen chemischen Struktur zu Östrogen wird eine entsprechende Wirkung auf das hormonale System diskutiert. *Harvey et al.* (96) behandelte bereits 2004 den Einfluss von parabenhaltigen Deodorants auf die Entwicklung von Brustkrebs. Des Weiteren wird den Paraben ein allergenes Potential zugesprochen (97). Die dermalen Resorptionsraten steigen mit zunehmender Seitenkettenlänge an, wobei die Metabolisierung und Elimination zur nicht endokrin wirksamen Para-Hydroxybenzoesäure (PHBA) im Menschen nicht vollständig abläuft (98). Biomonitoring-Studien von *Ye et al.* (2006), *Janjua et al.* (2008), *Carwile et al.* (2009) und *Frederiksen et al.* (2010) ergaben nachweisbare Mengen für Methyl-, Ethyl-, Propyl-, Butyl- und Benzylparaben in Urin und Plasma für unterschiedliche Bevölkerungsgruppen. 2011 veröffentlichte das Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) eine Stellungnahme bezüglich des Einsatzes von Paraben in kosmetischen Mitteln. (98) Während ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Brustkrebs und der Verwendung von parabenhaltigen Deodorants laut BfR nicht nachvollzogen werden konnte, wurden dennoch Empfehlungen zur Verwendung der p-Hydroxybenzoesäureester veröffentlicht. Auf die Verwendung von Isopropyl-, Isobutyl-, Pentyl- und Phenylparaben sollte bspw. vollständig verzichtet werden bis hierzu eine gesundheitliche Bewertung vorliegt. Butyl- und Propylparaben wurden auf je 0,19 % der Gesamtrezepitur aufgrund der schlechten Datenlage bezüglich dermalen Resorption, Metabolismus und Expositionsabschätzung beschränkt. Für Methyl- und Ethylparaben wurden Konzentrationen bis 0,4 % als sicher bewertet, wobei die Anwendung bei Kindern auch berücksichtigt wurde. Trotz der Anwendungsbeschränkung stellte das BfR klar, dass einige der üblich verwendeten Konservierungsmittel ein deutlich höheres allergenes Potenzial als Parabene besitzen. Ein genereller Ersatz von Paraben in kosmetischen Mitteln wird aus gesundheitlicher Sicht nicht für sinnvoll erachtet.

Aufgrund der oben genannten maximalen Konzentrationen war die Etablierung einer analytischen Methode unumgänglich. Es wurde nach einer möglichst einfachen Parallelbestimmung für beide Ester gesucht, die mit den gegebenen technischen Möglichkeiten umzusetzen war. Beide ICH-Monographien für Methyl- und Propylparaben

befinden sich derzeit im sechsten von sieben Harmonisierungsschritten. Sie decken sich in verwendeter Säule, Fließmittel und System-Anforderungen sowie den Akzeptanzkriterien, so dass eine parallele Bestimmung möglich wäre. Die Retentionszeiten werden im vorgeschriebenen Methanol-Phosphatpuffersystem mit 2,3 min (MP) und 4,5 min (PP) angegeben (99; 100). 2011 veröffentlichte *Kumar et al.* (101) eine Bestimmungsmethode für die vier Derivate C₁, C₂, C₃ und C₄ aus einer Acetonitril-Wasser-Mischung mit einem Konzentrationsbereich von 10-30 µg/ ml. Mit Hilfe verschiedener C₁₈ RP-Säulen und eines HPLC PDA (Photo Diode Array) Detektors konnten sie die Stoffmengen arzneibuchgerecht bestimmen. Zwei Jahre später entwickelte *Antakli et al.* (102) verschiedene Methoden, um sowohl Methyl- und Propylparaben, als auch deren Natriumsalze simultan auf einer C₁₈ RP-Säule zu analysieren. Ein pH-Wert von 4 wurde als wichtig eingestuft, um alkalische wie saure Hydrolyse-Reaktionen zu verhindern. Dementsprechend wurde ein Fließmittel auf Acetatpuffer-Methanol-Basis und ein weiteres auf Acetatpuffer-Acetonitril-Basis verwendet. Der Validierungsbereich umfasste für Methylparaben die Konzentrationen 20-200 µg/ ml und für Propylparaben 4-40 µg/ml. LOD sowie LOQ wurden aus der Kalibrierkurve berechnet und liegen für PP niedriger als MP. Die Bestimmung einer separaten Kalibrierkurve für das C₃-Derivat macht insofern Sinn, da Propylparaben wie bereits erwähnt, in geringeren Konzentrationen verwendet werden darf und damit auch die Analytik diese erfassen muss. Bereits 2012 gelang es *Imamovic et al.* (82) die hier verwendete Analytik zu entwickeln. Mit Hilfe eines Diode Array Detektors (HPLC DAD) und einer C₈ RP-Säule konnte sie drei Paraben-Derivate aus verschiedenen Sonnencremes isolieren und analysieren. Die Analyten wurden innerhalb 30 min aus a) Acetonitril-Wasser bzw. b) Methanol-Wasser bestimmt. Zur Bestimmung der Kalibriergeraden wurden fünf Konzentrationen im Bereich 10-200 µg/ ml vermessen sowie LOD und LOQ berechnet.

Die Recherche zeigt eine Vielzahl an Methoden, die mehr oder weniger einen gleichen Level an Genauigkeit ermöglichen. Die in dieser Arbeit durchgeführten Analysen können aufgrund der leichten Verschiebung des Kalibrierbereiches in den niedrigeren Bereich und der Verwendung eines UV-Detektors, als Bestätigung der Robustheit der Methode verstanden werden. Schwachpunkt der dargestellten Ergebnisse, ist der momentane validierte Konzentrationsbereich von 2-37 µg/ ml. Berechnet auf 100 g einer 0,1 %igen Zubereitung (bezogen auf die Gesamtmenge an Parabenen) liegt der Gehalt für 4-Methyl-Hydroxybenzoesäure bei 75 µg, der Gehalt von 4-Propyl-Hydroxybenzoesäure bei 25 µg. Eine Analytik aber, die allein 100 g Zubereitung innerhalb einer Freigabeprüfung benötigt, macht aus finanzieller wie produktionstechnischer Sicht keinen Sinn. Entsprechend muss der kalibrierte Bereich, bezogen auf ein Gramm einer 0,1 %igen Rezeptur, in einen Konzentrationsbereich von 1-10 ng/ ml verschoben werden. Ausgehend von *Imamovic's* (82) berechneten LOD-Werten von 35 (MP) bzw. 9 (PP) ng/ ml sowie LOQ-Werten von 116 (MP) bzw. 31 (PP) ng/ ml scheint eine Realisierung weder mit einem UV- noch einem Dioden-Setup realisierbar. Dementsprechend ist der Wechsel auf alternative analytische Methoden zu empfehlen. *Sosvorova et al.* beispielsweise (103) gelang die simultane Bestimmung von fünf Paraben-Derivaten mit spezifischen LOQ-Werten von 172 und 171 pg/ ml für Methyl- und Propylparaben.

5.2 Reinigungsvalidierung Emulsiflex

Der Hochdruckhomogenisator hat ein breites Anwendungsfeld im Bereich der dispersen Systeme. So wird er einerseits zur gleichmäßigen Mischung nicht ineinander löslicher, kaum oder nicht mischbarer Komponenten, andererseits aber auch zur Anpassung der Partikelgrößen, also zur Zerkleinerung eingesetzt. Anwendungsbeispiele hierzu wären homogenisierte Milch, liposomale Zubereitungen oder schonende Zellaufschlüsse tierischen oder pflanzlichen Ursprungs. Aufgrund dieser Vielseitigkeit muss eine validierte und ausreichende Reinigungsmethode vorhanden sein, um Kreuzkontaminationen bei einem Formulierungswechsel ausschließen zu können.

Der Nachweis der Praktikabilität und Stabilität der Methodik konnte erbracht werden. Die kombinierten Methoden der Erwärmung und des stetigen Druckwechsels können wiederholbar adhärierte Rezepturreste aus dem Leitungssystem des Emulsiflex C3 herauslösen. Zur Einschätzung der Effektivität mussten zwei Fragen beantwortet werden können: Ist die Methode geeignet um eine maximale Reinigung zu ermöglichen und sofern nicht, welches Risiko besteht bei Kreuzkontamination einer anderen Charge ImiGEL oder bei Formulierungswechsel? Zur Effizienz der Methode muss also vorerst anerkannt werden, dass die Verunreinigung des Gerätes mit den hier beschriebenen Verfahren nicht vollständig gereinigt werden konnte. Dies liegt zum einen in der Schwerlöslichkeit des Stoffes selbst begründet, als auch an der schwer erreichbaren kontaminierten Fläche des Geräts. Eine adäquate Reinigung könnte nur durch aufwendige, kostenintensive Methoden (bspw. Elektropolierung) oder aggressive Lösungsmittelmischungen erfolgen, die wiederum die Lebenserwartung des Emulsiflex C3 beeinträchtigen würden. Mithilfe dieser vergleichsweise sanften Methodik konnte der Restgehalt von 1 µg/ ml der Entwicklungsphase in der Validierungsphase wiederholt erreicht werden. Innerhalb der ersten zwölf Durchgänge zeigen die starken Gehaltsanstiege im fünften sowie neunten Durchgang deutlich wie stark die Adhäsionskräfte zwischen Stoff und Material ausgeprägt sind. Aufgrund der Tatsache, dass es sich bei diesem Versuch um die erste seriöse Reinigung seit Anschaffung des Geräts handelt, konnte hier nur durch „Langzeiteinwirkung“ des Lösungsmittels bzw. das Abtragen übergelagerter Schichten erneut größere Mengen an Wirkstoff ausgespült werden. In der folgenden Validierungsphase ist der starke Abfall zu einem Minimum binnen der ersten drei Läufe, mit einem anschließenden Anstieg des Wirkstoffgehalts während Durchlauf vier zu erkennen. Das Ergebnis der gemittelten Läufe B-3 und B-4 von 0,313 µg/ ml konnte in den folgenden Versuchen nicht wiederholt werden. Eine weitere Auswaschung von Wirkstoff fand nicht statt. Stattdessen zeigt die erste Spülung der darauffolgenden Reinigung einen höheren Startwert, als die vorherige oder die beiden folgenden. Dies könnte durch neue Adhäsion von Formulierung an frisch gesäuberte Oberfläche des Leitungssystems erklärt werden. Um die Differenz der gefundenen Endkontaminationen innerhalb der Validierungsphase zu erklären muss der Wirkstoffeintrag berücksichtigt werden. Betrachtet man die beiden Maxima, so zeigt Reihe B die geringste Belastung nach vier Waschgängen mit der niedrigsten Startbelastung an Zubereitung. Das umgekehrte Bild zeigt Reihe C. Durch Mittelwertberechnung und grafischer Auftragung kann die Effektivität der Methode unabhängig vom Startpunkt bewiesen werden. Nach Durchführung der vier Reinigungsläufe ist festzuhalten, dass das Procedere robust und stabil ist. Dennoch ist ein Endgehalt von ca. 1 µg/ ml als das Maximum der Reinigungsleistung anzusehen. Die steigenden Endverläufe der Kurven C-1, D-1 und E-1 zeigen eine zu diesem Zeitpunkt noch nicht abgeschlossene Reinigung an. Ähnlich dem Verlauf der Kurve A-5 scheint hier ein Ausreißer vorzuliegen.

Generell wird die dermale systemische Resorption von gelöstem Imiquimod im Menschen mit maximal 0,9 % der Dosis angegeben (44; 104; 105). Ausgehend von einer vollständigen Reinigung des Emulsiflex, würden bei erneuter Herstellung durch Adhäsion 20 µg Wirkstoff der Rezeptur im HDH verbleiben und folglich der Zubereitung fehlen. Dies macht bei einem Produktionsvolumen von 45 g je Charge einen Verlust von $0,9 \cdot 10^{-3}$ % Imiquimod aus. Ohne weitere Analysen kann davon ausgegangen werden, dass Anwendungsfehler durch den Anwender (s. Verlust Handschuh mit 20 %) zu höheren Verlusten führen, als herstellungsbedingte Einbußen Imiquimod. Das Herauslösen von adhärennten Wirkstoffpartikeln fällt somit nicht in therapeutische Bereiche. Zusätzlich sollte der Umstand berücksichtigt werden, dass die Resorptionsquoten nur auf gelöstes Imiquimod zutreffen. Im Falle von ImiGEL wird eine Suspension, also feste Partikel verwendet, die sehr viel langsamer systemisch aufgenommen werden können, da hier zunächst ein Lösungsschritt erfolgen muss. Sowohl Therapie als auch Patientenwohl werden somit aus produktionstechnischer Sicht nicht gefährdet. Dennoch sollte ein Kontaminationsrisiko bei Formulierungsverwechselung zumindest theoretisch behandelt werden. Ausgehend von einer liposomalen Impf-Formulierung (bspw. Influxac, 0,5 ml) und einer vollständigen Ablösung des 1 µg/ml Imiquimod, wird eine systemische Belastung von 0,5 µg des Immunstimulators erreicht. Die intravenöse letale Dosis wird für Makaken-Affen mit 6-8 mg/kg angegeben und stellt damit das 12000-fache der Verunreinigung dar. Symptome die innerhalb dieser Toxizitätsstudien beobachtet wurden waren Lethargie, Hypoaktivität und Emesis (106). Für den Menschen wurden bisher keine Daten zur intravenösen Gabe veröffentlicht. Die versehentliche einmalige orale Aufnahme von 200 mg Imiquimod, wird mit Nebenwirkungen wie Übelkeit, Erbrechen, Kopfschmerzen, Myalgien und Fieber beschrieben. Die klinisch schwerwiegendste Nebenwirkung, die nach mehreren oralen Dosen von mehr als 200 mg auftrat, bestand in Hypotonie, die sich nach oraler oder intravenöser Flüssigkeitsgabe normalisierte (40). Die Betrachtung der Wechselwirkungen von Imiquimod auf eine andere Formulierung und deren Inhaltsstoffe muss individuell zu gegebener Zeit abgeschätzt werden und wird hier aufgrund seiner Diversität nicht weiter behandelt. Abschließend wurde somit eine Methode entwickelt die einen ausreichend niedrigen Verschmutzungsgrad ermöglicht, um ein sicheres und qualitativ hochwertiges Arzneimittel zu produzieren.

5.3. Abrieb

Der Grundgedanke hinter diesem Versuchsblock, war die generelle Neigung aller Mühlen zum Abrieb. Dies kann durch Materialermüdung oder die Auswahl eines zu weichen Mahlwerkzeugs bedingt sein. Dies hat zur Folge, dass die erkrankte Haut des Anwenders mit mehr oder weniger Verunreinigung innerhalb der Zubereitung konfrontiert wird, die nicht originaler Bestandteil der Rezeptur ist. Dementsprechend wurde eine quantitative Überprüfung der Verunreinigung durchgeführt. Zirkoniumoxid wird vom Hersteller mit einer „Abriebfestigkeit: sehr gut“ bewertet, sowie für den Einsatz für faserige, abrasive Proben empfohlen (62). Zirkonia besitzt eine Mohshärte von 7-9 (Diamant = 10), ist nichtmagnetisch, wasserunlöslich, nicht giftig und gegen die meisten Säuren und Laugen sehr beständig. In der Zahnmedizin wird es aufgrund seiner hohen Festigkeit und Bruchzähigkeit bei guter Bioverträglichkeit zur Herstellung von Zahnimplantaten verwendet (107). Die experimentell erhaltenen Abriebmengen spiegeln diese Aussage wider. Während bei rein wässrigem Medium die Mahlkugeln ihre Energie nur auf sich selbst abgeben konnten und sich somit selbst zermahlten, wurde in Kombination mit der Wirkstoffsuspension die Kraft auf die

Pulverpartikel übertragen und fast 2,5fach weniger Abrieb erzeugt. Wird der gefundene mittlere Abrieb von 15,6 mg nun auf eine Charge von 45 g ImiGEL übertragen, ergibt sich eine Kontamination der einzelnen Anwendung mit 92,86 µg Zirkonia. Aufgrund der faktischen Unlöslichkeit in physiologischen Medien (Wasser, Hauttalg) kann von keiner dermalen Resorption ausgegangen werden. Ebenso werden meines Erachtens bei dreimaliger Anwendung pro Woche und anschließender Reinigung des Applikationsortes keine wirksamen Kumulationen erzielt. Allerdings ist bei Anwendung der Studienmedikation auf nicht intakter Haut die gestörte Hautbarriere zu beachten und bedarf somit besonderer Aufmerksamkeit durch die behandelnden Ärzte. Sollte es bei der Anwendung zu Hautausschlag oder Granulomen der betroffenen Hautpartien kommen, wird eine Unterbrechung der Medikation bis zum Abklingen der Symptome empfohlen (108). Bleibende Schäden sind nicht zu erwarten bzw. sind in der bestehenden Literatur noch nicht berichtet.

5.4 Chemische und mikrobiologische Stabilität ImiGEL

Gehaltsmessungen

Die ICH-Guidelines schreiben für einen medikamentösen Gebrauch, innerhalb der Klimazone Kategorie II, die Überprüfung der chemischen und physikalischen Stabilität der Rezeptur bei Intermediate-Konditionen (30 °C/ 65 % r.F.) vor (109). Diese simulierten Stressungen sollen Veränderungen des Wirkstoffgehalts durch Zersetzung oder Aufkonzentrierung sowie Modulationen der Viskosität oder ein Brechen der dispersen Phasen bspw. anzeigen. Zusätzlich können, sofern sinnvoll, Prüfungen zur Photostabilität einer Zubereitung gefordert werden. Aufgrund des hier verwendeten Primärpackmittels (Aluminiumtube) ist der Einfluss durch Feuchte und Licht auszuschließen. Es kann weder Wasser aus der Formulierung entweichen, noch von außerhalb in die Tube eindringen. Weiterhin können keine Reaktionen durch Lichtstrahlung hervorgerufen werden. Somit liegt das Hauptaugenmerk auf den durch Temperatur hervorgerufenen Abbau des Wirkstoffs. Thermisch bedingte Abbauprodukte konnten in einer Literaturrecherche nicht gefunden werden. Dies entspricht den hier dargestellten Daten. ImiGEL zeigt unter den gewählten Prüfparametern über sechs Monate nach Produktion einen konstanten Wirkstoffgehalt und damit keinen Abbau. Der gemittelte Gehalt beträgt 100 % ± 0,5 % im Vergleich zu einer Standardlösung und erfüllt damit die von der FDA (83) geforderten Akzeptanzkriterien. Selbst Proben die neun Monate nach Herstellung und unkontrollierter Lagerung bei Raumtemperatur vermessen wurden (Daten nicht dargestellt) lagen bei ca. 98 % der Sollkonzentration. Ein Trending konnte aufgrund des ausbleibenden Abbaus nicht berechnet werden. Innerhalb einer Risikobetrachtung wurden die nach Hydrolyse, physiologisch vorkommenden, enzymatisch produzierten Hauptabbauprodukte des Wirkstoffs in Abbildung 49 dargestellt. Die Hydrolysereaktion findet an verschiedenen Stellen des Moleküls statt. Von den dargestellten acht Metaboliten entfallen ca. 45 % auf S-26704 und S-27700, die im Körper, selbst nach mehrmaliger oraler Gabe, nur schwer nachzuweisen sind. Somit kann von keiner oder einer sehr geringen Wirkung auf den Menschen nach dermalen Exposition ausgegangen werden.

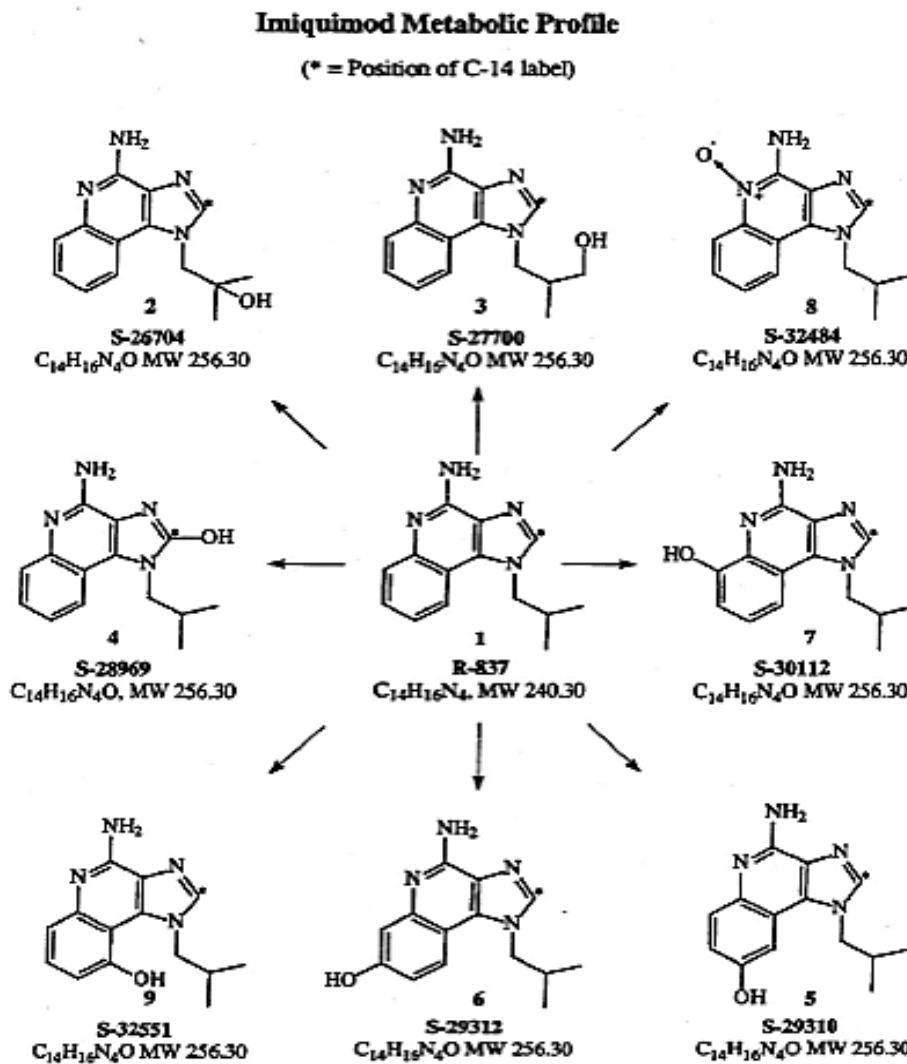


Abbildung 49 Enzymatisches Metabolisierungsschema Imiquimod

Nach *Clinical Pharmacology and Biopharmaceutics Review(s)* (3). Die Metaboliten 2 und 3 werden in der Literatur als Hauptabbauprodukte geführt. Die enzymatischen Hydroxylierungsreaktionen finden am gesamten Molekül statt.

Mikrobiologie

Als W-O-W-Suspension enthält ImiGEL einen ca. 40 %igen Anteil an Wasser, der generell Keimwachstum begünstigen kann. Um dieses zu unterbinden wurde die Zubereitung mit Nipagin und Nipazol konserviert. Das deutsche NRF schreibt einen Maximalanteil der Parabene von insgesamt 0,2 % der Zubereitung vor, der in vielen Fällen einen ausreichenden Schutz vor mikrobiellem Wachstum bis zu einem Jahr (Verpackung: Tube) generiert (110). PHB-Ester können allergische Reaktionen auslösen und stehen aufgrund ihrer breiten Anwendung in Kosmetik, Pharma- und Lebensmittelindustrie in der öffentlichen Kritik. Zusätzlich besitzt ImiGEL mit Jojobaöl als Lipophase (ca. 45 % der Rezeptur) antimikrobielle Eigenschaften, die die Konservierung unterstützen. Laut Ph.Eur. dürfen in der hier untersuchten halbfesten Zubereitung sowohl *Pseudomonas aeruginosa* als auch *Staphylococcus aureus* nicht nachweisbar sein. Weiterhin wird gefordert, dass die TAMC ≤ 100 KBE/ g sowie die TYMC ≤ 10 KBE/ g liegen. Alle vier Bedingungen wurden über den gesamten Untersuchungszeitraum aus der geschlossenen Tube erfüllt. Es waren weder die explizit genannten Keime, noch andere Mikroorganismen nachweisbar. Dennoch forderten die Behörden einen Nachweis der mikrobiellen Reinheit aus der geöffneten Tube, deren Ergebnisse folgend diskutiert werden sollen.

5.5 Anbruch-Stabilität ImiGEL

Die Prüfung 5.1.3 des europäischen Arzneibuchs schreibt eine Kontamination der Zubereitung mit definierten Keimen und Keimzahlen vor. Die Konservierung der Rezeptur soll ein weiteres Wachstum unterbinden und so die KBE innerhalb eines bestimmten Zeitraums unter ein Akzeptanzkriterium senken (s. Tabelle 35) (111). Der Ausstrich und die Auszählung der beimpften Zubereitung erfolgten auf den geforderten Nährmedien Casein-Soja-Pepton-Agar (Bakterien) und Sabouraud-Dextrose-Agar (Hefen und Schimmelpilze). Die Sinnhaftigkeit des Tests ist m.E. generell zu hinterfragen, da die eingebrachte Keimbelastung eine reelle durchschnittliche mikrobielle Verunreinigung bei weitem übersteigt. Neben einer nicht vorhandenen Unterscheidung des Primärpackmittels wird Entnahmehäufigkeit im derzeitigen Prüfprotokoll ebenfalls nicht berücksichtigt.

Tabelle 35 Bewertungskriterien Ph.Eur. 9.0 (2017, Prüfung 5.1.3) am Beispiel von Topica
Abkürzungen: n.a. nicht angeführt; NI No Increase; lg Potenz auf Basis zehn (38)

Keim	Anzahl der Beimpften KBE/ ml oder g	Kriterium	Reduzierung der KBE nach X Tagen			
			2	7	14	28
Bakterien	10 ⁵ -10 ⁶	A	≥ 2 lg	≥ 3 lg	n.a.	NI
		B	n.a.		≥ 3 lg	
A		≥ 2 lg				
B		≥ 1 lg				
A		≥ 2 lg				
Schimmelpilze		B	n.a.		≥ 1 lg	

Das erhaltene Ergebnis war äußerst unzufrieden stellend. Keine der Formulierungen konnte den Anforderungen der Ph.Eur. entsprechen. Zusätzlich war keine Kontinuität oder Trendbildung erkennbar. Die besten Ergebnisse zeigen die originale und die 0,1 %ige Konservierung mit je zwei bestandenen Teilprüfungen. Mit dem schlechtesten Ergebnis schließt die Zubereitung mit dem höchsten Anteil PHB-Ester ab. Generell scheinen Methyl- und Propylparaben mit dieser hohen Keimbelastung überfordert zu sein. Als naheliegende Begründung, die bisher nicht weiter verfolgt wurde, sei die Wirkminderung der Phenole durch nichtionogene Tenside um 80-90 % angeführt (8). Das unregelmäßige Ergebnis könnte durch Mizelleinschlüsse unterschiedlicher Größe und folgend mit unterschiedlichen freien Anteilen des Konservierungsmittels begründet werden. Das Prinzip „mehr Parabene gleichen diese Einschlüsse aus“, konnte in diesem Setup nicht bestätigt werden. Nach Rücksprache mit dem Analytiklabor wurde ein Konservierungsmittelwechsel oder eine alternative Methodik empfohlen. Als weitere mögliche Substanzen zur Konservierung wären Chlorhexidinium-Salze, Benzethoniumchlorid, Germall 115 und Germaben II zu nennen. Alle werden auf ihre Tauglichkeit im Kapitel 6 tiefer untersucht. Als zweite Option zur Prüfung auf ausreichende Konservierung bietet sich ein kontinuierlicher Belastungstest an, der den realistischen Umständen eher entspricht als den vom Arzneibuch geforderten.

Durch GMP-gerechtes Arbeiten sollte und wurde ein einwandfreies Produkt in Bezug auf mikrobieller Kontamination erzeugt. Entsprechend der dichten Primärverpackung können nur über den Tubenkopf bzw. den Finger des Anwenders Keime in das Arzneimittel gelangen. Entsprechend klein ist die Eintrittspforte und kurz die Kontaktzeit. Kontaminationsgrade von 10⁵-10⁶ KBE/ ml oder g sind dementsprechend realitätsfern. Als Variation des arzneibuchkonformen Belastungstests wird deshalb eine Beimpfung über einen gleich langen oder sogar längeren Zeitraum mit niedrigeren KBE vorgeschlagen. Auf ImiGEL bezogen, hätte

das Procedere auf eine wöchentlich dreifache Beimpfung über 30 Tage mit niedrigen Keimbelastungen variiert werden können.

Wäre ImiGEL nach USP-Methodik beimpft worden, hätte die 0,07 %ige Formulierung den Vorgaben der USP entsprochen, unter der Voraussetzung, dass zusätzlich auf *E.coli*-Kontamination analysiert und die Prüfung bestanden worden wäre. Diese fordert eine Reduktion für Bakterien nach 14 Tagen um ≥ 2 log und danach keine Steigerung der Keimzahl. Für Hefen wie Schimmelpilze darf über den Zeitraum der 28 Tage kein Wachstum festzustellen sein.

Nach Rücksprache mit dem BfArM über den nicht bestandenen KBT, wurde eine Reduzierung der Laufzeit auf zwei Wochen vereinbart. Dies geschah unter der Voraussetzung, dass sowohl ungeöffnete und geöffnete Tuben mit drei Entnahmen (1 Woche) als auch geöffnete Tuben mit sechs Entnahmen (2 Wochen) auf mikrobiellen Befall hin analysiert würden und diese den Arzneibuchmethoden 2.6.12 und 2.6.13 entsprächen. Dieses Procedere konnte erfolgreich umgesetzt werden.

5.6 Penetrationsversuche

Ausgehend von den von *Gogoll et al* (59) durchgeführten Permeationsversuchen an toter exzidierte Maushaut, war der weiterführende Grundgedanke das Penetrationsvermögen in lebender Haut zu analysieren. Die Herausforderungen dieses neuen Systems lagen demnach weniger in der Formulierung selbst, sondern in der Verarbeitung der Gewebeproben zur darauffolgenden Analyse und Darstellung der verschiedenen Tiefenprofile. Die Methode der Tesa®-Streifen-Abrisstechnik konnte innerhalb der kurzen Vorversuchsphase etabliert und hinsichtlich laborpraktischer Methodik verbessert werden. Sie ist präzise genug, um Penetrationsunterschiede zwischen den einzelnen Formulierungen darzustellen und zu quantifizieren. Die Fotografien der Kryogen-Schnitte konnten sowohl als In-Prozess-Kontrolle der Abschälung von Hautschichten als auch als Probenvorbereitung zur Gehaltsmessung genutzt werden. Aufgrund des guten Erfolgs mit Maushaut wurden beide Methoden auch für die Schweine- und Euterproben verwendet.

Die zu Beginn aufgestellte These der prädiktiven Aussage zur immunologischen Wirkstärke aufgrund des Penetrationsvermögens, muss nach Abschluss der jeweiligen Versuche verneint werden. Während ImiSOL bezüglich der hier untersuchten Penetration keinen deutlichen Vorteil erzielte, zeigte sich die Formulierung hinsichtlich der In-vivo-Effektivität beiden Vergleichspräparaten signifikant überlegen (60). Innerhalb derselben Arbeit wurde die Ebenbüdigkeit des Generikums ImiGEL zu Aldara® hinsichtlich seines Immunisierungspotenzials nachgewiesen.

Um eine Immunisierung anzustoßen, müssen die dendritischen Zellen in der *Dermis* aktiviert werden, die im dargestellten Versuchsaufbau durch die Fraktion „Hautrest“ repräsentiert werden (42). Die Konzentrationen an Imiquimod in der *Dermis* liegen aber im Falle von ImiSOL zu jedem Zeitpunkt unter den Wirkstoffspiegeln der beiden Vergleichsprodukte [Maus; 2,85 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (10min), 5,24 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (60min) und 3,16 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (180min)]. Ein Zusammenhang zwischen der Arzneistoff-Konzentration und der In-vivo-Effektivität lässt sich somit anhand dieser Ergebnisse nicht erkennen. Ein erster Erklärungsansatz, ausgehend von der Formulierung, könnte sowohl in der Verarbeitung des Wirkstoffs als auch in der Auswahl des Hilfsstoffs liegen. Aldara® enthält Imiquimod in gelöster Form und beinhaltet als Adjuvans Isostearinsäure, die über die Auslösung einer Entzündungsreaktion den Eintritt von

Immunzellen und -proteinen in das Gewebe fördert (112). Somit kann der Wirkstoff schnell im Gewebe anfluten, das Gewebe durchdringen und durch die zusätzliche Entzündung eine entsprechend verstärkte Immunreaktion auslösen.

ImiGEL mit Jojobaöl hingegen zeigt im oben dargestellten Setup sowohl im *S.corneum* als auch im *S.spinosum* die höchsten Spiegel. Der schnelle Abtransport der 400 nm großen Partikel von der Hautoberfläche durch die ersten Hautschichten führt zu einem konstanten Gehalt von gemittelten $4,2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ über drei Stunden im *S.spinosum* (Maus). Der zügigen Penetration ImiGELs in lebender Haut steht ein Immunisierungspotential gegenüber, das mit dem Aldara® vergleichbar ist. Die Abmilderung der höher zu erwarteten Wirkung ist zum einem dem Partikelstatus geschuldet, da dem Wirkmechanismus erst ein Lösungsschritt des Partikels vorgeschaltet ist und damit eine Reservoirfunktion darstellt. Zum anderen spielt Jojobaöl hier eine große Rolle. Das kalt gepresste Wachs besteht aus einer Mischung diverser Inhaltsstoffe (Gadolein-, Eruca- und Ölsäure, Vitamine A, B und E), die vor allem im kosmetischen Bereich bei trockener, juckender Haut aber auch zur Abheilung von Entzündungsreaktionen wie Akne oder Sonnenbrand eingesetzt werden (113). Entsprechend gegenläufig sind die Wirkmechanismen.

Tabelle 36 Jojobaöl und seine Inhaltsstoffe

Das Wachs wird aus den Samen des *Simmondsia chinensis* kalt gepresst und vor allen in der Kosmetik in breiter Anwendung eingesetzt. (113)

Stoff	Anteil [%]	Sonstiges zu den Einzelbestandteilen
Gadoleinsäure	70	Einfach ungesättigte Fettsäure; Vorkommen als Triglycerid in Pflanzen- und Fischölen; C ₂₀ -Körper
Erucasäure	15	Einfach ungesättigte Fettsäure; Vorkommen vor allem aus Pflanzen- und weniger aus Fischöl; C ₂₂ -Körper
Ölsäure	10	Einfach ungesättigte Fettsäure; Ubiquitär in fast allen pflanzlichen und tierischen Fetten; C ₁₈ -Körper
Palmitinsäure	1	Gesättigte ubiquitär vorkommende Fettsäure; Stoffwechselprodukt der Lipogenese zur Bildung der Fettreserve; C ₁₆ -Körper
Nervonsäure	2	Einfach ungesättigte Fettsäure; Vorkommen in Pflanzen- und Fischölen; Innerhalb des menschlichen Körpers vor allem im ZNS zu finden.
Provitamin A	2	Beta-Carotin-Familie; Einfluss auf Zell- und Gewebeentwicklung, Stoffwechselforgänge und Immunsystem
Vitamin E		Antioxidans und Radikalfänger; Verlangsamt den Alterungsprozess der Haut, verhindert Gefäßablagerungen und verbessert so die Durchblutung; Muskel- sowie Nervenzellen werden gestärkt.
Vitamin B-Komplex		Heterogener Wirkstoffcluster; positive Eigenschaften auf das Magen-Darm-, Immun- und Nervensystem; Medizinischer Einsatz bei Reizbarkeit, Müdigkeit, Muskelkrampfleiden, Depressionen und Appetitlosigkeit

Der dritte Hilfsstoff, eingesetzt in ImiSOL, führt auf noch nicht bekanntem Reaktionsweg zu einer signifikant verstärkten Immunisierung im Gewebe (114; 115). Squalen konnte sich in den durchgeführten Permeations- und Penetrationsprüfungen zwar nicht von den anderen Formulierungen absetzen (59), dennoch konnte die signifikant erhöhte Aktivierung der Immunzellen nur mit dem Triterpen nachgewiesen werden (42). Hierbei stellte die Größe der Partikel ($600 \text{ nm} \pm 200 \text{ nm}$) keinen Nachteil für die Immunisierung dar. Entweder erreicht der Wirkstoff auch in größerer Form die Langerhans'schen Zellen oder der Einfluss des Hilfsstoffs kann die Minderaktivierung durch weniger Imiquimod am Zielort mehr als ausgleichen. Eine Quantifizierung der Effekte wurde allerdings noch nicht durchgeführt.

Ein zweiter Erklärungsansatz muss den Zustand des bearbeiteten Gewebes behandeln. Zum Einen ergibt sich nachweislich ein Unterschied zwischen lebender und toter, sowie dickerer

bzw. dünnerer Haut und zum Anderen spielt der Grad der Behaarung eine essentielle Rolle. Während lebende Haut auf einen natürlichen Stofftransport innerhalb der Zellen sowie untereinander zurückgreifen kann, beruht die Wanderung des Wirkstoffs in totem Gewebe ausschließlich auf einem Konzentrationsgradienten. Dies verlangsamt den Transport des Immunstimulators merklich und wurde mit Endkonzentrationen in 15 Tesa®-Streifen von 17,35 µg/ cm² (Maus tot, ImiGEL) zu 54,95 µg/ cm² (Maus lebend, ImiGEL) bzw. 30,88 µg/ cm² (Maus lebend, Aldara®) in dieser Arbeit nachgewiesen. Dass die Dicke der Diffusionsschicht einen Einfluss auf die Konzentration des Wirkstoffs im Zielkompartiment hat, wurde bereits 1855 durch Adolf Fick bewiesen, der damals folgende Gleichung postulierte:

$$J = - D \frac{\partial C}{\partial x} \quad \text{Gl. 15 (8)}$$

Hierbei stellt J die Diffusionsstromstärke, D den Diffusionskoeffizienten, C die Teilchenzahldichte und x die zurückzulegende Weglänge dar. Je dicker also die Haut bzw. die Barriere, desto kleiner der Durchtritt des Wirkstoffs. Neben der Theorie des Transports durch eine gleichmäßige Schicht an Zellen, muss zusätzlich der Behaarungsgrad der behandelten Haut in Betracht gezogen werden. Ein einzelner Haarfollikel reicht bis weit in die Dermis und stellt damit für Partikel entsprechender Größe eine gezielte Abkürzung durch die aufliegenden Hautschichten dar (116).

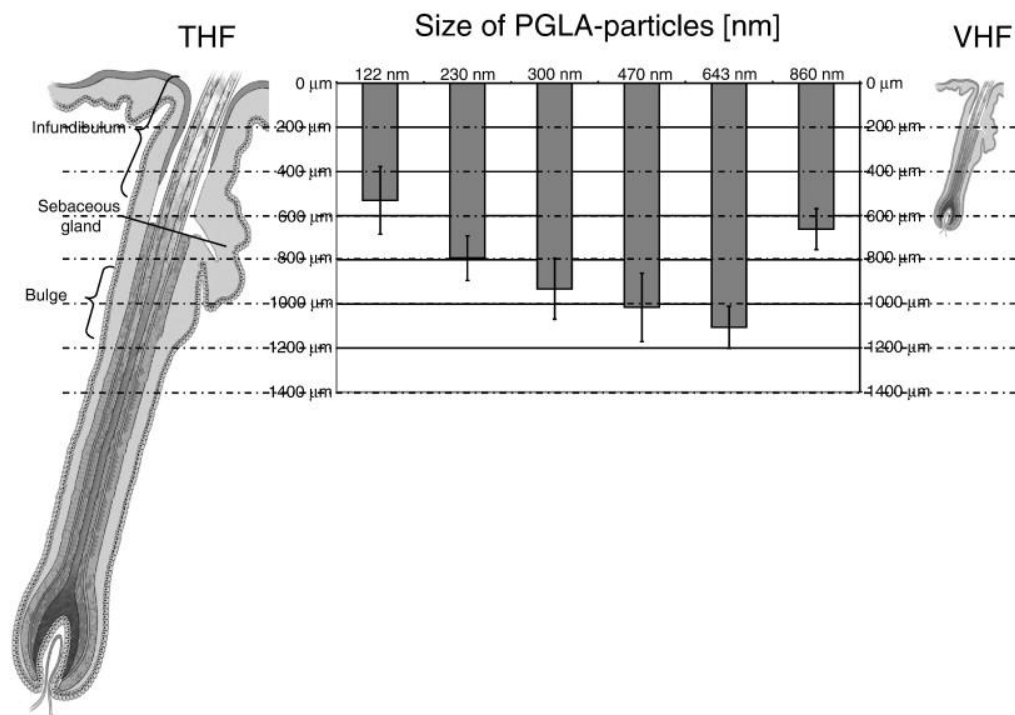


Abbildung 50 Eindringtiefe von PLGA-Partikel verschiedener Größen

Darstellung von Partikeln von ca. 100-900 nm in erwachsene (THF, terminal hair follicles) und kindliche Haarfollikel (VHF, vellus hair follicles) (116). Die angestrebten Partikel der Größen 400 nm (ImiGEL) und 600 nm (ImiSOL) wandern durch diese Abkürzung entlang der Follikel tief in die Hautschichten und aktivieren dort das dermale Immunsystem.

Die Ablagerung der Partikel im Follikel ist hierbei stark von der Art der Anwendung (Massage) abhängig. Ähnlich einer archimedischen Schraube wird die Zubereitung durch kreisende

Bewegung auf der Haut in den Follikel eingetrieben (117; 118). Eine auf diese Weise entstehende Ansammlung von Formulierung im Follikel kann folgend eine Art Langzeit-Depotfunktion erfüllen (12). Zusätzlich bedingen sich aber beide Parameter, Dicke und Behaarungsdichte, gegenseitig (119). Hansen et al. konnte am Beispiel der Maus nachweisen, dass je nach Wachstumsphase der Haare auch die Dicke der Haut variierte. Während die Dermis in der Telogenphase (Ruhephase) eine Tiefe von 250 μm aufwies, wuchs diese innerhalb der Wachstumsphase (Anagenphase) auf 390 μm an. Noch stärker war der Einfluss auf die Follikeltiefe, die von 150 μm auf 450-550 μm mehr als verdreifacht wurde (120). Zur Veranschaulichung dient Abbildung 51.

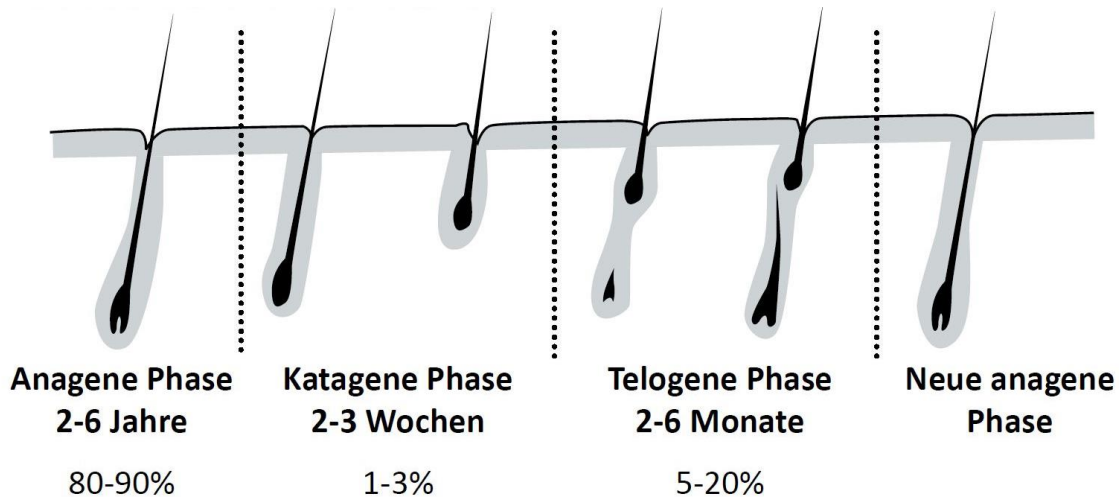


Abbildung 51 Wachstumsphasen von humanem Kopfhaar im Kreislauf
Aufteilung in die drei Phasen Ruhe (telogen), Ausfall (katagen) und Wachstum (anagen) mit jeweiliger Angabe der Dauer und des prozentualen Anteils der Gesamthaarung. (121)

Soll ein histologischer Vergleich der Hautmodelle Maus, Schwein, Euter und Mensch erstellt werden, müsste die Maus mit ihrer vergleichsweise sehr viel dünneren Haut und einer sehr viel stärkeren Behaarung die höchsten Konzentrationen aufweisen. Kietzmann et al. postulierten eine durchschnittliche Hautdicke auf dem Rücken der Maus von ca. 11-14 μm (122), während die Behaarungsdichte auf über 1000 Haare pro cm^2 (123) angegeben wurde. Die Mäuse wurden im hiesigen Setup einen Tag vor Behandlung auf dem Rücken rasiert. Dies ermöglichte ein Auftragen der Formulierung in definierten Mengen direkt auf die Haut, ohne Verluste durch am dichten Fell anhaftenden Zubereitungsresten befürchten zu müssen. Zusätzlich minderte es den Einfluss der (Massage-)Auftragung. Durch die Erholungsphase von einem Tag zwischen Rasur und Behandlung sollten eventuell beschädigte *S.corneum*-Schichten wieder vom Körper ersetzt werden können, sodass von einer intakten Hautbarriere ausgegangen werden konnte. Einen besseren Vergleich in Bezug auf die menschliche Haut könnte die Aussenhaut des Schweineohrs darstellen. Sowohl Meyer (124) als auch Jacobi (125) stellten in ihren Arbeiten die Vergleichbarkeit zur Menschenhaut dar. Mit einer Gesamtdicke der Haut, also Epidermis und Dermis, von 77-113 μm und einem Behaarungsgrad von 11-25 Haaren pro cm^2 wäre ein histologisch sehr ähnliches Modell gefunden. Aufgrund der Verwendung toten Gewebes, konnte allerdings weder eine immunologische Antwort, noch eine Vorhersage für die Anwendung am Menschen getroffen werden. Ein möglicher Versuchsaufbau stellt das Franz Diffusionszell-Modell dar. Das tote Gewebe wird hierbei als Membranbarriere zwischen ein Donator- und ein Akzeptormedium gespannt. Hierbei können nach Auftragung der halbfesten Formulierung als Wirkstoffdonator sowohl Penetrations- als

auch Permeationsuntersuchungen zeitgleich durchgeführt werden. Das Akzeptormedium würde in diesem Fall als Surrogat für den systemischen Kreislauf implementiert werden. Als Nachteil dieser Methode muss die Präparation des Gewebes genannt werden. Beim Entfernen der Haut vom Knorpel (Schweineohr) bzw. vom Unterhautfett (Mensch) kann es zu Rissen im Gewebe bzw. einer Veränderung der follikulären Öffnungen kommen. Während sich die Öffnungen durch Abtrennung und Austrocknung der Haut erst verkleinern, bilden sich durch Aufspannen der Haut kleine bis visuell erkennbare Löcher, die eine Penetrations- sowie Permeationsuntersuchung verfälschen können. Diesem Versuchsaufbau, basierend auf totem Gewebe, ist eine Methodik an lebenden Systemen vorzuziehen. Ähnlich dem perfundierten Rindereuter wäre eine Mikrodialyse-Methodik denkbar. Allerdings nur unter der Voraussetzung, dass das Tier den Applikationsort nicht verunreinigen oder sich von den Instrumenten freischlagen kann. Die Mikrodialyse könnte, ähnlich der Franz-Zelle, Daten zur Permeation und Penetration erheben.

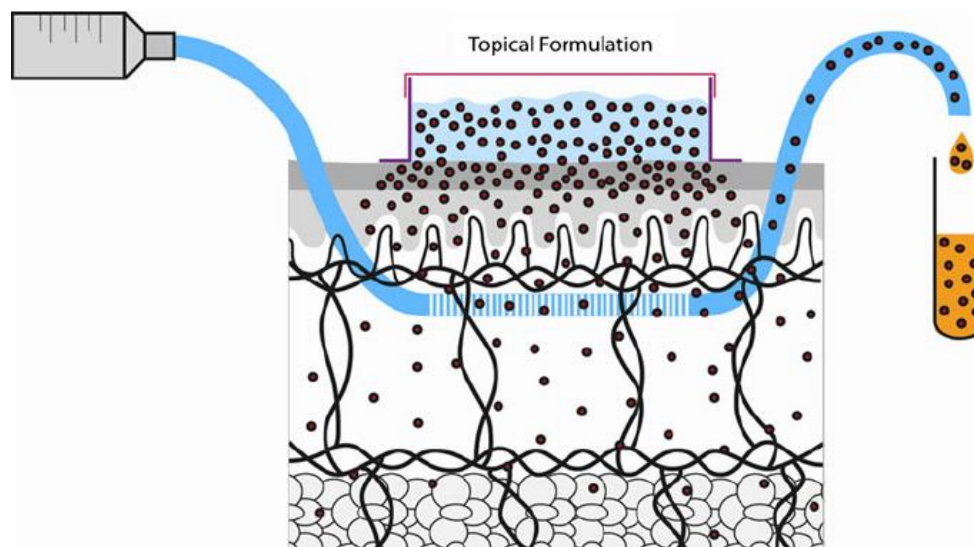


Abbildung 52 Schematischer Aufbau einer Mikrodialyse

Ein semipermeables Schlauchsystem wird hierbei in bestimmter Tiefe durch ein Hautareal verbracht. Während der Wirkstoff in die Perfusionslösung diffundiert, das Perfusat aber nicht in das Gewebe austritt, kann eine zeitfraktionierte Analyse der Penetration und Permeation einer dermalen Formulierung dargestellt werden (126).

Durch Untersuchungen der Lymphe (Gewebe wie Flüssigkeit) könnte ebenso das immunologische Potenzial bestimmt werden. Nachteil dieser zweiten Methode ist der hohe Kostenfaktor, da das Versuchstier nicht mehr der Nahrungskette zugeführt werden kann. DeLange et al. variierte diesen Ansatz 1992 und konnte ein isoliertes Schweineohr durch Eigenblutperfusion über vier Stunden am Leben halten (127). Zur gleichen Zeit gelang es Pittermann und Kitzmann die Methodik auf ein isoliertes Rindereuter zu übertragen (128; 129). Das perfundierte Rindereuter hat den Vorteil physiologische Prozesse wie Reizungen oder Stoffwechselreaktionen an der Applikationsstelle über bis zu acht Stunden beobachten und untersuchen zu können. Des Weiteren kann das System, wie oben bereits beschrieben, zur Entwicklung einer Mikrodialyse-Methode genutzt werden. Nachteile dieses Systems sind der apparative Aufwand und die eingeschränkte Übertragbarkeit der Daten auf den Menschen, entspricht der histologische Aufbau doch nur der humanen Rückenhaut. Ob die Wirkung der Imiquimodkristalle dem transfollikulären bzw. dem transzellulären Weg geschuldet ist, wurde in dieser Arbeit nicht behandelt. In beiden Fällen müsste Aldara® mit

gelöst vorliegendem Wirkstoff höhere Wirkstoffspiegel aufweisen können als die Feststoff-Zubereitungen. Für zukünftige Untersuchungen sollten Techniken angewendet werden, die zwischen dem folliculären und transzellulären Penetrationsweg unterscheiden. Hier hat sich in den vergangenen Jahren das Differential Tape Stripping als neuartige Methode bewiesen (130; 131; 84). Hierbei wird der Tape-Stripping-Methode ein Cyanoacrylat-Abriss nachgeschaltet. Mit dem letzten Abriss kann der gesamte folliculäre Inhalt entfernt und analysiert werden, sodass hierdurch eine neue Penetrationsfraktion entsteht. Diese könnte Aufschluss geben, inwieweit der folliculäre Transport für die In-vivo-Effektivität relevant ist. Um einen folliculären Transport zu begünstigen, sind nach *Rancan* und *Voigt*, verschiedene technologische Formulierungsmöglichkeiten gegeben (12; 132; 133). Vor Allem der Transport über Mikro- und Nanopartikel wird als elegante Möglichkeit der gezielten Wirkstoffdeposition beschrieben. Innerhalb der Partikel könnten Makromoleküle und stark lipophile als auch stark hydrophile Substanzen über Tage hinweg im Infundibulum überdauern und einer Austragung bzw. -waschung entgehen. Abhängig von der Größe der Partikel, der Oberflächenbeschaffenheit sowie einer eventuellen Funktionalisierung der selbigen, können verschiedene Penetrationstiefen und Depoteffekte ausgelöst werden. Zusätzlich können spezielle Wirkstofffreigaben durch die vorherrschenden Gegebenheiten erzielt werden (Lipophiles Medium, pH-Gradienten usw.). Alternativ verwendete *Windbergs et al.* zur graphischen Darstellung der Follikel und angrenzenden Gewebe Raman-Spektroskopie-Aufnahmen, die nach Einfärbung Aufschluss über die folliculäre Beladung gaben (134).

Um den Prozess der transkutanen Immunisierung abschließend zu vervollständigen, muss der Weg des Antigens ebenfalls untersucht werden. Diese Untersuchungen stehen jedoch noch aus. Aufgrund der spezifischen Immunreaktionen kann aber davon ausgegangen werden, dass das Peptid einen entsprechenden Weg zu den Effektor-Zellen gefunden haben muss. Aufgrund der Größe des Peptids und angesichts der Tatsache, dass ein Antigen-Molekül ausreicht, um eine entsprechende Immunantwort auszulösen, ist ein konzentrationsabhängiger Zusammenhang nicht zu erwarten. Möglicherweise besteht aber auch hier im Hinblick auf die folliculäre Präsentation des Peptids gegenüber des dermalen Immunsystems ein Zusammenhang, der die In-vivo-Effektivität der getesteten Formulierungen erklärt (58; 132; 135). Aufgrund der tiefen Verankerung der Follikel kann der Wirkstoff durch Massage an den im Stratum spinosum ansässigen Langerhans-Zellen und den dermal ansässigen dendritischen Zellen entlang geführt werden (vgl. Abbildung 2). Ferner muss berücksichtigt werden, dass das Adjuvanz Squalen in der Formulierung ImiSOL ebenfalls immunologisch wirksam ist, während eine Reaktionskaskade durch Isostearinsäure oder Jojobaöl nicht ausgelöst werden konnte (136).

5.7 Partikelgrößenbestimmung

Wie im vorherigen Kapitel bereits besprochen, stellt die Partikelgröße einen wichtigen Faktor zur Arzneistoffdeposition in bzw. auf der Haut dar. Somit erklärt sich die Notwendigkeit der Überprüfung dieses Parameters innerhalb einer In-Prozess-Kontrolle (IPC) während der Produktion. Aufgrund des produktionsbedingten Vorliegens einer Suspension und einer möglichst schnellen Messmethode wurden die beiden Malvern Messgeräte Nanosizer (DLS) und Nanosight (NTA) miteinander verglichen. Innerhalb der Ergebnisfindung konnte eine Vergleichbarkeit der beiden Systeme nicht nachgewiesen werden. Generell sollten aber beide Systeme die Kristalle gleichwertig analysieren können, werden sie doch mit einem

Messbereich von 0,3-10.000 nm (DLS) bzw. 10–2000 nm (NTA) durch den Hersteller beworben (137; 138).

Der Zetasizer besitzt mehrere Analysenmöglichkeiten. Zum einen gibt er Auskunft über die Größe der Suspensionsteilchen. Zum anderen kann er Aussagen zur Einheitlichkeit der Partikelgröße geben, also ob eine monodisperse oder polydisperse Mischung vorliegt. Darüber hinaus können durch leichten apparativen Aufwand Informationen zum Zetapotenzial und damit der Oberflächenladung geliefert werden. Die Partikelgröße wird nicht direkt, wie bei einem Mikroskop vermessen, sondern über eine Reihe mathematischer Transformationen aus Lichtintensitäten als z-Average abgeleitet.

Sapsford et al. beschreibt die Vorteile der DLS-Methode in ihrer nichtinvasiven, zerstörungsfreien und relativ günstigen Analyse (139). Die Probenvorbereitung sei relativ schnell, einfach und wenig störungsanfällig während der Messung. *Hassellöv et al.* beschreibt die Detektionsgrenze allerdings nur im Bereich von mg/ L (140). Der kritische Nachteil liegt nach *Kim et al.* in der Dateninterpretation von polydispersen Systemen. Aufgrund der sehr viel stärkeren Streuungsintensität größerer Partikel im Vergleich zu kleineren, würden Letztere in einer Analyse vernachlässigt bis ignoriert. In Folge dessen könnten schon kleinstmengen an Fremdkörpern (Staub etc.) bzw. eine polydisperse Verteilung von Partikelgrößen die Vertrauenswürdigkeit der Messung beeinträchtigen (141). Entsprechend wichtig sind ein niedriger PDI und damit eine monodisperse Verteilung der Partikel. Im hier erhaltenen Ergebnis der Wirkstoffsuspension kann im letzten Zerkleinerungsschritt ein PDI von 0,368 erreicht und damit fast die Vorgaben der Theorie erfüllt werden. Ein PDI unter 0,3 kann durch längere Mahlzeiten erzwungen werden, wobei der Einfluss des Homogenisators auf die Zerkleinerung stärker zu bewerten ist, als der der Mühle (vgl. Tabelle 34). Ebenfalls zu beachten sind die Tendenzen kleinerer Partikel, sich aufgrund ihrer hohen Oberflächenenergie aneinander zu lagern und Aggregate zu bilden (142). Die Bildung von Aggregaten in wässrigen Medien hängt hierbei u.a. von der Konzentration der Teilchen im Medium und deren Kollisionsfrequenz ab. Allerdings kann der Zetasizer nicht zwischen Aggregaten und großem Partikel unterscheiden und beeinträchtigt folglich vor allem die Messung von Protein-Aggregaten. Hierzu eignet sich nach *Filipe et al.* (143) viel eher die NTA-Methode, die er als ebenbürtige Ergänzung zur DLS beschreibt. Der Nanosight biete eine akkurate Messung von mono- wie polydispersen Proben in einer hohen Auflösung und wäre nicht anfällig gegenüber größeren Partikeln. Die NTA bestimmt ein arithmetisches Mittel bzw. einen Modalwert der Partikel und kann die Partikel visualisieren, ist aber in ihrer Wiederholbarkeit der Messung und dem Konzentrationsbereich stark eingeschränkt. Hinzu kommen die teilweise sehr langen Aufbereitungszeiten der Proben die umfangreichen Einstellungsmöglichkeiten innerhalb der Software. In dieser Arbeit war allerdings das größte Manko die starke Eigenreflexion der Kristalle. Pseudopartikel können durch Software nicht von realen unterschieden werden und verzerren somit die Untersuchung. Diese Verzerrung wird durch die hier gefundenen Ergebnisse deutlich: Entlang der Prozessstationen kann keine Differenzierung der Zerkleinerung festgestellt werden, stattdessen befinden sich alle gemessenen Partikelgrößen ungefähr im gleichen Bereich. Des Weiteren konnten keine kongruenten Partikelgrößen innerhalb der verschiedenen Konzentrationen gefunden werden. Hierbei zu beachten ist, dass jede dargestellte Messung bereits automatisch ein Mittelwert aus zehn Einzelmessungen darstellt, sodass nicht von Zufallsmessungen ausgegangen werden kann. Um abschließend eine der beiden Methoden zu favorisieren wurde nach einer dritten Methode gesucht und im Elektronenmikroskop gefunden. *Gogoll et al.* gibt in seiner Dissertation einen Martin-Durchmesser der Squalen-Formulierung (ImiSOL) von $663 \text{ nm} \pm 209 \text{ nm}$ nach elektronenmikroskopischer Betrachtung von 100 Partikeln an. Des Weiteren postulierte er

eine Abhängigkeit der Partikelgröße von der Lipophase (59). Durch Austausch des Squalens gegen mittelkettige Triglyceride, bspw. Avocado- oder Jojobaöl, wurden kleinere Korngrößen erreicht, wenngleich nicht signifikant verschieden. Somit scheint die Effizienz des Emulsiflex Homogenisators abhängig von der Formulierung. Inwieweit dieser Effekt für eine Weiterentwicklung der Formulierung interessant sein könnte, wurde in dieser Arbeit nicht untersucht, sollte aber für eventuelle zukünftige Auswechslungen der Lipophase bzw. eine Veränderung des Anteils der Lipophase beachtet werden. Kombiniert man die Ergebnisse der drei Analysenmethoden, decken sich die Resultate von Zetasizer und Mikroskop sehr gut. Des Weiteren kam es innerhalb von neun Monaten zu keiner signifikanten Partikelvergrößerung aufgrund von Ostwald'scher Reifung oder Aggregatbildung (59), sodass eine Verzerrung der DLS-Messung ausgeschlossen werden kann. Aufgrund der oben dargestellten Nicht-Eignung der NTA ist somit die Verwendung der DLS zur IPC der präklinischen ImiSOL-Herstellung zu bevorzugen.

6 Fazit und Ausblick

Am Ende dieser Abhandlung soll ein Resümee über die geleistete Arbeit in Bezug zu den anfangs postulierten Fragestellungen gezogen werden.

Der Schwerpunkt des zweiten Unterkapitels liegt auf zukünftig wichtigen Überlegungen bezüglich der Weiterentwicklung der beiden halbfesten Imiquimod-Formulierungen. Hierbei sollen Alternativen zur Zusammensetzung bezüglich der Lipidphasen, sowie die Zugabe bzw. der Ersatz von Stabilisatoren und Konservierungsmitteln vorgestellt werden.

6.1 Fazit

Der Forderung nach einer validierten Analytik für Imiquimod und seine Verunreinigungen konnte arzneibuchgerecht nachgekommen werden. Die USP setzte hier eine optimale Basis zur Methodenumsetzung auf der verwendeten Jasco HPLC-Anlage. Aufgrund der fehlenden Vorschriften im europäischen Arzneibuch fiel die Entscheidung zugunsten der USP, wobei die Ergebnisse eine arzneibuchgerechte Etablierung belegen. Ebenfalls etabliert wurde eine simultane Analyseverfahren der beiden eingesetzten Konservierungsmittel mit einer Validierung bis in einen Konzentrationsbereich von 2 µg/ ml. Des Weiteren konnten Gehaltsmessungen, außerhalb des validierten Bereichs, aus ImiGEL mit max. 9 % Abweichung vom theoretischen Gehalt bestimmt werden. Es besteht dennoch die Notwendigkeit die Sensitivität der Gerätschaften weiter zu erhöhen, um eine praktikable und, vor allem im Bereich der Zielkonzentration der Konservierungsmittel, validierte Freigabeprüfung zu erhalten. Hierzu ist ein Wechsel des Detektors von UV zu z.B. einer HPLC/ MS-Kombination empfehlenswert. Ausgehend von der robusten Wirkstoffanalytik, konnte die Effizienz und Wiederholbarkeit der Reinigung des Hochdruckhomogenisators nachgewiesen werden. Mit einem gemittelten Endgehalt von ca. 900 µg/ ml wurde für anderweitige dermale Zubereitungen mit oder ohne Imiquimod eine zufriedenstellende Reinigungsmethode entwickelt.

Die Charakterisierung technologischer wie biopharmazeutischer Parameter umfasste in dieser Arbeit den Abrieb der Mahlwerkzeuge während der Herstellung, die Partikelgrößenbestimmung als In-Prozess-Kontrolle und die Penetrations- sowie Permeationsuntersuchungen aller Imiquimod-haltigen Hautzubereitungen an Maus, Schwein und Rindereuter. Die Auswahl der Mahlwerkzeuge fiel bewusst auf Zirkonoxid, das aufgrund seiner Härte die geringste Kontamination des Produktes erwarten ließ. Mit 0,6 ‰ Abrieb bei anweisungskonformer Herstellung, der unter physiologischen Umständen vorliegenden Unlöslichkeit und der praktisch nicht vorhandenen dermalen Resorption, besteht keinerlei Risiko für den Patienten. Die Gegenüberstellung zweier Partikelgrößenbestimmungsmethoden brachte die eindeutige Entscheidung zugunsten der schnellen, einfachen und wiederholbaren Vermessung per DLS. Sowohl Vor- als auch Nachteile offenbarten die Versuchsreihen mit toter und lebender Haut. Der größte beobachtete Nachteil ist das Unvermögen, die erhaltenen Ergebnisse von den verwendeten Tierhäuten auf den Menschen zu übertragen. Ebenso liegen nicht genügend Daten zur dermalen Resorption und Metabolisierung von Imiquimod im Menschen vor, um die Veterinärdaten übertragen zu können. Hier werden v.a. klinische Studien Aufschluss geben können. Dennoch konnten die einzelnen Formulierungen auf den jeweils gleichen dermalen Grundlagen gegeneinander verglichen und charakterisiert werden. Die zwei nicht vermarkteten Produkte können sich Aldara® gegenüber in verschiedenen wichtigen Parametern wie Immunisierungsstärke,

Verträglichkeit und Bildung eines immunologischen Langzeiteffektes behaupten und signifikant durchsetzen.

Abschließend wurde die Stabilität des Emulsionsgels gegenüber chemischem wie biologischem Verfall nachgewiesen. Während die Vorgaben für die (mikro-)biologische Stabilität nach Reduzierung der Laufzeit erfüllt wurden, konnten die chemischen Anforderungen vollumfänglich nachgewiesen werden.

Die in dieser Arbeit vorgestellten praktischen Arbeiten können somit die am Anfang der Dissertation gestellten Fragen zielführend beantworten. Darüber hinaus ergaben sich aus den oben behandelten Themen, weiterführende Perspektiven und Aufgabenstellungen für ImiGEL und ImiSOL. Diese sollen im folgenden Kapitel behandelt werden.

6.2 Ausblick

Sowohl ImiGEL als auch ImiSOL, konnten bereits Erfolge auf dem jeweiligen Entwicklungsweg vorweisen. Die Herstellung anwendbarer Arzneiformulierungen, Abschlüsse positiver Impfkampagnen am Tier und die Anmeldung einer klinischen Phase II-Studie stellen erste Meilensteine der Entwicklung beider Produkte dar. Getreu den ICH Guidelines zum Aufbau eines pharmazeutischen Qualitätssystems ist es notwendig bestehende (GMP-)Systeme innerhalb eines Kreislaufs stetig zu erschaffen, zu überprüfen, zu verändern, zu erweitern und folgend wieder zu überprüfen. Dieser Quality-by-Design-Ansatz war ausschlaggebend für die hier aufgezeigten pharmazeutischen Möglichkeiten der Weiterentwicklung der jeweiligen Rezeptur.

Alternative Lipidphase ImiGEL

Die Neuwahl des hydrophoben Vehikels stellt zum jetzigen Zeitpunkt einen Rückschritt in der Entwicklung der Arzneiformulierung dar. Dennoch können weitere pflanzliche wie tierische Fette angeführt werden, die einen positiven Einfluss auf die Therapie des Patienten haben könnten.

Als pflanzliche Alternativen seien Sheabutter und Pongamiaöl genannt. Beide Öle sind, ähnlich dem Jojobaöl, bereits in der Kosmetik etabliert und erleben zurzeit eine kleine Wiederentdeckung. Sheabutter ist ein fast geruchsfreies, gelbliches Pflanzenfett, das aus der Kariténuss des Sheanussbaumes (*Vitellaria paradoxa*) gewonnen wird (144). Es enthält neben Vitamin E hohe Anteile an Triterpenen, Ölsäure, Stearinsäure, Linolensäure, Palmitinsäure, Triterpenalkoholen, Beta-Karotin und Allantoin. Hervorzuheben ist, dass Allantoin die Hautregeneration fördert, Irritationen abmildert und bei Patienten mit Neurodermitis mit starkem Juckreiz eingesetzt wird. Shea ist unempfindlich gegenüber Wärmeeinwirkung und besitzt sehr lange Haltbarkeitsdauern (145). *Valenta et al.* führte mehrere Versuche mit Zubereitungen aus Sheabutter durch und erzielte hiermit nennenswerte Erfolge im Sinne einer Wirkstoffpenetration in Schweinehaut (146; 147). Inwieweit die dort vorgestellten Formulierungen für immunologische Projekte anwendbar sind, muss an dieser Stelle offen bleiben. Dennoch zeigen die Veröffentlichungen die Praktikabilität bei unterschiedlichen Molekülgrößen (5-Aminolävulinsäure und Cyproteron-Acetat).

Karanja- oder Pongamiaöl wird aus den Samen der indischen Buche (*Millettia pinnata*) gewonnen. Seine antibakteriellen, antifungiziden und insektenabweisenden Eigenschaften werden neben dem natürlichen Lichtschutzfaktor und einer Beruhigung von Hautirritationen

besonders beworben (148). In pharmazeutisch-wissenschaftlichen Texten hingegen ist das Pongamiaöl noch unterrepräsentiert (149; 150; 151).

Ein sehr viel stärker untersuchter Ersatz für Jojobaöl stellt Fischöl dar. Derzeit liegen bereits mehrere Publikationen zur Eignung der ω -3-Fettsäuren als transkutanes Vehikel vor. Als Quelle werden unter anderem Makrelen und Sardinen verwendet, die einen hohen Anteil an ungesättigten Fettsäuren in Form von Eicosapentaensäuren (EPA) und Docosahexaensäuren (DHA) enthalten (152). *Zulfakar et al.* konnte eine stabile Formulierung aus Bienenwachs, Fischöl und Betamethason herstellen und biopharmazeutisch charakterisieren. Hierbei postulierte er die gesteigerte Wirkung des eingesetzten Glucocorticoids aufgrund verstärkter Aufnahme in die Haut sowie die entzündungshemmende Wirkung des Öls als additiven Effekt (153; 150). Des Weiteren sind seit den letzten fünf Jahren Studien publiziert worden, in denen Imiquimod in das Fischöl eingearbeitet und untersucht wurde (152; 26). Die dort erzielten Ergebnisse sind mit den in dieser Arbeit vorgestellten Methoden und Resultaten durchaus vergleichbar. Untersucht wurden zuerst die Freisetzungsraten von Imiquimod jeweils aus einem Carbomergel und einem Oleogel (aus Fischöl) gegenüber einem Bi-Gel (Mischung beider Gele). Hierauf folgten in vivo-Versuche am Mausmodell, die eine verbesserte Verträglichkeit des Bi-Gel-Imiquimods im Vergleich zu Aldara® zeigten. Die Autoren begründeten das bessere Nebenwirkungsprofil mit einer langsameren Wirkstofffreisetzung aus dem Bi-Gel im Vergleich zum Marktprodukt.

Möglichkeiten der biologischen Stabilisierung von ImiGEL

Die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche zur biologischen Stabilität des ImiGELs zeigten ein ungenügendes und inhomogenes Ergebnis bezüglich der Eindämmung von mikrobiellem Wachstum bei unterschiedlichen Konservierungsmittelkonzentrationen. Als wahrscheinlichste Erklärung wird vom Autor eine Wirkminderung der Phenole durch die Anwesenheit von nichtionogenen Tensiden erachtet. Mit Blick auf eine Optimierung bezüglich der mikrobiologischen Resistenz erscheint ein Wechsel des Konservierungsmittels unumgänglich. Als mögliche Kandidaten sollten Hilfsstoffe eingesetzt werden, die generell für eine Verwendung in einer halbfesten Formulierung geeignet sind und nicht irritierend oder allergisierend auf der Haut reagieren. Aufgrund des zweiphasigen Aufbaus der Creme sollte das Konservierungsmittel eine ionische Ladung tragen, um eine Umverteilung in die lipophile Phase und damit eine Verdünnung der Konzentration in der wässrigen Phase zu verhindern. Inkompatibilitäten mit weiteren Bestandteilen der Zubereitung müssen ausgeschlossen werden können. Des Weiteren sollten die ausgewählten Stoffe potent genug sein, um die gewünschte biologische Stabilität zu erreichen. Ein Hilfsstoff, mit allen oben geforderten Attributen, liegt derzeit nicht vor. Die folgenden Alternativen können nur Teilaspekte der beschriebenen Plausibilitätsprüfung erfüllen. Als altbekanntes und bewährtes Konservierungsmittel können Chlorhexidinium-Salze eingesetzt werden. Das spiegelsymmetrische Biguanid liegt in wässriger Lösung doppelt positiv geladen vor und wird vor allem gegenüber grampositiven wie -negativen Erregern eingesetzt. Die mikrobielle Wirkung beruht auf einer Zerstörung der Zellwand und damit der Lyse des Keims. Chlorhexidin findet eine breite Anwendung in dermalen Produkten der Medizin und Kosmetik sowie zur Flächen- und Gerätedesinfektion. Das Konservierungsmittel zeigt ein hohes Risiko an Überempfindlichkeitsreaktionen in der Bevölkerung, bis hin zur anaphylaktischen Reaktion (154). Eine weitere Möglichkeit der Stabilisierung können die Formaldehyd-Freisetzer Germall 115 und Germall II sein. Hinter erstgenannten versteckt sich chemisch gesehen Imidazolidinyl-Harnstoff, hinter zweitgenannten sein Verwandter Diazolidinyl-Harnstoff. Beide

Konservierungsmittel stellen in jeweiliger Kombination mit Parabenen die weltweit häufigste Stabilisierung für flüssige, halbfeste sowie feste Kosmetika, Körperreinigungsmittel und Hautpflegeprodukte dar (155). Durch Zugabe von Propylenglykol zu Diazolidinyl-Harnstoff, Methylparaben und Propylparaben erhält man das kommerziell vertriebene Germaben II. Der Vorteil der Kombination dieser Wirkstoffe ist das erweiterte Wirkspektrum im Vergleich zu den Einzelstoffen. Ein stark reglementierender Nachteil der beschriebenen Konservierungsstoffe ist allerdings die kontinuierliche Freisetzung von Formaldehyd bei einer Lagerung von über 10 °C. Somit muss während der Formulierungsphase bereits die Logistik ab Produktion und Aufbrauchfrist zur Gesamthaltbarkeit mitberücksichtigt werden. Gleichzeitig liegen aber nationale Grenzwerte für die beiden genannten Harnstoffe vor, sodass ein Bonus an Formaldehyd nicht der Formulierung zugegeben werden kann. Das Allergisierungspotential wird in der Literatur unterschiedlich angegeben. Während einige Studien (156; 157; 158; 159) das Auftreten einer Kontaktdermatitis nach Verwendung von Imidazolidinyl-Harnstoff-Produkten dokumentieren, bestätigte das Cosmetic Ingredients Review Expert Panel 2002 seine bereits 1980 durchgeführte Risikoanalyse mit dem Ergebnis der verträglichen Verwendung von Produkten mit max. 5% Konservierungsmittelanteil (160).

Mit dem Einstieg in die klinische Prüfung Phase-II stellt die hier präsentierte Formulierung ImiGEL eine anwendungsfähige Formulierung dar. Die angeführten Weiterentwicklungen in Bezug auf Lipidphase und Konservierung können als Formulierungspotential angesehen werden, um ein kompetitives und marktfähiges Produkt zuzulassen. Da eine Zulassung an dieser Stelle nicht angestrebt wird, kann der Entwicklungsschwerpunkt nun auf die potentere Formulierung ImiSOL gelegt werden. Wenngleich mithilfe des gefriergetrockneten Produkts signifikant bessere Immunisierungsreaktionen gegenüber Aldara® und ImiGEL beobachtet wurden, stellen u.a. die Konservierung und die Überführung ImiSOLs in eine anwenderfreundliche Applikationsform außerordentliches Entwicklungspotential dar, das im Folgenden diskutiert werden sollen.

Stabilisierungsmöglichkeiten ImiSOL

Squalen stellt aus chemischer Sicht ein mehrfach ungesättigtes Triterpen dar, das bei Säugern zur körpereigenen Cholesterol- bzw. bei Pilzen zur Ergosterolsynthese aus mehreren Isopren-Einheiten kondensiert wird. Aufgrund der Doppelbindungen besitzt Squalen eine gewisse Oxidationsneigung und wird entsprechend als Antioxidans eingesetzt. Über den Einsatz als Adjuvans zur Impfung wurde in den vorherigen Kapiteln berichtet. Im Fall von ImiSOL ist Squalen aber nicht die Aufgabe der Stabilisierung, sondern die Rolle der lipophilen Grundlage zgedacht, sodass Lösungen zur Haltbarkeitsverlängerung angestrebt werden müssen.

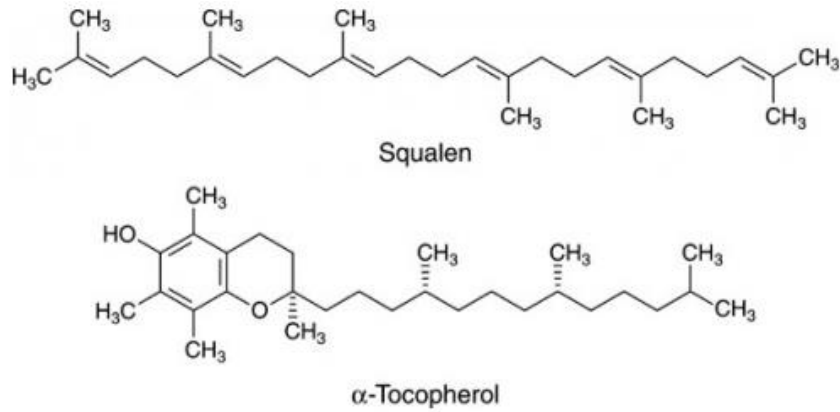


Abbildung 53 Chemische Strukturen der Lipidphase des ImiSOLs

Squalen ist ein körpereigenes mehrfach ungesättigtes Triterpen, das zur Cholesterolsynthese benötigt wird. Um die Oxidationsneigung des Squalens zu mindern wurde Tocopherol eingearbeitet. Das fettlösliche Vitamin E stellt ein altbekanntes und breit eingesetztes Antioxidans dar.

Bisherige Versuche die Formulierung zu stabilisieren lagen in der Einarbeitung von Tocopherol (ebenfalls Antioxidans) im Verhältnis 60:40 (S:T) und einer (Tief-)Kühlagerung in einer apothekenüblichen Kruke. Weder die Lagerung im Gefrierschrank (-80 °C, -20 °C) oder Kühlschranks (2-8 °C), noch die Zugabe des fettlöslichen Vitamins konnte einen Verderb binnen ca. vier Wochen aufhalten. Dabei äußerte sich die Instabilität als Ausbluten der Formulierung (Abbildung 55), als Farbänderung (Abbildung 54) und als Geruchsveränderung von neutral nach „ranzig/ fischig“. Die im Verhältnis großvolumige Kruke wurde aus Handhabungsgründen gewählt, um die bröckelige Struktur nicht durch Druck und Reibung vorzeitig zu verflüssigen.

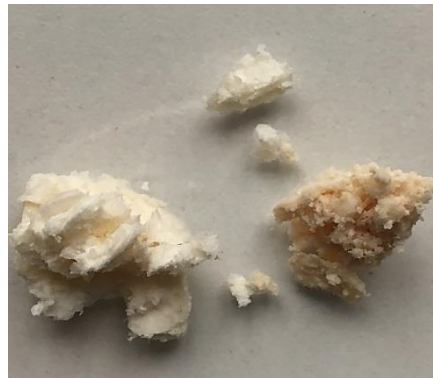


Abbildung 54 Verfärbung des ImiSOLs während der Lagerung

Innerhalb ca. 4 Wochen ohne Ausbluten der Lipidphase. Während das krümelige Erscheinungsbild bestehen bleibt, entwickelt das verfärbte Produkt einen stark nach Fisch erinnernden Geruch und kann die Wirksamkeit der frisch hergestellten Formulierung nicht erreichen.



Abbildung 55 Zeitlicher Verlauf der Phasentrennung in ImiSOL binnen ca. 4 Wochen
 Das Ausbluten trat nur bei vereinzelt Chargen auf, verstärkte sich dann aber über die Lagerung. Die Bilder wurden in nicht definierten Zeitabständen innerhalb ca. 4 Wochen aufgenommen.

Wurde die „verdorbene“ Zubereitung zur Immunisierung verwendet, konnten vorher erhaltene Ergebnisse nicht reproduziert werden. Aufgrund von Gehaltsmessungen an frischer wie veralteter Rezeptur konnte ein Abbau des Wirkstoffs ausgeschlossen werden; dieser lag nach zwei Monaten bei 100 %. Verunreinigungen oder Abbauprodukte des Wirkstoffs konnten nicht nachgewiesen werden. Eine Methode zur Gehaltsüberprüfung von Squalen in Kombination mit Tocopherol konnte zwar innerhalb dieser Arbeit nicht etabliert werden, doch sprechen die Immunisierungsdaten für den essentiellen Einfluss des Squalens auf den Impferfolg. Aufgrund der beschriebenen Daten scheidet ein Wechsel der Lipidphase aus, somit stellen sich drei Fragen: ist ein Wechsel oder eine zusätzliche Gabe eines potenteren Antioxidans als Tocopherol möglich? Steht eine an die Arzneiform optimierte Verpackung zur Verfügung, die weniger Luft einschließt und einen höheren Lichtschutz bietet? Spielt die Temperatur überhaupt eine entscheidende Rolle?

Tabelle 37 Alternative antioxidative Adjuvanzen zu Tocopherol
 Die Gruppierung erfolgte nach chemischen Strukturmerkmalen und Hydrophilie.

Hydrophil	Lipophil
Flavonoide: Oligomere Proanthocyanidine (OPC), Anthocyane	Carotinoide: Zeaxanthin, Lycopin, b-Carotin, Lutein, Astaxanthin
Polyphenole: Ellagsäure	Ubichinon-10 (Coenzym Q10)
Vitamine: Ascorbinsäure	Vitamine: Retinol, Tocopherol, Ascorbinsäure-Palmitat, Menadion
Glutathion	Tocotrienole
	Allicin

Die Frage der Temperaturempfindlichkeit kann an dieser Stelle nicht abschließend beantwortet werden. Erste empirische Stabilitätsversuche unter Lagerung bei tiefen (-80 °C) wie höheren Temperaturen (30 °C) zeigten das gleiche Erscheinungsbild der Formulierung, allerdings in Abhängigkeit zur Lagerungszeit. Dieses Verhalten entspricht der Arrhenius-Gleichung, die besagt, dass chemische Prozesse bei erhöhten Temperaturen schneller ablaufen (8). Meines Erachtens nach spielt die Temperatur aus derzeitiger Datenlage allerdings keinen entscheidenden Faktor der Haltbarmachung, deswegen soll an dieser Stelle nur eine Empfehlung zur kühlen Lagerung ausgesprochen werden.

Während die Frage nach einer geeigneten Primärverpackung im nächsten Unterkapitel besprochen wird, sollte der Einfluss des zweiten Antioxidans, das Squalen zugemischt wird, stärker betrachtet werden. Hier steht eine Vielzahl von Stoffen zur Verfügung, die

entsprechend Tabelle 37 in hydrophil und lipophil eingeteilt werden soll, wobei für ImiSOL nur die fettlöslichen Kandidaten von Interesse sind.

Eine theoretische Vorauswahl der hier angeführten Antioxidantien für zukünftige Formulierungen macht wenig Sinn, da die Interaktionspotentiale innerhalb der Formulierung zu komplex sind. Die Substanzen sollen hier nur oberflächlich behandelt werden: Allicin, als Naturstoff aus den Knoblauchgewächsen isolierbar, ist ein sehr instabiler Stoff, der nach Oxidation ein vielfältiges Muster an Abbauprodukten (Sulfide, Dithiine und Ajoene) zeigt. Eine Plausibilitätsprüfung sowie eine analytische Methodik wären ungemein aufwendig. Carotinoide besitzen meist von Natur aus eine Färbung, sodass die Formulierung wahrscheinlich ein oranges bis rot-bräunliches Erscheinungsbild hätte. Der jetzige Verfall ImiSOLs könnte nicht mehr visuell bestimmt werden. Die Vitamine könnten als Mischung oder als Einzelsubstanzen eingesetzt werden, wobei Tocopherol gegen Tocotrienol ersetzt werden sollte. Dieses ist aufgrund seiner drei Doppelbindungen lipophiler als Vitamin E und besitzt mehr Oxidationsstellen. Zuletzt wäre Ubichinon als bewährtes breitflächig eingesetztes Anti-Aging-Kosmetikum zu nennen. Dabei spielt das körpereigene Molekül innerhalb der mitochondrialen ATP-Bildung sowohl eine oxidative wie reduktive Rolle.

Entwicklung eines pflasterbasierten Applikationssystems für ImiSOL

Der momentane Entwicklungsstand von ImiSOL zeigt eine immunologisch potente Formulierung, die derzeit in einer ungünstigen Applikationsform und Primärverpackung vorliegt. Wie auf den Abbildung 9 und Abbildung 10 gezeigt, liegt ein plastisch verformbares bröckliges Produkt nach Lyophilisierung vor, das bisher in apothekenüblichen Kruken überführt wurde. Für die Versuche an Nagern stellt dieses Vorgehen sicher einen praktikablen Ansatz dar, ist aber für eine einfache und kostengünstige Anwendung am Menschen nicht denkbar. Die Kunststoff-Kruke bietet weder einen ausreichenden Lichtschutz, noch einen Schutz vor Luftsauerstoff. Durch das lockere Stapeln der ImiSOL-Bröckchen entsteht eine Vielzahl an Lufträumen, die potentielle Angriffsflächen für Oxidationsprozesse darstellen. Eine formschlüssige Befüllung, wie sie aus der Apotheke bei Rezeptur-Standgefäßen bekannt ist, wäre zu bevorzugen.



Abbildung 56 Schematische Darstellung eines TTS Typ Matrixsystem nach Voigt

Der generelle Aufbau eines Stützringes mit einer formulierungstragenden Kavität dient als Vorlage für die später vorgestellte Eigenentwicklung (8). Für das hiesige Vorhaben wäre eine okklusive Folie nicht vorteilhaft, da die Permeation erleichtert würde. Die Herstellung des eigenen Prototypen wird in Abbildung 57 dargestellt.

Pflasterähnliche Systeme stellen hier den besseren Ansatz dar. Sie können ähnlich der klassischen halbfesten Formen vom Patienten eigenverantwortlich und einfach aufgetragen und entfernt werden. Als altbekanntes und toleriertes System könnten Pflaster die Compliance der Benutzer unterstützen und so den Therapieerfolg der Impfung steigern. Ausgehend der derzeitigen Anwendungsanweisung für Aldara® (96), wird die Lotion nachts

aufgetragen und am nächsten Morgen mit milder Seife abgewaschen (6-10 Stunden). Identisch könnte mit dem Imiquimod-haltigen Pflaster verfahren werden, unabhängig der Tageszeit. Des Weiteren wird Imiquimod derzeit als Menge-pro-Fläche verabreicht. So wird beispielsweise ein Sachet Aldara® mit 250 mg Formulierung auf ca. 25 cm² aufgetragen. Pflaster erfüllen diese Dosierungstechnik per se, sodass nur die entsprechende Menge ImiSOL auf das Trägersystem aufgebracht werden müsste. Zur praktischen Umsetzung dieser Formulierung wäre ein bereits entwickelter Ansatz denkbar: die Verwendung eines transdermalen Therapiesystems (TTS). Eigentlich besitzt dieses den Anspruch, Wirkstoffe über einen definierten Zeitraum kontinuierlich durch die Haut zu applizieren und systemisch verfügbar zu machen. Generell stehen hierfür drei Varianten zur Verfügung: das Membransystem, die Matrix und das Mikroreservoir. Die im Falle der Immunisierung gerade nicht gewünschte systemische Wirkung ist allerdings nicht auf der Konstruktion des Pflastersystems begründet, sondern viel mehr in der Wirkstoffformulierung. Durch Ersetzen der eigentlichen Gelmatrix durch ImiSOL könnte das Pflaster umfunktioniert und somit der technische Aufbau des TT-Systems Matrix (siehe Abbildung 56) als funktionale Grundlage genutzt werden.

Die Kavität des gezeigten Adhäsivringes würde hierzu mit der flüssigen ImiSOL-Emulsion gefüllt und gefriergetrocknet werden. Nachdem sich ein fester Kuchen im Napf gebildet hat, wird dieser durch eine Abdeckfolie verschlossen und sekundärverpackt (siehe Abbildung 57). Hierbei müsste der Napf nicht vollständig befüllt sein. Selbst bei nicht formschlüssiger Befüllung bestände weniger Oxidationsfläche als in der bisherigen Kruke. Sollte selbst diese Maßnahme nicht ausreichen, müsste die Abdeckfolie unter Schutzgas und Abwesenheit von Sauerstoff aufgebracht werden. Zur Anwendung würde die Abdeckfolie wieder entfernt und der gefüllte Pflasterring auf die Hautpartie aufgeklebt werden. Nun folgt durch Druckmassage auf das Pflaster die Verflüssigung des ImiSOLs und dementsprechend die Einwanderung des Antigens und Imiquimod in die Haut. Durch mehrmalige Massage über den Tag verteilt würden am Pflaster anhaftende Formulierungsreste auf die Haut übertragen.

Die hier eingesetzten Materialien sind bei der Therapie durchaus mitbestimmend. Durch abgedichtete Folien können Okklusionseffekte ausgelöst werden, die wiederum eine hier unerwünschte Permeation in tiefere Hautgebiete ermöglichen. Entsprechend luft- und feuchtedurchgängig oder –permeabel sollte sie sein. Medizinisch-pharmazeutisch genutzte Klebmassen basieren auf Kautschuk oder Mischpolymerisaten der Acrylsäure. Beide Klebstoffe besitzen allergisierendes Potential. Als Prüfungen empfiehlt Voigt (8) verschiedene Klebkraftprüfungen (Schälklebkraft, Scherklebkraft), Reißfestigkeit und Fadendichte des Gewebes sowie Luft- und Wasserdampfdurchlässigkeit des Systems. Aus biopharmazeutischer Sicht würde eine Freisetzungsprüfung an der Franz-Zelle zielführende Ergebnisse liefern.

Kombination verschiedener TLR-Agonisten

In der Literatur werden mindestens 10 Toll-Like-Rezeptoren im Menschen beschrieben, deren Hauptaufgabe die Weiterleitung von PAMPs-Signalen an das angeborene Immunsystem darstellt. Eine Unterscheidung kann anhand der Exprimierung im Körper und der Ligandenspezifität getroffen werden (siehe Tabelle 1). Im Kontext der in dieser Arbeit angestrebten transdermalen Immunisierung könnten zukünftig synergistische Effekte durch Kombination von TLR7- mit TLR3-Agonisten untersucht werden.

TLR3-Rezeptoren werden hauptsächlich auf dendritischen Zellen exprimiert, die virale Doppelstrang-RNS (bspw. Retroviren) erkennen können. Durch Bindung eines Agonisten an den Rezeptor wird verstärkt IRF-3 (Interferon regulierender Faktor 3) aktiviert und letzten

Endes IFN- α (Interferon- α) gebildet (161). Diese Kaskade unterscheidet sich zu allen anderen Rezeptoren, die die Bildung von NF- κ B induzieren. Beide Reaktionswege führen kombiniert zu einer gesteigerten Immunantwort (162). Als Beispiele für bereits eingesetzte TLR3-Agonisten sei Hiltonol[®] (Poly-ICLC) und Poly-(I:C) genannt, die beide synthetisch hergestellte Doppelstrang-RNS imitieren. Während Poly(I:C) aus den Bausteinen Polyinosin- und Polycytidinsäure zusammengesetzt ist, besteht der PolyICLC-Komplex aus Carboxymethylcellulose, Polyinosin-Polycytidinsäure und Poly-L-Lysin. Während dieser Arbeit wurde die Verwendung von Dithranol in ersten Versuchen an Mäusen mit vielversprechenden Ergebnissen verwendet. Das Anthracen-Derivat wird zur Behandlung von Psoriasis-Patienten eingesetzt und zeigt ebenfalls synergistische Effekte in Kombination mit TLR7-Ligation.

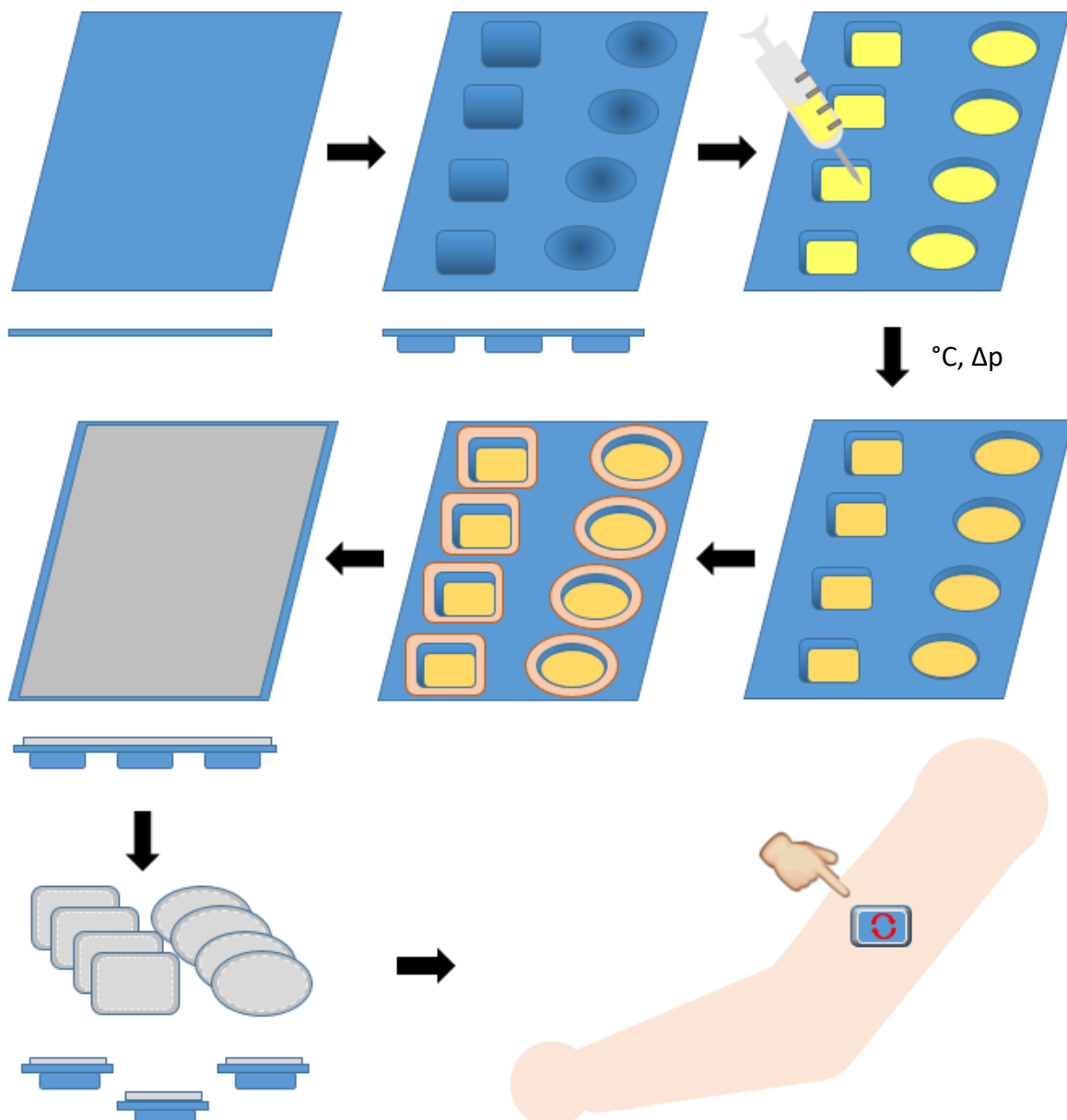


Abbildung 57 Mögliche Herstellung eines eigenen TTS

Die Produktionsschritte gliedern sich wie folgt auf: Tiefziehen der semipermeablen Trägerfolie – Befüllen der Kavitäten mit der wirkstoffhaltigen Mahlsuspension – Gefriertrocknung – Aufbringen des Adhäsivringes – Aufbringen der Deckfolie – Vereinzelung – Applikation bspw. am Oberarm. Die Deckfolie muss vor Aufbringen entfernt werden. Durch Druckmassage des Pflasters, verflüssigt sich die Formulierung, tritt mit der Körperoberfläche in Kontakt und kann in die Haut permeieren. Die Massage wäre über den Tag zu wiederholen. Zur Beendigung der Anwendung wird das Pflaster entfernt.

Zusammenfassend sind in dieser Arbeit wesentliche Fortschritte in der Entwicklung der beiden vorgestellten Arzneimittel zur transkutanen Immunisierung gemacht worden. Die weitere Optimierung beider Imiquimod-Systeme und schließlich deren klinische Prüfung werden den Weg dieser neuen Impfstrategie ebnen. Neben einer breitflächigen nicht-invasiven Anwendung in der Pädiatrie, dem Militär, diversen Kliniken und hausärztlichen Praxen ersparen die halbfesten Formulierungen unzählige Verletzungen und evtl. Folgekrankheiten. Zudem kann das Anwendungsgebiet von klassischen Impfungen auf bspw. Krebstherapien ausgeweitet werden.

7 Literaturverzeichnis

1. **Voigt, Rudolf.** *Pharmazeutische Technologie*. 11. s.l. : Deutsche Apotheker Verlag, 2010.
2. **Rachbauer S., Soyer H.P.** www.netdokter.at. *www.netdokter.at*. [Online] August 2015. [Zitat vom: 17.. Juli 2018.] <https://www.netdokter.at/anatomie/haut-7146>.
3. **Munke, Dr. Sven.** www.cd-koerperpflege.de. *www.cd-koerperpflege.de*. [Online] Lornamead GmbH. [Zitat vom: 17. Juli 2018.] <https://cd-koerperpflege.de/was-hat-der-phwert-mit-einer-gesunden-haut-zu-tun/>.
4. **Bliss, Don.** National Cancer Institute Visuals Online. [Online] National Cancer Institute, 26.. Mai 2010. [Zitat vom: 13.. August 2018.] <https://visualsonline.cancer.gov/details.cfm?imageid=4604>.
5. **Kashem S.W., Haniffa M., Kaplan D.H.** Antigen-Presenting Cells in the skin. *Annual Review of Immunology*, 35. 2017, S. 469-499.
6. **Nicolay, N.** DocFlex Lexikon. [Online] DocFlex Lexikon, 15.. April 2018. [Zitat vom: 14.. August 2018.] <http://flexikon.doccheck.com/de/Langerhans-Zelle>.
7. **Vollmar A., Dingermann T.** *Immunologie Grundlagen und Wirkstoffe*. s.l. : Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, 2005.
8. **Alila07.** *Epidermis der Haut*. Dreamstime.com, s.l. : s.n.
9. **McCarley, K.D & Bunge, A.L.** Review of pharmacokinetic models of dermal absorption. *Pharmaceut Sci.* 90:. 2001, S. 1699–1719.
10. **Illel B., Schaefer H., Wepierre J., Doucet O.** Follicles play an important role in percutaneous absorption. *Pharm Sci.* 80. 1991, S. 424–427.
11. **Becker, M.** *Charakterisierung der Arzneistoffabsorption aus flüssigen Externa zur kutanen Anwendung*. Mainz : s.n., 2003.
12. **Lademann J., Richter H., Schaefer U.F., Blume-Peytavi U., Teichmann A., Otberg N., Sterry W.** Hair Follicles – A Long-Term Reservoir for Drug Delivery. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol*; 19. 2006, S. 232–236.
13. **Simonetti O., Hoogstraate A.** Visualization of diffusion pathways across the stratum corneum of native and in-vitro-reconstructed epidermis by confocal laser scanning microscopy. *Archives of Dermatological Research.* 287. 1995, S. 465–473.
14. **Elias, P.** Epidermal lipids, membranes, and keratinization. *International Journal of Dermatology.* 20. 1981, S. 1–19.
15. **Chemgapedia, Chemgaroo.** Chemgaroo Chemgapedia. *Chemgaroo Chemgapedia*. [Online] Chemgaroo Chemgapedia. [Zitat vom: 17. Juli 2018.] http://www.chemgapedia.de/vsengine/vlu/vsc/de/ch/16/bbz/bbz_statwahr.vlu/Page/vsc/de/ch/16/bbz/bbz_statwahr_statmass.vscml.html.
16. **Zacchi V., Soranzo C.** In vitro engineering of human skin-like tissue. *Biomedical Materials Research.* 1998; 40(2), S. 187-194.
17. **BMEL.** www.bmel.de. [Online] BMEL, 18. November 2015. [Zitat vom: 18. November 2018.] https://www.bmel.de/DE/Tier/Tierschutz/_texte/TierschutzTierforschung.html?docId=7027766.
18. **PŘBORSKÝ J., Mühlbachová E.** Evaluation of in-vitro percutaneous absorption across human skin and in animal models. *Pharmacy and Pharmacology.* 1990, 42(7), S. 468-472.
19. **Dick I., Scott R.** Pig Ear Skin as an in-vitro Model for Human Skin Permeability. *Pharmacy and Pharmacology.* 1992; 44(8), S. 640-645.

- 20. Glindemann, Andreas.** *Beziehungen zwischen verschiedenen Parametern des Energiestoffwechsels und der Eutergesundheit beim Milchrind unter Berücksichtigung des Melksystems.* München : s.n., 2006.
- 21. Pittermann, W.** <http://www.gd-online.de>. [Online] Institute for Dermopharmacy GmbH, 2000. [Zitat vom: 25. November 2018.] http://www.gd-online.de/german/originals_d/Pittermann2000.html.
- 22. World Health Organisation.** World Health Organisation. [Online] World Health Organisation, 2019. [Zitat vom: 10. 11 2019.] <https://www.who.int/emergencies/ten-threats-to-global-health-in-2019>.
- 23. Robert Koch Institut.** Impfquoten bei Erwachsenen in Deutschland - Aktuelles aus der KV-Impfsurveillance und der Onlinebefragung von Krankenhauspersonal. [Hrsg.] Robert Koch Institut. *Epidemiologisches Bulletin.* 31. Oktober 2019, 44.
- 24. Bundesministerium für Gesundheit.** www.bundesgesundheitsministerium.de. [Online] 17. Juli 2019. [Zitat vom: 10. 11 2019.] https://www.bundesgesundheitsministerium.de/fileadmin/Dateien/3_Downloads/Gesetze_und_Verordnungen/GuV/M/Masernschutzgesetz-RefE.pdf.
- 25. Amorija J.P., Kersten G., Saluja V., Tonnis W.** Towards tailored vaccine delivery: Needs, challenges and perspectives. *Journal of Controlled Release; 161 (2).* 2012, S. 363-376.
- 26. Rehman K., Aluwi M., Rullah K., Wai L.K., Amin M., Zulfakar M.H.** Probing the effects of fish oil on the delivery and inflammation-inducing potential of imiquimod. *International Journal of Pharmaceutics; 490 (1-2).* 2015, S. 131-141.
- 27. Prüss-Ustün A., Rapiti E., Hutin Y.** Estimation of the global burden of disease attributable to contaminated sharps injuries among health-care workers. *American Journal of Industrial Medicine; 48(6).* 2005, S. 482-490.
- 28. Hofmann F., Kralj N., Beie M.** Needle Stick Injuries in Health Care - Frequency, Causes und Preventive Strategies. *Gesundheitswesen; 64(5).* 2002, S. 259-266.
- 29. Allegranzi, Benedetta.** WHO. [Online] [Zitat vom: 19. 02 2019.] https://www.who.int/medical_devices/Sun_pm_SAF_2_ALLEGRANZI.pdf.
- 30. Rini C.J., McVey E., Sutter D., Keith S., Kurth H.J., Nosek L., Kapitzka C., Rebrin K., Hirsch L., Pettis R.J.** Intradermal insulin infusion achieves faster insulin action than subcutaneous infusion for 3-day wear. *Drug Delivery and Translational Research.* 2015; 5(4): 332-345.
- 31. Ita, Kevin.** Transdermal delivery of vaccines – Recent progress and critical issues. *Biomedicine & Pharmacotherapy.* 2016; 83, S. 1080-1088.
- 32. Sullivan S.P., Koutsonanos D.G., Del Pilar Martin M., Lee J.W., Zarnitsyn V., Choi S.O., Murthy N., Compans R.W., Skountzou I., Prausnitz M.R.** Dissolving polymer microneedle patches for influenza vaccination. *Nature Medicine, 16 (8).* 2010, S. 915-920.
- 33. Bramson J. Dayball K., Eveleigh C., Wan Y.H., Page D., Smith A.** Enabling topical immunization via microporation: a novel method for pain-free and needle-free delivery of adenovirus-based vaccines. *Gene Therapy; 10.* 2003, S. 251-260.
- 34. Waltenbaugh C., Doan T., Melvold R., Viselli S.** *Immunology. Lippincott's Illustrated reviews.* Philadelphia : Wolter Kluwer Health/ Lippincott Williams & Wilkins, 2008. S. 17.
- 35. Vacchelli E., Galluzzi L., Eggermont A., Fridman W.H., Galon J., Sautès-Fridman C., Tartour E., Zitvogel L., Kroemer G.** Trial watch: FDA-approved Toll-like receptor agonists for cancer therapy. *OncImmunity.* 2012; 1 (6):894-907. 2012.
- 36. Lin E., Freedman J.E., Beaulieu L.M.** Innate Immunity and Toll-like Receptor Antagonists: A Potential Role in the Treatment of Cardiovascular Diseases. *Cardiovascular Therapeutics; 27 (2).* 2009, S. 117-123.

- 37. The National Center for Biotechnology Information.** TLR7 toll like receptor 7 [Homo sapiens (human)] . [Online] 05. August 2018. [Zitat vom: 31. August 2018.] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/51284>.
- 38. Arzneibuch-Kommission, Europäische.** *Europäisches Arzneibuch*. s.l.: Deutscher Apotheker Verlag, 2011. Bd. 7.0.
- 39. Information, National Center for Biotechnology.** PubChem Compound Database. [Online] 15. September 2018. [Zitat vom: 21. September 2018.] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/57469>.
- 40. Agency, European Medicines.** <http://www.ema.europa.eu/ema/>. <http://www.ema.europa.eu/ema/>. [Online] Dezember 2017. [Zitat vom: 21. September 2018.] http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Summary_for_the_public/human/000179/WC500023123.pdf.
- 41. Mutschler.** *Mutschle Arzenimittelwirkungen. Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie*. Stuttgart : Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, 2008. Bd. 9. Auflage. 978-3-8047-1952-1.
- 42. Lopez P.A., Denny M., Hartmann A.K., Alfien A, Probst H.C., von Stebut E., Tenzer S., Schild H., Stassen M., Langguth P., Radsak M.P.** Transcutaneous immunization with a novel imiquimod nanoemulsion induces superior T cell responses and virus protection. *Dermatological Science*. 2017; 87(3), S. 252–259.
- 43. Stein P., Gogoll K., Tenzer S., Schild H., Stevanovic S., Langguth P., Radsak M.P.** Efficacy of Imiquimod-Based Transcutaneous Immunization Using a Nano-Dispersed Emulsion Gel Formulation. *Plos One*; 9(7). 2014.
- 44. Harrison L.I., Skinner S.L., Marbury T.C., Owens M.L., Kurup S., Mckane S., Greene R.J.** Pharmacokinetics and safety of imiquimod 5% cream in the treatment of actinic keratosis of the face, scalp or hands and arms. *Archives of Dermatology Research*, 296. 2004, S. 6-11.
- 45. Kulp J., Levy S., Fein M.C., Adams M., Furst J., Meng T.C.** Pharmacokinetics of imiquimod 3.75% cream applied daily for 3 weeks to actinic keratoses on the face and/or balding scalp. *Arch Dermatol Res*; 302(7). 2010, S. 539-544.
- 46. www.pdr.net/. www.pdr.net.** [Online] Mai 2014. [Zitat vom: 18. Juni 2019.] <https://www.pdr.net/drug-summary/Aldara-imiquimod-1348>.
- 47. Kola, I.** The State of Innovation in Drug Development. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*; 83(2). 2008, S. 227-230.
- 48. Paul S.M., Mytelka D.S., Dunwiddie C.T., Persinger C.C., Munos B.H., Lindborg S.R., Schacht A.L.** How to improve R&D productivity: the pharmaceutical industry's grand challenge. *Nature Review Drug Discovery*; 9(3). 2010, S. 203-214. Modifiziert durch VFA die forschenden Pharmaunternehmen.
- 49. Europäische Kommission, Generaldirektorat für Gesundheit und Nahrungsmittelgesundheit.** www.ec.europa.eu. [Online] [Zitat vom: 25. 02 2019.] https://ec.europa.eu/health/sites/health/files/files/eudralex/vol-10/regulation5362014_qa_en.pdf.
- 50. Justiz, Bundesamt für.** www.gesetze-im-internet.de. [Online] [Zitat vom: 25. 02 2019.] https://www.gesetze-im-internet.de/amg_1976/AMG.pdf.
- 51. Justiz, Bundesamt für.** www.gesetze-im-internet.de. [Online] [Zitat vom: 25. 02 2019.] <https://www.gesetze-im-internet.de/amwhv/AMWHV.pdf>.
- 52. Falconer J.R., Steadman K.J.** Extemporaneously compounded medicines. *Australian Prescriber*; 40(1). 2017, S. 5-8.

- 53. Union, Europäische.** www.eur-lex.europa.eu. [Online] 31. 03 2004. [Zitat vom: 25. 02 2019.] <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/DE/TXT/PDF/?uri=CELEX:32004R0726&from=DE>.
- 54. WMA, Weltärztebund.** *WMA Deklaration von Helsinki- Ethische Grundsätze für die medizinische Forschung am Menschen.* Fortaleza (Brasilien) : s.n., 2013.
- 55. BASG, AGES /.** *Information zum Heilversuch („Named Patient Use“) in Österreich.* Wien : s.n., 2015.
- 56. Pharmaunternehmen, vfa - Die forschenden.** *Behandlung mit Medikamenten, die noch nicht zugelassen sind.* [Homepage] Berlin : Verband Forschender Arzneimittelhersteller e.V.
- 57. Gogoll K., Stein P., Wei H., Schild H.J., Radsak M., Langguth P.** Comparative transcutaneous immunization with imiquimod-containing ointments and potential of in vitro methods to predict effects. *Biopharmaceutics & Drug Disposition*; 33. 2012.
- 58. Lademan J, Patzelt A, Richter H.** Comparison of two in vitro models for the analysis of follicular penetration and its prevention by barrier emulsions. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 72. 2009, S. 600-604.
- 59. Gogoll, K.** *Imiquimod based transcutaneous immunization – insights and novel concepts.* Mainz : s.n., 2014.
- 60. Gogoll K., Stein P., Lee K.D., Arnold P., Peters T., Schild H.J., Radsak M.P., Langguth P.** Solid nanoemulsion as antigen and immunopotentiator carrier for transcutaneous immunization. *Cellular Immunology*; 308. 2016, S. 35-43.
- 61. Stieß, M.** *Mechanische Verfahrenstechnik 2.* s.l. : Springer, 1994.
- 62. GmbH, Fritsch.** www.fritsch.de. www.fritsch.de. [Online] Fritsch GmbH, 2018. [Zitat vom: 24. Juli 2018.] <https://www.fritsch.de/probenaufbereitung/mahlen/planetenmuehlen/details/produkt/pulverisette-6-classic-line/zubehoer/>.
- 63. Changsha Deco Ausrüstung Co., Ltd.** www.de.lab-powder-mill.com. [Online] Changsha Deco Ausrüstung Co., Ltd. [Zitat vom: 27. 02 2019.] <http://de.lab-powder-mill.com/all-lab-planetary-ball-mills/planetary-ball-mill-for-geology.html>.
- 64. Abel G., Gross L.** <https://www.zusatzstoffe-online.de>. [Online] Die Verbraucherinitiative e.V. [Zitat vom: 27. 02 2019.] https://www.zusatzstoffe-online.de/zusatzstoffe/162.e433_polysorbat_80.html.
- 65. Buttle, Ilona.** *O/W-Emulsionen für die intravenöse Applikation von Arzneistoffen.* 2004.
- 66. Schultz S., Wagner G., Urban K., Ulrich J.** High-Pressure Homogenization as a Process for Emulsion Formation. *Chemical Engineering & Technology*, 27 (4). 2004.
- 67. Roth, Claudia.** *Ein Mikro-Waageverfahren zur kontinuierlichen Bestimmung der Sublimationsgeschwindigkeit während der Gefrieretrocknung.* 2000.
- 68. Lademann J., Jacobi U., Surber C., Weigmann H.J., Fluhr J.W.** The tape stripping procedure - evaluation of some critical parameters. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*; 72 (2). 2009, S. 317-323.
- 69. Avwioro, Godwin.** Histochemical Uses Of Haematoxylin - A Review. *Journal of Physics: Conference Series*; 1. 2011.
- 70. Hyun-A K., Jung-Kwan S., Taksoo K., Byung-Tae L.** Nanometrology and its perspectives in environmental research. *Environ Health Toxicol* 29. 2014, e2014016.
- 71. Thomas, J. C.** The determination of log normal particle size distributions by dynamic light scattering. *Journal of Colloid and Interface Science*; 117 (1). Thomas, J. C. "The determination of log normal particle size distributions by dynamic light scattering" *J. Colloid Interface Sci.* 117 (1) pp 187-192 (1987) 1987, S. 187-192.

72. **ISO.** www.iso.org. [Online] 2017. [Zitat vom: 03. 03 2019.] <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:22412:ed-2:v1:en>.
73. **Gilbert R.G., Hess M., Jenkins A.D., Jones R.G., Kratochvíl P., Stepto R.F.T.** Dispersity in Polymer Science. *International Union of Pure and Applied Chemistry; 81 (2)*. 2009, S. 351–353.
74. **AG, Instrumat.** *Exosomes and Microvesicles: An introduction*. [Whitepaper] s.l. : Instrumat AG, 2014.
75. **Carr B., Wright M.** *Nanoparticle Tracking Analysis: A Review of Applications and Usage 2010 - 2012*. [Amesbury] s.l. : NanoSight Ltd., 2013.
76. **Czaplicki, Sylwester.** *Chromatography in Bioactivity Analysis of Compounds*. 2013.
77. **Salzer R., Thiele S., Zuern A., Zimmerer C., Bezugla E., Schleicher K.** <http://www.chemgapedia.de>. [Online] [Zitat vom: 01. 03 2019.] http://www.chemgapedia.de/vsengine/vlu/vsc/de/ch/3/anc/croma/hplc_detail1.vlu.html.
78. **ICH, International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use.** *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1)*. 2005.
79. **ICH, International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use.** *Stability Testing of New Drug Substances and Products Q1A (R2)*. 2003.
80. **Papula, Lothar.** *Mathematische Formelsammlung: Für Ingenieure und Naturwissenschaftler*. s.l. : Springer Vieweg, 2017. S. 576. 3658161949.
81. **Hartung, Joachim.** *Statistik: Lehr- und Handbuch der angewandten Statistik*. 13. s.l. : De Gruyter Oldenbourg, 2014. S. 1002. 3486259059.
82. **Imamović B., Šober M., Becić E.** HPLC determination of some frequently used parabens in sunscreens. *International journal of pharmacy teaching and practises*. 3 . 2012.
83. **B., Davani.** *The United States Pharmacopeia 42–NF 37*. 2011.
84. **Patzelt A, Richter H, Buetttemeyer R.** Differential stripping demonstrates a significant reduction of the hair follicle reservoir in vitro compared to in vivo. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 70. 2008, S. 234-238.
85. **Godin B, Touitou E.** Transdermal skin delivery: Predictions for humans from in vivo, ex vivo and animal models. *Advanced Drug Delivery Reviews* 59 . 2007, S. 1152-1161.
86. **Pschyrembel, W.** *Klinisches und pharmazeutisches Wörterbuch*. Berlin : de Gruyter, 2004.
87. **Taube, H.** *Die Reservoirkapazität des Stratum corneum – ein Vergleich von vier Methoden in vitro*. Berlin : s.n., 2011.
88. **Soria I, Myhre P, Horton V, Ellefsun P, McCarville S, Schmitt K and Owens M.** Effect of food on the pharmacokinetics and bioavailability of oral imiquimod relative to a subcutaneous dose. *Clinical Pharmacological Therapy*, 38. 2000, S. 476-481.
89. **Harrison L., Skinner S., Marbury T., Owens M., Kurup S., McKane S., Greene R.** Pharmacokinetics and safety of imiquimod 5% cream in the treatment of actinic keratoses of the face, scalp, or hands and arms. *Archives of dermatological research*, 296(1). 2004, S. 6-11.
90. **Hanke C.W., Beer K.R., Stockfleth E., Wu J., Rosen T., Levy S.** Imiquimod 2.5% and 3.75% for the treatment of actinic keratoses: results of 2 placebo-controlled studies of daily application to the face and balding scalp for two 3-week cycles. *American Academy of Dermatology; 62(4)*. 2010, S. 573-581.
91. **Donnelly R.F., McCarron P.A., Zawislak A.A., Woolfson A.D.** Design and physicochemical characterisation of a bioadhesive patch for dose-controlled topical delivery of imiquimod. *International Journal of Pharmacy; 307*. 2006, S. 318–325.
92. **Skoog D.A., Holler F.J., Crouch S.R.** *Principles of instrumental analysis*. Boston : Cengage Learning, 2016. S. 959.

- 93. De Paula D., Martins C.A., Bentley M.V.** Development and validation of HPLC method for imiquimod determination in skin penetration studies. *Biomedical Chromatography*; 22(12). 2008, S. 1416-1423.
- 94. Hussain S., Shaikh T., Farooqui M.** Development and Validation of Liquid Chromatography Method for the Determination and Quantification of Impurities in Imiquimod. *British Journal of Pharmaceutical Research*, 13(1). 2016, S. 1-9.
- 95. Balireddi V., Tirukkovalluri S.R., Tatikonda K.M., Surikutchi B.T., Mitra P.** Development and Validation of Stability Indicating UPLC–PDA/MS for the Determination of Imiquimod and its Eight Related Substances: Application to Topical Cream. *Journal of Chromatographic Science*, Volume 57 (3), 2019, Pages 249–257.
- 96. Harvey P.W., Everett D.J.** Significance of the detection of esters of p-hydroxybenzoic acid (parabens) in human breast tumours. *Applied Toxicology*, 24(1). 2004, S. 1-4.
- 97. Mowad, C.M.** Allergic Contact Dermatitis Caused by Parabens: 2 Case Reports and a Review. *American Journal of Contact Dermatitis*, 11(1). 2000, S. 53-56.
- 98. BfR, Bundesinstitut für Risikobewertung.** <https://www.bfr.bund.de>. <https://www.bfr.bund.de>. [Online] 2011. [Zitat vom: 18. Juli 2018.] https://www.bfr.bund.de/cm/343/verwendung_von_parabenen_in_kosmetischen_mitteln.pdf.
- 99. USP, United States Pharmacopeia.** <https://www.usp.org>. <https://www.usp.org>. [Online] 2016. [Zitat vom: 18. Juli 2018.] https://www.usp.org/sites/default/files/usp/document/harmonization/excipients/e27_pf_3_65_2010.pdf.
- 100. USP, United States Pharmacopeia.** <https://www.usp.org/>. <https://www.usp.org/>. [Online] 2016. [Zitat vom: 18. Juli 2018.] https://www.usp.org/sites/default/files/usp/document/harmonization/excipients/e49_pf_3_6_5_2010.pdf.
- 101. Kumar S., Mathkar S., Romero C., Rustum R.S.** Development and Validation of a Single RP-HPLC Assay Method for Analysis of Bulk Raw Material Batches of Four Parabens that are Widely Used as Preservatives in Pharmaceutical and Cosmetic Products. *Journal of Chromatographic Science*; 49. 2011, S. 405-411.
- 102. Antakli S., Kabani R., Shawa D.** Determination of Preservative Parabens in Oral and Injection Formulations in HPLC. *Asian Journal of Chemistry*; 25(2). 2013, S. 1123-1128.
- 103. Sosvorova L.K., Chlupacova T., Vitku J., Vlk M., Heracek J., Starka L., Saman D., Simkova M., Hampla R.** Determination of selected bisphenols, parabens and estrogens in human plasma using LC-MS/MS. *Talanta*; 174(1). 2017, S. 21-28.
- 104. Agency, EMA European Medicines.** <http://www.ema.europa.eu/>. <http://www.ema.europa.eu/>. [Online] 01. Dezember 2001. [Zitat vom: 24. Juli 2018.] http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Scientific_Discussion/human/000179/WC500023117.pdf.
- 105. Pharmaceuticals, MEDA. EMC+. EMC+.** [Online] MEDA Pharmaceuticals, 01. Februar 2017. [Zitat vom: 24. Juli 2018.] https://www.medicines.org.uk/emc/medicine/8#PHARMACOKINETIC_PROPS.
- 106. Wang, J.** <https://www.fda.gov/>. <https://www.fda.gov/>. [Online] 29. Januar 2010. [Zitat vom: 24. Juli 2018.] https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2010/022483Orig1s000PharmR.pdf.
- 107. Steinbach, Dr. Christoph.** <https://www.nanopartikel.info/>. <https://www.nanopartikel.info/>. [Online] DECHEMA e.V. [Zitat vom: 26. Juli 2018.]

<https://www.nanopartikel.info/nanoinfo/materialien/zirkoniumdioxid/materialinfo-zirkoniumdioxid#literatur>.

- 108. Stouten H., Ott H., Bouwman C., Wardenbach P.** Reassessment of occupational exposure limits - Case Report. *American Journal of industrial medicine*; 51(6). 2008, S. 407-418.
- 109. Group, ICH Expert.** <https://www.ich.org/>. [Online] 06. Februar 2003. [Zitat vom: 26. Juli 2018.]
https://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q1A_R2/Step4/Q1A_R2__Guideline.pdf.
- 110. Dr. Hörnig M., Dr. Reimann H.** *DAC/NRF-Loseblattwerk*. 10. Eschborn: Avoxa – Mediengruppe Deutscher Apotheker GmbH, 2018.
- 111. Steinhauer, K.** Mikrobiologische Prüfung mittels Konservierungsbelastungstests – Unterschiede in der Durchführung und Bewertung der Prüfung auf ausreichende Konservierung nach DIN (EN), Ph.Eur. und USP. *Pharmind*; 78. 2016, S. 101-106.
- 112. Walter A., Schäfer M., Cecconi V., Matter C., Urosevic-Maiwald M., Belloni B. Schönewolf N., Dummer R., Bloch W., Werner S., Beer H.D., Knuth A., van den Broek M.** Aldara activates TLR7-independent immune defence. *Nature communications*; 4. 2013.
- 113. Corp., Nook Marketing.** <https://www.jojoba-oel.net/>. <https://www.jojoba-oel.net/>. [Online] Nook Marketing Corp., 2018. [Zitat vom: 26. Juli 2018.] <https://www.jojoba-oel.net/>.
- 114. Reddy L.H., Couvreur P.** Squalene: A natural triterpene for use in disease management and therapy. *Advanced Drug Delivery Reviews*; 61 (15). 2009, S. 1412-1426.
- 115. Asa P.B., Wilson R.B., Garry R.F.** Antibodies to Squalene in Recipients of Anthrax Vaccine. *Experimental and Molecular Pathology*; 73(1). 2002, S. 19-27.
- 116. Patzelt A., Richter H., Knorra F., Schäfer U., Claus-Michael Lehr C.M., Dähne L., Sterry W., Lademann J.** Selective follicular targeting by modification of the particle sizes. *Journal of Controlled Release*; 150(1). 2011, S. 45-48.
- 117. Trauer S., Richter H., Kuntsche J., Büttemeyer R., Liebsch M., Linscheid M., Fahr A., Schäfer-Korting M., Lademann J., Patzelt A.** Influence of massage and occlusion on the ex vivo skin penetration of rigid liposomes and invasomes. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*; 86(2). 2014, S. 301-306.
- 118. Lademann J., Richter H., Teichmann A., Otberg A., Blume-Peytavi U., Luengo J., Weiß B., Schaefer U.F., Lehr C.M., Wepf R., Sterry W.** Nanoparticles – An efficient carrier for drug delivery into the hair follicles. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*; 66(2). 2007, S. 159-164.
- 119. Hansen L.S., Coggle J.E., Wells J., Charles M.W.** The influence of the hair cycle on the thickness of mouse skin. *The Anatomical Record*; 210(4). 1984, S. 569-573.
- 120. Lauer A.C., Lieb L.M., Ramachandran C.** Transfollicular Drug Delivery. *Pharmaceutical Research*; 12(2).
- 121. Redaktion www.self-diagnostics.com.** [Online] nal von minden GmbH, 27. April 2016. [Zitat vom: 18. November 2018.] <https://www.self-diagnostics.com/de/blog/haaranalytik-bestandteil-diagnostik/>.
- 122. Kietzmann M., Lubach D., Heeren J.H.** The mouse epidermis as a model in skin pharmacology: influence of age and sex on epidermal metabolic reactions and their circadian rhythms. *Laboratory animals*; 24. 1990.
- 123. Begum S., Lee M.R., Gu L.J., Hossain J., Kim H.K., Sung C.K.** Comparative Hair Restorer Efficacy of Medicinal Herb on Nude (Foxn1nu) Mice. *Biomed Research International*; 319795. 2014.

- 124. Meyer W., Zschemisch N.H.** Skin layer thickness at the ear of the domesticated pig , with special reference to the use of the ear integument for human dermatological research. *Berl Munch Tierarztl Wochenschrift*; 115(11-12). 2002, S. 401-406.
- 125. Jacobi U., Kaiser M., Toll R., Mangelsdorf S., Audring H., Otberg N., Sterry W., Lademann J.** Porcine ear skin: an in vitro model for human skin. *Skin Research & Technology*; 13(1). 2007, S. 19-24.
- 126. Holmgaard R., Benfeldt E., Nielsen J.B., Gatschelhofer C., Sorensen J.A., Höfferer C., Bodenlenz M., Pieber T.R., Sinner F.** Comparison of Open-Flow Microperfusion and Microdialysis Methodologies When Sampling Topically Applied Fentanyl and Benzoic Acid in Human Dermis Ex Vivo. *Pharmaceutical Research*; 29(7). 2012, S. 1808-1820.
- 127. Lange J., Eck P., Elliott G.R., de Kort W., Wolthuis O.L.** The isolated blood-perfused pig ear: an inexpensive and animal-saving model for skin penetration studies. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*; 27(2). 1992, S. 71-77.
- 128. Kietzmann M., Löscher W., Arens D., Maaß P., Lubach D.** The isolated perfused bovine udder as an in vitro model of percutaneous drug absorption skin viability and percutaneous absorption of dexamethasone, benzoyl peroxide, and etofenamate. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*; 30(2). 1993, S. 75-84.
- 129. Pittermann W., Kietzmann M.** The isolated perfused Bovine Udder Skin. *Altex*; 12(4). 1995, S. 196-200.
- 130. Teichmann A., Jacobi U., Ossadnik M.** Differential Stripping: Determination of the Amount of Topically Applied Substances Penetrated into the Hair Follicles. *Invest Dermatol* 125. 2005, S. 264-269.
- 131. Knorr F., Lademann J., Patzelt A.** Follicular transport route- Research progress and future perspectives. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 71. 2009, S. 173-180.
- 132. Rancan F., Vogt A.** Getting under the skin: what is the potential of the transfollicular route in drug delivery? *Therapeutic Delivery*; 5(8). 2014.
- 133. Pegoraro C., MacNeil S., Battaglia G.** Transdermal drug delivery: from micro to nano. *Nanoscale*; 4(6). Nanoscale. 2012 Mar 21;4(6);, 2012, S. 1881-1894.
- 134. Franzen L., Mathes C., Hansen S., Windbergs M.** Advanced chemical imaging and comparison of human and porcine hair follicles for drug delivery by confocal Raman microscopy. *Biomed Opt.*, 18(6). 2013.
- 135. Mak W C, Richter H, Patzelt A.** Drug delivery into the skin by degradable particles. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 79 (. 2011, S. 23-27.
- 136. Fox, C.B.** Review: Squalene Emulsions for Parental Vaccine and Drug Delivery. *Molecules*. 2009, S. 14.
- 137. Malvern.** <https://www.malvernpanalytical.com/de>. [Online] Malvern Panalyticals, 2018. [Zitat vom: 26. Juli 2018.] <https://www.malvernpanalytical.com/de/products/technology/nanoparticle-tracking-analysis>.
- 138. Malvern.** <https://www.malvernpanalytical.com/de/>. [Online] Malvern Panalytical, 2018. [Zitat vom: 26. Juli 2018.] <https://www.malvernpanalytical.com/de/products/product-range/zetasizer-range/zetasizer-nano-range>.
- 139. Sapsford K.E., Tyner K.M., Dair B.J., Deschamps J.R., Medintz I.L.** Analyzing Nanomaterial Bioconjugates: A Review of Current and Emerging Purification and Characterization Techniques. *Anal. Chem.*; 83(12). 2011, S. 4453-4488.
- 140. Hassellöv M., Readman J.W., Ranville J.F., Tiede K.** Nanoparticle analysis and characterization methodologies in environmental risk assessment of engineered nanoparticles. *Ecotoxicology*; 17(5). 2008, S. 344-361.

- 141. Kim H.A., Seo J.K., Kim T., Lee B.T.** Nanometrology and its perspectives in environmental research. *Environ Health Toxicol.*; 29(0). 2014.
- 142. Bae S., Hwang Y.S., Lee Y.J., Lee S.K.** Effects of water chemistry on aggregation and soil adsorption of silver nanoparticles. *Environmental Health and Toxicology*; 28. 2013.
- 143. Filipe V., Hawe A., Jiskoot W.** Critical Evaluation of Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) by NanoSight for the Measurement of Nanoparticles and Protein Aggregates. *Pharmaceutical Research*; 27(5). 2010, S. 796–810.
- 144. Elias M., Carney J.** African Shea Butter: A Feminized Subsidy from Nature. *Africa*; 77 (1). 2007, S. 37-62.
- 145. apotheken-wissen.de, Team.** <https://www.apotheken-wissen.de>. [Online] [Zitat vom: 05. 03 2019.] <https://www.apotheken-wissen.de/shea-butter/>.
- 146. Valenta C., Auner B.G., Loibl I.** Skin permeation and stability studies of 5-aminolevulinic acid in a new gel and patch preparation. *Journal of Controlled Release*; 107 (3). 2005, S. 495-501.
- 147. Valenta C., Janisch M.** Permeation of cyproterone acetate through pig skin from different vehicles with phospholipids. *International Journal of Pharmaceutics*; 258 (1-2). 2003, S. 133-139.
- 148. Duke, J.A.** <https://hort.purdue.edu/newcrop/default.html>. [Online] 1983. [Zitat vom: 05. 03 2019.] https://hort.purdue.edu/newcrop/duke_energy/Pongamia_pinnata.html#Folk%20Medicine.
- 149. Badole S.L., Pimple B.P.** Pongamia pinnata (Linn.) Used in Skin Disease. *Bioactive Dietary Factors and Plant Extracts in Dermatology*. 2012, S. 471-473 .
- 150. Hernandez-Pigeon H., Garidou L., Galliano M.F., Delga H., Aries M.F., Duplan H., Bessou-Touya S., Castex-Rizzi N.** Effects of dextran sulfate, 4-t-butylcyclohexanol, pongamia oil and hesperidin methyl chalcone on inflammatory and vascular responses implicated in rosacea. *Clinical, Cosmetic Investigational Dermatology*; 11. 2018, S. 421-429.
- 151. Balasaheb S.P., Balvant P.S., Kadam A.T.** Antipsoriatic Activity of gel containing Methylsulphonylmethane Powder and seed oil of Pongamia pinnata Linn. *Research Journal of Pharmacology and Pharmacodynamics*; 9 (3). 2017, S. 122-130.
- 152. Puglia S., Tropea S., Rizza L., Santagati N.A., Bonina F.** Invitro percutaneous absorption studies and in vivo evaluation of antiinflammatory activity of essential fatty acids (EFA) from fish oil extracts. *International Journal of Pharmaceutics*; 299 (1-2). 2005, S. 41-48.
- 153. Zulfakar M.H., Abdelouahab N., Heard C.M.** Enhanced topical delivery and ex vivo anti-inflammatory activity from a betamethasone dipropionate formulation containing fish oil. *Inflammation Research*; 59 (1). 2010, S. 23-30.
- 154. Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte.** www.bfarm.de. [Online] Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte, 27. September 2013. [Zitat vom: 01. Dezember 2019.] <https://www.bfarm.de/SharedDocs/Risikoinformationen/Pharmakovigilanz/DE/RI/2013/RI-chlorhexidin.html>.
- 155. Group, CSW - Chemical Selection Working.** National Toxicology Program - U.S. Department of Health and Human Services. [Online] 17. Dez 2003. [Zitat vom: 02. 06 2019.] https://ntp.niehs.nih.gov/ntp/htdocs/chem_background/exsumpdf/imidazolidinylurea_508.pdf.
- 156. Skinner S.L., Marks J.G.** Allergic contact dermatitis to preservatives in topical medicaments. *American Journal of Contact Dermatitis*; Vol 9 (4), 1998. S. 199-201.
- 157. Hectorne K.J., Fransway A.F.** Diazolidinyl urea: incidence of sensitivity, patterns of cross-reactivity and clinical relevance. *Contact Dermatitis*; Vol. 30 (1). 1994, S. 16-19.

- 158. Kantor G.R., Taylor J.S., Ratz J.L., Evey P.L.** Acute allergic contact dermatitis from diazolidinyl urea (Germall II) in a hair gel. *Journal of American Academy of Dermatology*; Vol. 13 (1). 1985, S. 116-119.
- 159. Shaughnessy C.N., Malajian D., Belsito D.V.** Cutaneous delayed-type hypersensitivity in patients with atopic dermatitis: Reactivity to topical preservatives. *Journal of the American Academy of Dermatology*; Vol. 70 (1). 2014, S. 102-107.
- 160. Review, CIR - Cosmetic Ingredient.** <https://www.cir-safety.org/ingredients>. [Online] 2003. [Zitat vom: 02. 06 2019.] <https://online.personalcarecouncil.org/ctfa-static/online/lists/cir-pdfs/pr254.pdf>.
- 161. Bugge M., Bergstrom B., Eide O.K., Solli H., Kjørstad I.F., Stenvik J., Espevik T., Nilsen N.J.** Surface Toll-like receptor 3 expression in metastatic intestinal epithelial cells induces inflammatory cytokine production and promotes invasiveness. *Journal of Biological Chemistry*; 292(37). 2017, S. 15408–15425.
- 162. Warger T., Osterloh P., Rechtsteiner G., Fassbender M., Heib V., Schmid B., Schmitt E., Schild H.J., Radsak M.P.** Synergistic activation of dendritic cells by combined Toll-like receptor ligation induces superior CTL responses in vivo. *Blood*; 108. 2006, S. 544-550.
- 163. Labmate-online.com.** *Labmate-online.com*. [Online] 04. August 2016. https://www.labmate-online.com/assets/file_store/pr_files/31297/images/thumbnails/800w-c3.jpg.
- 164. Pittermann W., Jackwerth B. and M. Schmitt.** The isolated perfused bovine udder skin model (BUS): A new in-vitro model for the assessment of skin penetration and irritation. *In Vitro Toxicology* 10. 1997, S. 17-21.
- 165. Pittermann W., Hörner V., Förster Th., Kietzmann M.** The use of natural and artificial skin models in cosmetic research. *SÖFW-Journal* 123. 1997, S. 666-670.
- 166. Förster Th., Jackwerth B., Pittermann W., van Rybinsky W., Schmitt M.** Properties of Emulsions: Structures and Skin Penetration. *Cosmetics and Toiletries* 112. 1997, S. 73-82.
- 167. Förster Th., Pittermann W., Schmitt M., Kietzmann M.** Skin Penetration Properties of Cosmetic Formulations using a Perfused Bovine Udder Model. *Cosmet. Sci.* 50. 1999, S. 147-157.
- 168. Pittermann W., Gassenmeier Th., Nieveler S., Förster Th., Kietzmann M.** Experimentally Induced Epidermal Barrier Perturbation: Measurement of Transepidermal Water Loss (TEWL) Using the Perfused Bovine Udder Skin (BUS) Model. *IFSCC-Magazine* 3. 2000, S. 29-32.
- 169. Piazena H., Pittermann W., Müller W., Jung K., Kelleher D.K., Herrling T., Meffert P., Uebelhack R., Kietzmann M.** Effects of water-filtered infrared-A and of heat on cell death, inflammation, antioxidative potential and of free radical formation in viable skin-first results. *Photochem Photobiol B* 138. 2014, S. 347-354.
- 170. Fritsch, Peter.** *Dermatologie und Venerologie. 2. Auflage.* s.l. : Springer Verlag, 2004. ISBN 3-540-00332-0.
- 171. Grams Y., Bouwstra J.** Penetration and distribution of three lipophilic probes in vitro in human skin focusing on the hair follicle. *Control Release.* 83. 2002, S. 253–262.
- 172. www.ncbi.nlm.nih.gov. www.ncbi.nlm.nih.gov.** [Online] 8. Juli 2018. [Zitat vom: 17. Juli 2018.] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/51284>.
- 173. (EMA), European Medicines Agency. European Medicines Agency (EMA).** *European Medicines Agency (EMA)*. [Online] 13. April 2018. [Zitat vom: 17. Juli 2018.] http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Summary_for_the_public/human/000179/WC500023123.pdf.

- 174. Baalousha M., Lead J.R.** Rationalizing nanomaterial sizes measured by atomic force microscopy, flow field-flow fractionation, and dynamic light scattering: sample preparation, polydispersity, and particle structure. *Environ Sci Technol*, 46(11). 2012, S. 6134-6142.
- 175. KGaA, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. Chemgaroo Chemgapedia.** *Chemgaroo Chemgapedia*. [Online] Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA . [Zitat vom: 17. Juli 2018.] http://www.chemgapedia.de/vsengine/vlu/vsc/de/ch/16/bbz/bbz_statwahr.vlu/Page/vsc/de/ch/16/bbz/bbz_statwahr_statmass.vscml.html.
- 176. Barry, B.** Mode of action of penetration enhancers in human skin. *Control Release*. 6. 1987, S. 85–97.
- 177. Jung, K.** New Methods for Testing Skin Protection against Noxae (SLS, Coolants) Using the Bovine Udder Skin (BUS). *IFSCC Magazine* 15/4. 2012, S. 265-270.
- 178. Kietzmann, M.** Perfused Bovine Udder as an in-vitro model of drug absorption. Skin viability and percutaneous absorption of dexamethasone, benzoyl peroxide and etofenamate. *Pharm. Toxicol. Meth.* 30. 1993, S. 75-84.
- 179. Pittermann, W.** Comparative study of the skin tolerability of hand disinfectants using the BUS-Model. *HygMed* 38 (4). 2013, S. 134-141.
- 180. Pitterman W., Holtmann W., Kietzmann M.** Systematic in-vitro studies of skin compatibility of cutting fluids. *Occupational and Environmental Dermatology* 51/2. 2003, S. D56-D66.
- 181. Pitterman W., Hopfgarten F., Kietzmann M.** The skin compatibility of distilled tall oils: evaluation with the bovine udder skin in vitro model system. *Altern Lab Anim.* 37/1. 2009, S. 69-76.
- 182. Schön M.P., Schön M., Klotz K.N.** The Small Antitumoral Immune Response Modifier Imiquimod Interacts with Adenosine Receptor Signaling in a TLR7- and TLR8-Independent Fashion. *Journal of Investigative Dermatology*, 126(6). 2006, S. 1338-1347.
- 183. Stilling.** www.tierversuche-verstehen.de. [Online] Cyrano Kommunikation GmbH, 2018. [Zitat vom: 18. November 2018.] <https://www.tierversuche-verstehen.de/tierarten-und-ihr-einsatz-in-der-forschung/>.
- 184. Holt, Astrid von.** *Stabilisierung von Probiotika durch Fetteinbettung*. 2004.
- 185. University, Division of Environmental Science and Ecological Engineering Korea.** <https://www.e-eh.org/>. [Online] [Zitat vom: 28. 02 2019.] https://www.e-eh.org/journal/Figure.php?xn=eht-29-e2014016.xml&id=f2-eh-29-e2014016&number=86&p_name=0223_86.
- 186. Thomas C.P., Heard C.M.** Probing the skin permeation of eicosapentaenoic acid and ketoprofen: 2. Comparative depth profiling and metabolism of eicosapentaenoic acid. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*; 67 (1). 2007, S. 156-165.
- 187. Huri M.F.D., Ng S.F., Zulfakar M.H.** Fish Oil-Based Oleogels: Physikochemicals Characterisation and In Vitro Release of Betamethasone Dipropionate. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*; 5 (3). 2013, S. 458-467.
- 188. Rehman K., Zulfakar M.H.** Novel Fish Oil-based Bigel System for Controlled Drug Delivery and its Influence on Immunomodulatory Activity of Imiquimod Against Skin Cancer. *Pharmaceutical Research*; 34 (1). 2017, S. 36-48.
- 189. Stein P., Gogoll K., Peters T., Denny M., Tenzer S., Stevanovic S., Schild H.J., Theobald M., Langguth P., Radsak M.P.** Transcutaneous Immunization with a Solid Nanoscopic Imiquimod Suspension Enhances Tumor Rejection. [Hrsg.] American Society of Hematology. *Blood* 126(23):2224-2224. 2015.
- 190. Rausch J., Lopez P.A., Bialojan A., Denny M., Langguth P., Probst H.C., Schild H., Radsak M.P.** Combined immunotherapy: CTLA-4 blockade potentiates anti-tumor response induced

by transcutaneous immunization. *Journal of Dermatological Science*; Vol. 87 (3). 2017, S. 300–306.

191. Lopez P.A., Denny M., Hartmann A.K., Alflen A., Probst H.C., von Stebut E., Tenzer S., Schild H., Stassen M., Langguth P., Radsak M.P. Transcutaneous immunization with a novel imiquimod nanoemulsion induces superior T cell responses and virus protection. *Journal of Dermatological Sciences*; Vol 87 (3). 2017, S. 252-259.

192. Bialojan A., Sohl J., Rausch J., Lopez P.A., Denny M., Langguth P., Hartmann A.K., Yagita H., Probst H.C., Schild H.J., Radsak M.P. Transcutaneous immunization with CD40 ligation boosts cytotoxic T lymphocyte mediated antitumor immunity independent of CD4 helper cells in mice. *European Journal of Immunology*; Vol 49 (11). 2019, S. 2083-2094.

8 Publikationen

Veröffentlichungen

Stein P., Gogoll K., Peters T., **Denny M.**, Tenzer S., Stevanovic S., Schild H.J., Theobald M., Langguth P., Radsak M.P. Transcutaneous Immunization with a Solid Nanoscopic Imiquimod Suspension Enhances Tumor Rejection. [Hrsg.] American Society of Hematology. *Blood*; 126(23).2015, S. 2224-2224.

Rausch J., Lopez P.A., Bialojan A., **Denny M.**, Langguth P., Probst H.C., Schild H., Radsak M.P. Combined immunotherapy: CTLA-4 blockade potentiates anti-tumor response induced by transcutaneous immunization. *Journal of Dermatological Science*; 87(3). 2017, S. 300–306.

Lopez P.A., **Denny M.**, Hartmann A.K., Aflen A, Probst H.C., von Stebut E., Tenzer S., Schild H., Stassen M., Langguth P., Radsak M.P. Transcutaneous immunization with a novel imiquimod nanoemulsion induces superior T cell responses and virus protection. *Dermatological Science*. 2017; 87(3), S. 252–259.

Bialojan A., Sohl J., Rausch J., Lopez P.A., **Denny M.**, Langguth P., Hartmann A.K., Yagita H., Probst H.C., Schild H.J., Radsak M.P. Transcutaneous immunization with CD40 ligation boosts cytotoxic T lymphocyte mediated antitumor immunity independent of CD4 helper cells in mice. *European Journal of Immunology*; Vol 49 (11). 2019, S. 2083-2094.

Vorträge mit Poster-Präsentation

M. Denny, P. Aranda Lopez, M. Radsak, H. Schild, P. Langguth, "Nanoparticle dispersed formulation IMI-GEL vs. Aldara® in human - a comparative Phase-I Study", 1. FZI-Retreat 2015 in Seeheim-Jugenheim, Deutschland

M. Denny, P. Aranda Lopez, P. Staubach-Renz, B. Lang, H. Schild, M. Radsak, P. Langguth, "Open-label, randomized pilot study on tolerability and safety of a novel Imiquimod formulation for the treatment of patients with actinic keratosis", 2.FZI-Retreat 2016 in Bad Dürkheim, Deutschland

M. Denny, P. Aranda Lopez, A.K. Hartmann, A. Aflen, H.C. Probst, E. v.Stebut, S. Tenzer, S. Stevanovic, M. Stassen, H. Schild, M. Theobald, M.P. Radsak, P. Langguth, „Development of novel Imiquimod based freeze dried Nanoemulsion ImiSOL for transcutaneous immunization“, DPhG Annual Meeting 2017 in Saarbrücken, Deutschland

9 Lebenslauf, Stand 02.2020

10 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich entsprechend § 10 Absatz 3 (d) der gültigen Promotionsordnung der Johannes Gutenberg-Universität vom 22.08.2012, dass

- a) Ich die jetzt als Dissertation vorgelegte Arbeit selbst angefertigt und alle benutzten Hilfsmittel (Literatur, Apparaturen, Material) in der Arbeit angegeben habe.
- b) Ich die jetzt als Dissertation vorgelegte Arbeit nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe oder hatte.
- c) Ich weder die jetzt als Dissertation vorgelegte Arbeit, noch Teile davon bei einer anderen Fakultät bzw. einem anderen Fachbereich als Dissertation eingereicht habe oder hatte.

11 Danksagung

12 Anhang

12.1 Datenserie Imiquimod

Tabelle 38 Rohdatensammlung der neun Validierungsläufe des Wirkstoffs Imiquimod.

Diese Daten liegen den Berechnungen der Genauigkeit, Präzision, Richtigkeit, etc. bezogen auf Imiquimod zugrunde. Die Reinigungsvalidierung basiert nicht auf diesen Ergebnissen.

1. Lauf				
Konz. [ng/ ml]	Run A Area [$\mu\text{V} \cdot \text{s}$]	Run B Area [$\mu\text{V} \cdot \text{s}$]	Run C Area [$\mu\text{V} \cdot \text{s}$]	Mittelwert Area [$\mu\text{V} \cdot \text{s}$]
35,12	2154	2452	2257	2287,67
68,88	4476	4747	4384	4535,67
85,29	4955	5677	5490	5374,00
162,82	9131	10163	9310	9534,67
298,5	17017	16623	17575	17071,67
597	34613	35105	36309	35342,33
895,5	51302	50064	51364	50910,00
1791	111584	112534	116035	113384,33

2. Lauf				
Konz. [ng/ ml]	Run A Area [$\mu\text{V} \cdot \text{s}$]	Run B Area [$\mu\text{V} \cdot \text{s}$]	Run C Area [$\mu\text{V} \cdot \text{s}$]	Mittelwert Area [$\mu\text{V} \cdot \text{s}$]
35,12	2458	2106	2303	2289,00
68,88	4493	4570	4524	4529,00
85,29	5357	5776	5049	5394,00
162,82	9842	10626	10484	10317,33
298,5	17703	18868	19186	18585,67
597	34341	35598	36447	35462,00
895,5	52732	55723	55851	54768,67
1791	109423	113431	125559	116137,67

3. Lauf				
Konz. [ng/ ml]	Run A Area [$\mu\text{V} \cdot \text{s}$]	Run B Area [$\mu\text{V} \cdot \text{s}$]	Run C Area [$\mu\text{V} \cdot \text{s}$]	Mittelwert Area [$\mu\text{V} \cdot \text{s}$]
35,12	2587	2439	2570	2532,00
68,88	4539	4737	4323	4533,00
85,29	5299	5286	5854	5479,67
162,82	10165	9410	10067	9880,67
298,5	18221	19208	19386	18938,33
597	34870	36174	36956	36000,00
895,5	53537	54964	54890	54463,67
1791	109957	117001	118069	115009,00

Tabelle 39 Datenübersicht der chemischen Stabilität für Imiquimod

Die Zeitpunkte „Direkt nach Herstellung“ bis „halbes Jahr“ sind den ICH-Regularien entnommen. Zu jeder Messung wurde sowohl der Gehalt des Standards, als auch des Prüfmusters dreifach bestimmt, wobei die Standardlösung frisch hergestellt wurde. Die Berechnungen erfolgten mithilfe Gl. 12. Zum Zeitpunkt T0 wurde das mikrobiologische Prüfmuster mit untersucht. Nach sechs Monaten wurde der Standard abweichend zu den bisherigen Messungen sechsfach vermessen. Die zum Zeitpunkt T1 und T6 erhaltenen Daten weisen einen um 50 % erniedrigten Flächen- und Gehaltswert auf im Vergleich zu den anderen Messungen. Diese Abweichung konnte nicht aufgeklärt werden, zeigt aber keinen Einfluss auf das Endergebnis, da es sich hier um ein Verhältnis der Werte zueinander handelt.

Probe	Einwaage ImiGEL [mg]	Area [$\mu\text{V} \cdot \text{s}$]	Berechnete Konz. [ng/ml]	MW Area [$\mu\text{V} \cdot \text{s}$]	MW Konz. [ng/ml]	Akzeptanzkriterium 90 - 110 % [%]
Standard Imiquimod	N/A	113443	1797,80	118899,67	1883,76	N/A
		130891	2072,65			
		112365	1780,82			
Tube T0 "Stabi"	234,73	83157	1320,73	93984,667	1491,29	99,85
		105961	1679,94			
		92836	1473,20			
Tube T0 "Mikro"	269,32	57997	924,40	66834	1063,61	99,55
		77107	1225,43			
		65398	1040,98			

Probe	Einwaage ImiGEL [mg]	Area [$\mu\text{V} \cdot \text{s}$]	Berechnete Konz. [ng/ml]	MW Area [$\mu\text{V} \cdot \text{s}$]	MW Konz. [ng/ml]	Akzeptanzkriterium 90 - 110 % [%]
Standard Imiquimod	N/A	212014	3350,52	213357,67	3371,68	N/A
		213374	3371,94			
		214685	3392,59			
Tube T1 "Stabi"	220,46	271032	4280,18	275856,33	4356,18	100,07
		279805	4418,38			
		276732	4369,97			

Probe	Einwaage ImiGEL [mg]	Area [$\mu\text{V} \cdot \text{s}$]	Berechnete Konz. [ng/ml]	MW Area [$\mu\text{V} \cdot \text{s}$]	MW Konz. [ng/ml]	Akzeptanzkriterium 90 - 110 % [%]
Standard Imiquimod	N/A	215807	3410,26	217318,67	3434,08	N/A
		216306	3418,13			
		219843	3473,84			
Tube T2 "Stabi"	241,73	249949	3948,08	242513,33	3830,95	100,03
		239490	3783,33			
		238101	3761,45			

Fortsetzung der Tabelle 39

Probe	Einwaage ImiGEL [mg]	Area [$\mu\text{V} \cdot \text{s}$]	Berechnete Konz. [ng/ ml]	MW Area [$\mu\text{V} \cdot \text{s}$]	MW Konz. [ng/ ml]	Akzeptanzkriterium 90 - 110 % [%]
Standard Imiquimod	N/A	216658	3423,67	219188,00	3463,52	N/A
		218514	3452,91			
		222392	3513,99			
Tube T3 "Stabi"	223,58	262572	4146,92	262221,33	4141,39	100,05
		243341	3843,99			
		280751	4433,28			

Probe	Einwaage ImiGEL [mg]	Area [$\mu\text{V} \cdot \text{s}$]	Berechnete Konz. [ng/ ml]	MW Area [$\mu\text{V} \cdot \text{s}$]	MW Konz. [ng/ ml]	Akzeptanzkriterium 90 - 110 % [%]
Standard Imiquimod	N/A	220732	3487,84	226641,33	3580,93	N/A
		229156	3620,54			
		230036	3634,40			
Tube T4 "Stabi"	222,56	241164	3809,69	247827,33	3914,66	100,03
		250257	3952,93			
		252061	3981,35			

Probe	Einwaage ImiGEL [mg]	Area [$\mu\text{V} \cdot \text{s}$]	Berechnete Konz. [ng/ ml]	MW Area [$\mu\text{V} \cdot \text{s}$]	MW Konz. [ng/ ml]	Akzeptanzkriterium 90 - 110 % [%]
Standard Imiquimod	N/A	117482	1861,42	119851,17	1898,74	N/A
		117597	1863,24			
		125655	1990,17			
		119643	1895,47			
		118995	1885,26			
		119735	1896,91			
Tube T6 "Stabi"	259,42	133429	2112,63	140151,67	2218,52	100,08
		143336	2268,68			
		143690	2274,26			

Tabelle 40 Grunddatensatz des Reinigungserfolgs unabhängig der Startbelastung

Nach Transformation der einzelnen Reinigungsläufe durch eine gemittelte Funktion, wurden folgende Konzentrationen erhalten und erneut im Diagramm 32 dargestellt.

Waschgang	1	2	3	4
	Konzentration Imiquimod [ng/ ml]			
B 1-4 neu	5304,50	2018,41	1146,93	768,02
C 1-4 neu	7774,80	2958,38	1681,06	1125,69
D 1-4 neu	5638,70	2145,57	1219,19	816,41
E 1-4 neu	6528,00	2483,96	1411,47	945,17
Gemittelt neu	6311,50	2401,58	1364,66	913,82

Tabelle 41 Darstellung des aus den Kryogenschnitten gefundenen Imiquimods

Aufgrund seiner Physiologie können die rechte und die linke Hälfte des Euters gegeneinander verglichen werden. In dem hier gewählten Setup wurden nach 2,5 Stunden und nach 5 Stunden je Seite 11 Schnitte angefertigt. Zusätzlich wurden Kontrollflächen je Zeitpunkt analysiert. Jeder Schnitt stellt eine Einzelanalyse dar, die direkt in eine Wirkstoffkonzentration transferiert wurde.

Feld	Zeit [h]	Kryo-schnitt	Fläche [$\mu\text{V} \cdot \text{s}$]	Konz. [ng/ml]	Feld	Zeit [h]	Kryo-schnitt	Fläche [$\mu\text{V} \cdot \text{s}$]	Konz. [ng/ml]	Feld	Zeit [h]	Kryo-schnitt	Fläche [$\mu\text{V} \cdot \text{s}$]	Konz. [ng/ml]
1	2,5	1	12072	12,56	3	2,5	1	22882	23,20	5	2,5	1	0	0,00
		2	2002	2,65			2	4600	5,20			2	0	0,00
		3	2258	2,90			3	0	0,00			3	0	0,00
		4	1436	2,09			4	0	0,00			4	0	0,00
		5	1555	2,21			5	0	0,00			5	0	0,00
		6	2189	2,83			6	0	0,00			6	0	0,00
		7	1585	2,24			7	0	0,00			7	0	0,00
		8	1579	2,23			8	0	0,00			8	0	0,00
		9	1753	2,40			9	0	0,00			9	0	0,00
		10	0	0,00			10	0	0,00			10	0	0,00
		11	0	0,00			11	0	0,00			11	0	0,00
2	5	1	18934	19,32	6	5	1	61571	61,29	6	5	1	0	0,00
		2	0	0,00			2	3865	4,48			2	0	0,00
		3	0	0,00			3	3002	3,63			3	0	0,00
		4	0	0,00			4	2454	3,09			4	0	0,00
		5	0	0,00			5	1895	2,54			5	0	0,00
		6	0	0,00			6	0	0,00			6	0	0,00
		7	0	0,00			7	1822	2,47			7	0	0,00
		8	0	0,00			8	0	0,00			8	0	0,00
		9	0	0,00			9	0	0,00			9	0	0,00
		10	0	0,00			10	0	0,00			10	0	0,00
		11	0	0,00			11	0	0,00			11	0	0,00

Tabelle 42 HPLC-Gehaltsbestimmung der Tesa-Strips am Euter aus ImiSOL

Vermessen wurden 60 Tesa®-Strips, aufgeteilt nach Entnahmestelle und -zeitpunkt. Die dreifache Analyse mündet in einem Flächen-Mittelwert sowie einer korrespondierenden Standardabweichung, die jeweils in eine Wirkstoff-Konzentration überführt wurden. Für die Kontrollen wurden je nur eine Einzelmessung durchgeführt.

Feld	Zeit [h]	Tesaabbriss	Fläche 1 [$\mu\text{V} \cdot \text{s}$]	Fläche 2 [$\mu\text{V} \cdot \text{s}$]	Fläche 3 [$\mu\text{V} \cdot \text{s}$]	MW Fläche [$\mu\text{V} \cdot \text{s}$]	STAW Fläche [$\mu\text{V} \cdot \text{s}$]	Konz. (MW) [ng/ml]	Konz. (STAW) [ng/ml]	CV
1	2,5	1	490057	506234	494426	496905,67	8368,72	489,89	8,92	1,82
		2	181478	187771	184066	184438,33	3162,98	182,26	3,79	2,08
		3	76535	77329	76055	76639,67	643,42	76,13	1,31	1,72
		4	52839	46467	48642	49316,00	3239,03	49,23	3,87	7,85
		5	47010	38623	41123	42252,00	4305,98	42,27	4,92	11,63
		6	29857	33680	33232	32256,33	2089,92	32,43	2,73	8,43
		7	21100	21070	24569	22246,33	2011,54	22,58	2,66	11,77
		8	21279	19410	21739	20809,33	1233,49	21,16	1,89	8,93
		9	15368	13578	15777	14907,67	1169,54	15,35	1,83	11,90
		10	15125	17421	16911	16485,67	1205,65	16,91	1,86	11,02
3	2,5	1	490944	527979	491727	503550,00	21159,76	496,43	21,51	4,33
		2	142182	145234	146400	144605,33	2178,14	143,04	2,82	1,97
		3	69066	66902	68410	68126,00	1109,60	67,75	1,77	2,61
		4	45702	47172	45605	46159,67	878,05	46,12	1,54	3,34
		5	23121	25449	25670	24746,67	1412,20	25,04	2,07	8,25
		6	15700	13645	13713	14352,67	1167,32	14,81	1,83	12,33
		7	12826	12952	11929	12569,00	557,83	13,05	1,23	9,39
		8	15106	15205	15039	15116,67	83,51	15,56	0,76	4,87
		9	14140	14620	15739	14833,00	820,50	15,28	1,48	9,71
		10	7759	7081	8106	7648,67	521,33	8,21	1,19	14,49
5 Control	2,5	1	0							
		2	0							
		3	0							
		4	0							
		5	0							
		6	0							
		7	0							
		8	0							
		9	0							
		10	0							

Fortsetzung Tabelle 42 (2/2).

Feld	Zeit [h]	Tesaabriss	Fläche 1 [$\mu\text{V} \cdot \text{s}$]	Fläche 2 [$\mu\text{V} \cdot \text{s}$]	Fläche 3 [$\mu\text{V} \cdot \text{s}$]	MW Fläche [$\mu\text{V} \cdot \text{s}$]	STAW Fläche [$\mu\text{V} \cdot \text{s}$]	Konz. (MW) [ng/ml]	Konz. (STAW) [ng/ml]	CV
2	5	1	176865	179012	180176	178684,33	1679,64	176,59	2,33	1,32
		2	72016	72274	72194	72161,33	132,07	71,72	0,81	1,12
		3	33557	33347	31216	32706,67	1295,22	32,88	1,95	5,94
		4	19438	18749	17986	18724,33	726,31	19,11	1,39	7,28
		5	12273	11732	11657	11887,33	336,10	12,38	1,01	8,14
		6	9642	9887	9577	9702,00	163,48	10,23	0,84	8,18
		7	8126	7654	7635	7805,00	278,16	8,36	0,95	11,36
		8	4932	4433	4319	4561,33	326,03	5,17	1,00	19,30
		9	6157	5371	6580	6036,00	613,52	6,62	1,28	19,34
		10	4127	4342	4356	4275,00	128,36	4,89	0,80	16,43
4	5	1	154968	154641	155127	154912,00	247,79	153,19	0,92	0,60
		2	64194	64307	64197	64232,67	64,39	63,91	0,74	1,16
		3	34540	32946	34564	34016,67	927,30	34,17	1,59	4,65
		4	23873	24158	24996	24342,33	583,75	24,64	1,25	5,08
		5	13575	14784	14256	14205,00	606,11	14,66	1,27	8,68
		6	11064	10525	10326	10638,33	381,83	11,15	1,05	9,44
		7	9533	9700	10381	9871,33	449,21	10,39	1,12	10,76
		8	105001	106117	105362	105493,33	569,47	104,54	1,24	1,18
		9	6121	6242	6998	6453,67	475,27	7,03	1,14	16,27
		10	5359	5851	5135	5448,33	366,26	6,04	1,04	17,17
6 (Kontrolle)	5	1	3158					3,79		
		2	2451					3,09		
		3	2752					3,39		
		4	3388					4,01		
		5	3773					4,39		
		6	3479					4,10		
		7	3546					4,17		
		8	3141					3,77		
		9	1579					2,23		
		10	1388					2,04		

12.2 Datenserie IRC

Tabelle 43 Kurzvalidierung der Verunreinigungs-Mischung
Die Analyse wurde durchgeführt um Interaktionen ausschließen zu können. Die IRCs liegen jeweils in der Konzentration von 2000 ng/ml vor.

IRC	A		B		C		D		E	
	Retentionszeit [min]	Area [$\mu\text{V} \cdot \text{s}$]	Retentionszeit [min]	Area [$\mu\text{V} \cdot \text{s}$]	Retentionszeit [min]	Area [$\mu\text{V} \cdot \text{s}$]	Retentionszeit [min]	Area [$\mu\text{V} \cdot \text{s}$]	Retentionszeit [min]	Area [$\mu\text{V} \cdot \text{s}$]
Lauf 1	13,08	17711	6,217	34309	20,8	13888	40,392	56305	52,6	22646
Lauf 2	13,11	16319	6,233	32111	20,825	14157	40,4	50981	52,617	20162
Lauf 3	13,14	16402	6,242	31252	20,858	13676	40,45	50140	52,667	20594
MW	13,11	16810,67	6,23	32557,33	20,83	13907	40,41	52475,33	52,63	21134
StAW	0,03	780,82	0,01	1576,62	0,03	241,06	0,03	3343,14	0,03	1327,13
CV	0,23	4,64	0,20	4,84	0,14	1,73	0,08	6,37	0,07	6,28

Tabelle 44 Validierung der Einzelstoffe IRC A, B, C, D und E auf Basis der HPLC-Flächen

Die Berechnungen fußen auf einer Sechsfachbestimmung. Die mit * markierten Untersuchungen führten nach HPLC-Analyse zu keinem Peak. Diese Abweichung konnte nicht aufgeklärt werden. Die aus dieser Konzentration resultierenden Berechnungen des Mittelwerts und Standardabweichung wurden mit den vorhandenen fünf vorherigen Daten durchgeführt.

IRC	Konz. [µg/ mL]	Ret 1 [min]	Fläche 1 [µV*s]	Ret 2 [min]	Fläche 2 [µV*s]	Ret 3 [min]	Fläche 3 [µV*s]	Ret 4 [min]	Fläche 4 [µV*s]	Ret 5 [min]	Fläche 5 [µV*s]	Ret 6 [min]	Fläche 6 [µV*s]	MW [µV*s]	STABW [µV*s]	CV [%]
A	6	19,28	50552	19,30	50458	19,53	50171	19,53	49982	19,54	48899	19,54	49849	49985,17	596,27	1,19
	4	19,55	35328	19,56	34418	19,16	34704	20,18	34924	20,18	34437	20,19	34525	34722,67	352,37	1,01
	2	20,14	17771	20,11	18258	20,11	17508	20,10	17298	20,70	19604	20,06	18471	18151,67	837,92	4,62
	1	19,78	9028	19,73	8920	19,69	7806	19,72	8657	19,68	8229	19,68	8965	8600,83	487,88	5,67
	0,8	19,71	7623	19,75	7120	19,68	7422	19,74	7631	19,72	7269	19,68	7590	7442,50	211,85	2,85
	0,4	19,71	4358	19,64	3912	19,70	3974	20,39	4472	19,46	3812	19,69	5376	4317,33	580,32	13,44
B	6	5,93	82123	5,93	84961	5,93	87596	5,93	87811	5,93	89995	5,92	88102	86764,67	2785,95	3,21
	4	5,93	60986	5,93	61348	5,92	59736	5,93	59244	6,05	59974	5,93	59235	60087,17	891,16	1,48
	2	5,93	29847	5,93	28877	5,93	29741	5,93	29894	5,92	29826	5,92	30793	29829,67	607,93	2,04
	1	5,87	15715	5,85	15994	5,86	15993	5,84	15358	6,36	16761	5,86	16177	15999,67	469,88	2,94
	0,8	5,93	12461	5,93	12796	5,93	12286	5,92	12831	6,12	12194	5,93	12277	12474,17	277,08	2,22
	0,4	5,92	6168	5,92	6643	5,92	6179	5,75	6508	5,96	6588	5,93	6474	6426,67	204,91	3,19
C	6	31,68	41841	31,38	43395	31,38	43701	31,38	41039	31,38	42803	31,35	40974	42292,17	1180,98	2,79
	4	31,14	26641	31,13	28044	31,13	27886	31,14	27276	28,12	32491	31,25	27016	28225,67	2154,89	7,63
	2	31,28	12734	31,26	13690	31,26	13812	31,28	13383	31,32	13063	31,28	14237	13486,50	541,65	4,02
	1	31,31	6718	31,32	6051	31,27	6869	31,31	6957	31,35	7162	31,31	6270	6671,17	426,50	6,39
	0,8	31,33	5586	31,47	4546	31,34	5724	31,35	5843	30,36	4872	*	*	5314,20	571,65	10,76
	0,4	30,74	2329	30,80	2118	30,96	2486	31,08	2507	30,71	1775	30,84	1945	2193,33	298,26	13,60
D	6	39,86	184624	39,85	193695	39,87	168424	39,57	169055	39,54	169483	39,56	167876	175526,17	10956,63	6,24
	4	39,88	114539	39,89	115681	39,90	115308	39,55	116231	39,59	114859	39,57	116305	115487,17	719,09	0,62
	2	39,94	61237	39,93	61689	40,06	61532	39,57	60274	39,60	59582	39,57	61439	60958,83	840,75	1,38
	1	39,73	29263	39,76	28517	39,77	29974	39,63	26160	39,84	29239	39,78	29442	28765,83	1359,43	4,73
	0,8	39,77	24125	39,78	25673	40,16	26750	40,49	26946	40,46	26468	40,50	23702	25610,67	1390,71	5,43
	0,4	39,89	10889	39,89	12131	39,93	12985	40,59	12109	40,59	12969	40,51	12470	12258,83	773,50	6,31
E	6	49,47	60310	49,98	61531	49,73	60629	49,60	60326	49,50	61326	49,57	58825	60491,17	962,64	1,59
	4	49,38	40617	49,01	41551	48,98	41050	48,94	41386	49,03	39294	49,05	40062	40660,00	860,05	2,12
	2	49,10	20448	*	*	49,13	20770	49,15	22200	49,21	21349	49,18	21745	21302,40	710,14	3,33
	1	49,28	9374	49,34	10148	49,36	9671	49,59	10609	50,53	11740	50,37	10930	10412,00	867,98	8,34
	0,8	50,42	8367	50,39	8764	50,28	8624	51,04	8289	51,42	8390	51,43	8071	8417,50	246,00	2,92
	0,4	51,50	3837	51,50	4137	51,63	4539	51,58	4354	51,56	4025	51,57	4293	4197,50	250,44	5,97

12.3 Datenserie Konservierungsmittel

12.3.3 Paraben Mix

Tabelle 45 Validierung der Konservierungsmittel in der Mischung.

Konz. Methylparaben [µg/ml]	Retentionszeit 1 [min]	Area 1 [µV * s]	Retentionszeit 2 [min]	Area 2 [µV * s]	Retentionszeit 3 [min]	Area 3 [µV * s]
34,93	3,03	7733556	3,00	7621841	2,98	7755977
17,47	3,01	3922084	3,00	3885886	2,99	3979417
8,73	3,00	2019313	3,00	1922792	2,99	1974850
4,37	3,01	993272	2,99	972063	2,99	1049350
2,18	3,06	502599	3,00	558169	3,00	562016

Konz. Propylparaben [µg/ml]	Retentionszeit 1 [min]	Area 1 [µV * s]	Retentionszeit 2 [min]	Area 2 [µV * s]	Retentionszeit 3 [min]	Area 3 [µV * s]
31,40	5,45	6203554	5,41	6076136	5,38	6223780
15,70	5,48	3547229	5,41	3010502	5,38	3091820
7,85	5,43	1562831	5,41	1475333	5,42	1639754
3,93	5,43	759001	5,41	752776	5,39	812282
1,96	5,51	394689	5,41	424446	5,39	432967

12.3.4 Konservierungsmittel aus der Tube 0,1%

Tabelle 46 Analyse der beiden Parabene aus ImiGEL

Die Gesamtkonzentration an Konservierungsmittel beträgt 0,1 % der Formulierung, wobei 2/3 auf Methyl- und 1/3 auf Propylparaben entfällt. Die Mittelwerte werden in Tabelle 23 dargestellt.

Tube 0,1 % Parabene	Retentionszeit [min]	Peak Fläche [µV*s]	Konz. Berechnet (Ist) [g/ ml]	Einwaage ImiGEL (g)	Konz. (Soll) [g/ ml]	Diff. [%]
Messung 1 – Methylp. (0,075%)	2,983	2090278	9,245E-06	1,19733	8,980E-06	2,87
Messung 1 – Propylp. (0,025%)	5,392	583032	2,782E-06		2,993E-06	-7,58
Messung 2 – Methylp. (0,075%)	2,983	2145387	9,497E-06	1,08243	8,118E-06	14,52
Messung 2 – Propylp. (0,025%)	5,383	590403	2,820E-06		2,706E-06	4,04

12.4 Berichte Prüflabor

Prüfberichte der mikrobiologischen Stabilitätsuntersuchung zwei Wochen nach Anbruch an drei Chargen ImiGEL.

1/3

Dreimlestraße 5b D-76185 Karlsruhe Tel. +49 721/9737-0 Fax +49 721/9737-222 blochem@biochem.de www.biochem.de		Geschäftsführer: Dr. Jürgen Brönke Amtsgericht Mannheim HRB 103147 USt-Id.Nr.: DE143892071		 BioChem Labor für biologische und chemische Analytik GmbH	
Johannes Gutenberg-Universität Mainz Herr Mark Denny Staudinger Weg 5 55099 Mainz				Ria Kurstak Durchwahl -114	
Prüfbericht					
Probe		: Imigel 021117, Charge A			
Ch.-B.		: siehe Tabelle		Eingangs-Nr. : 652074	
Auftraggeber		: Johannes-Gutenberg Uni Mainz		Eingangs-Datum : 21.11.2017	
Durchführung		: siehe Tabelle		Ausgangs-Datum : 12.12.2017	
Probenbezeichnung / Durchführung	Prüfparameter	Akzeptanzkriterien für Präparate zur kutanen Anwendung	Ergebnisse		
Pat. Nr. A1 (Blindwert) 07.12.2017 – 12.12.2017	TAMC*	$\leq 10^2$ KBE/g	< 10^1 KBE/g		
	TYMC**	$\leq 10^1$ KBE/g	< 10^1 KBE/g		
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	in 1 g nicht nachweisbar	in 1 g nicht nachweisbar		
	<i>Staphylococcus aureus</i>	in 1 g nicht nachweisbar	in 1 g nicht nachweisbar		
Pat. Nr. A2 (1 Woche) 07.12.2017 – 12.12.2017	TAMC*	$\leq 10^2$ KBE/g	< 10^1 KBE/g		
	TYMC**	$\leq 10^1$ KBE/g	< 10^1 KBE/g		
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	in 1 g nicht nachweisbar	in 1 g nicht nachweisbar		
	<i>Staphylococcus aureus</i>	in 1 g nicht nachweisbar	in 1 g nicht nachweisbar		
Pat. Nr. A3 (2 Wochen) 22.11.2017 – 27.11.2017	TAMC*	$\leq 10^2$ KBE/g	< 10^1 KBE/g		
	TYMC**	$\leq 10^1$ KBE/g	< 10^1 KBE/g		
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	in 1 g nicht nachweisbar	in 1 g nicht nachweisbar		
	<i>Staphylococcus aureus</i>	in 1 g nicht nachweisbar	in 1 g nicht nachweisbar		
* Total Aerobic Microbial Count (aerob wachsende, mesophile Mikroorganismen) ** Total Combined Yeast/Moulds Count (Hefen/Pilze)					
<u>Sonstige Keime pro g:</u> nicht nachweisbar					
<u>Bewertung:</u> Die untersuchten Prüfmuster entsprechen hinsichtlich der untersuchten Prüfparameter den Spezifikationen.					
Durchführung gemäß validiertem Prüfverfahren der Ph. Eur., aktuelle Ausgabe, 2.6.12 (Plattenguss-Methode) und 2.6.13					
BioChem GmbH  Ria Kurstak Geprüft: Mitarbeiter Mikrobiologie		 Dr. Wolfgang Leis genehmigt: Bereichsleitung Mikrobiologie			
U:\Berichte\Keimzahl\Johannes-Gutenberg Uni Mainz\IR_MB_K652074.01.doc					

Dankersstraße 5b
D-78186 Korbbruha
Tel. +49 721/9737-0
Fax +49 721/9737-222
biochem@biochem.de
www.biochem.de

Geschäftsführer:
Dr. Jürgen Brinke
Amtsgericht Mannheim
HRB 103147
LStJd-Nr. DF143592071



BioChem
Labor für biologische und
chemische Analytik GmbH

Johannes Gutenberg-Universität Mainz
Herr Mark Denny
Staudinger Weg 5
55099 Mainz

Ria Kurstak
Durchwahl -114

Prüfbericht

Probe : Imigel 031117, Charge B
Ch.-B. : siehe Tabelle
Auftraggeber : Johannes-Gutenberg Uni Mainz
Durchführung : siehe Tabelle
Eingangs-Nr. : 652075
Eingangs-Datum : 21.11.2017
Ausgangs-Datum : 12.12.2017

Probenbezeichnung / Durchführung	Prüfparameter	Akzeptanzkriterien für Präparate zur kutanen Anwendung	Ergebnisse
Pat. Nr. B1 (Blindwert) 07.12.2017 – 12.12.2017	TAMC*	$\leq 10^2$ KBE/g	< 10^1 KBE/g
	TYMC**	$\leq 10^1$ KBE/g	< 10^1 KBE/g
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	in 1 g nicht nachweisbar in 1 g nicht nachweisbar	in 1 g nicht nachweisbar in 1 g nicht nachweisbar
Pat. Nr. B2 (1 Woche) 07.12.2017 – 12.12.2017	TAMC*	$\leq 10^2$ KBE/g	< 10^1 KBE/g
	TYMC**	$\leq 10^1$ KBE/g	< 10^1 KBE/g
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	in 1 g nicht nachweisbar in 1 g nicht nachweisbar	in 1 g nicht nachweisbar in 1 g nicht nachweisbar
Pat. Nr. B3 (2 Wochen) 22.11.2017 – 27.11.2017	TAMC*	$\leq 10^2$ KBE/g	< 10^1 KBE/g
	TYMC**	$\leq 10^1$ KBE/g	< 10^1 KBE/g
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	in 1 g nicht nachweisbar in 1 g nicht nachweisbar	in 1 g nicht nachweisbar in 1 g nicht nachweisbar

* Total Aerobic Microbial Count (aerob wachsende, mesophile Mikroorganismen)
** Total Combined Yeast/Moulds Count (Hefen/Pilze)

Sonstige Keime pro g: nicht nachweisbar

Bewertung: Die untersuchten Prüfmuster entsprechen hinsichtlich der untersuchten Prüfparameter den Spezifikationen.

Durchführung gemäß validiertem Prüfverfahren der Ph. Eur., aktuelle Ausgabe, 2.6.12 (Plattenguss-Methode) und 2.6.13

BioChem GmbH

Ria Kurstak
Geprüft: Mitarbeiter Mikrobiologie

Dr. Wolfgang Leis
genehmigt: Bereichsleitung Mikrobiologie

U:\Berichte\Keimzahl\Johannes-Gutenberg Uni Mainz\R_MB_K652075.01.doc

Dormlinstraße 6b
D-76185 Karlsruhe
Tel. +49 721/9737-0
Fax +49 721/9737-222
biochem@biochem.de
www.biochem.de

Geschäftsführer:
Dr. Jürgen Bronke
Antisengasse Mannheim
HRB 103147
USt-Id-Nr.: DE143392071



BioChem
Labor für biologische und
chemische Analytik GmbH

Johannes Gutenberg-Universität Mainz
Herr Mark Denny
Staudinger Weg 5
55099 Mainz

Ria Kurstak
Durchwahl -114

Prüfbericht

Probe : Imigel 041117, Charge C
Ch.-B. : siehe Tabelle
Auftraggeber : Johannes-Gutenberg Uni Mainz
Durchführung : siehe Tabelle
Eingangs-Nr. : 652076
Eingangs-Datum : 21.11.2017
Ausgangs-Datum : 12.12.2017

Probenbezeichnung / Durchführung	Prüfparameter	Akzeptanzkriterien für Präparate zur kutanen Anwendung	Ergebnisse
Pat. Nr. C1 (Blindwert) 07.12.2017 – 12.12.2017	TAMC*	$\leq 10^2$ KBE/g	$< 10^1$ KBE/g
	TYMC**	$\leq 10^1$ KBE/g	$< 10^1$ KBE/g
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	in 1 g nicht nachweisbar in 1 g nicht nachweisbar	in 1 g nicht nachweisbar in 1 g nicht nachweisbar
Pat. Nr. C2 (1 Woche) 22.11.2017 – 27.11.2017	TAMC*	$\leq 10^2$ KBE/g	$< 10^1$ KBE/g
	TYMC**	$\leq 10^1$ KBE/g	$< 10^1$ KBE/g
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	in 1 g nicht nachweisbar in 1 g nicht nachweisbar	in 1 g nicht nachweisbar in 1 g nicht nachweisbar
Pat. Nr. C3 (2 Wochen) 07.12.2017 – 12.12.2017	TAMC*	$\leq 10^2$ KBE/g	$< 10^1$ KBE/g
	TYMC**	$\leq 10^1$ KBE/g	$< 10^1$ KBE/g
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	in 1 g nicht nachweisbar in 1 g nicht nachweisbar	in 1 g nicht nachweisbar in 1 g nicht nachweisbar

* Total Aerobic Microbial Count (aerob wachsende, mesophile Mikroorganismen)

** Total Combined Yeast/Moulds Count (Hefen/Pilze)

Sonstige Keime pro q: nicht nachweisbar

Bewertung: Die untersuchten Prüfmuster entsprechen hinsichtlich der untersuchten Prüfparameter den Spezifikationen.

Durchführung gemäß validiertem Prüfverfahren der Ph. Eur., aktuelle Ausgabe, 2.6.12 (Plattenguss-Methode) und 2.6.13

BioChem GmbH




Ria Kurstak
Geprüft: Mitarbeiter Mikrobiologie

Dr. Wolfgang Leis
genehmigt: Bereichsleitung Mikrobiologie

U:\Berichte\Keimzahl\Johannes-Gutenberg Uni Mainz\IR_MB_K652076.01.doc

Prüfberichte der mikrobiologischen Stabilitätsuntersuchung vier Wochen nach Anbruch an einer Charge ImiGEL.

1/2

Deimiersstraße 5b D-76185 Karlsruhe Tel. +49 721/9737-0 Fax +49 721/9737-222 biochem@biochem.de www.biochem.de		Geschäftsführer: Dr. Jürgen Bronke Amtsgericht Mannheim HRB 103147 USt-Id-Nr.: DE143692071		 BioChem Labor für biologische und chemische Analytik GmbH																																		
Johannes Gutenberg Universität Mainz Pharmazie Herr Mark Denny Staudinger Weg 5 55128 Mainz		Probe: Imigel-Anbruchstabi Charge: IMIGEL200417 Auftraggeber: Johannes Gutenberg Universität Eingang-Nr.: 630511 Eingangs-Datum: 07.06.2017 Ausgangs-Datum: 18.07.2017																																				
Prüfung auf ausreichende Konservierung nach Ph. Eur., aktuelle Version																																						
Akzeptanzkriterien für Topika:		<table border="1"> <thead> <tr> <th rowspan="2">Kriterium</th> <th colspan="4">Log Reduktion</th> </tr> <tr> <th>2 d</th> <th>7 d</th> <th>14 d</th> <th>28 d</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td rowspan="2">Bakterien</td> <td>A</td> <td>2</td> <td>3</td> <td>-</td> <td>k. Z.</td> </tr> <tr> <td>B</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>3</td> <td>k. Z.</td> </tr> <tr> <td rowspan="2">Hefen</td> <td>A</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>2</td> <td>k. Z.</td> </tr> <tr> <td>B</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>1</td> <td>k. Z.</td> </tr> </tbody> </table>				Kriterium	Log Reduktion				2 d	7 d	14 d	28 d	Bakterien	A	2	3	-	k. Z.	B	-	-	3	k. Z.	Hefen	A	-	-	2	k. Z.	B	-	-	1	k. Z.	Legende: d = Tage, k. Z. = keine Zunahme	
		Kriterium	Log Reduktion																																			
2 d	7 d		14 d	28 d																																		
Bakterien	A	2	3	-	k. Z.																																	
	B	-	-	3	k. Z.																																	
Hefen	A	-	-	2	k. Z.																																	
	B	-	-	1	k. Z.																																	
Ergebnisse der Reisolierung und Beurteilung																																						
Testkeime	Anfangsbelastung (KBE/ml oder g)	10	2 d	7 d	14 d	28 d																																
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 5027	$1,0 \times 10^5$	$10^5 - 10^6$	$8,1 \times 10^3$	< 100	< 100	< 100																																
			entspricht Kriterium B																																			
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	$2,5 \times 10^5$	$10^5 - 10^6$	$1,9 \times 10^5$	$1,0 \times 10^5$	$6,2 \times 10^4$	$8,1 \times 10^2$																																
			entspricht nicht Kriterium A und B																																			
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	$4,2 \times 10^5$	$10^5 - 10^6$			$1,3 \times 10^5$	$1,2 \times 10^5$																																
			entspricht nicht Kriterium A und B																																			
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	$2,2 \times 10^5$	$10^5 - 10^6$			$2,8 \times 10^5$	$2,3 \times 10^5$																																
			entspricht nicht Kriterium A und B																																			
Die Untersuchung erfolgte in laboreigenen Gefäßen. Ergebnis der Reisolierung in KBE/g oder ml.																																						
BioChem GmbH																																						
 Kerstin Piecha geprüft: Mitarbeiter Mikrobiologie		 Dr. Holger Kühn genehmigt: Laborleitung Mikrobiologie																																				
U:\Berichte\KBL\Johannes Gutenberg\IR_MB_KBL630511.01.doc																																						

Dolmiersstraße 5b
D-76185 Karlsruhe
Tel. +49 721/9737-0
Fax +49 721/9737-222
biochem@biochem.de
www.biochem.de

Geschäftsführer:
Dr. Jürgen Branke
Amtsgericht Mannheim
HRB 103147
USt-Id-Nr.: DE143092071



Johannes Gutenberg Universität Mainz
Mark Denny
Standinger Weg 5
55128 Mainz

Test item: Imigel-Anbruchstabi
Batch: IMIGEL200417
Sponsor: Universität Mainz - Pharmazie
Entry no.: 626058
Date of Receipt: 2017-05-03
Date of Report: 2017-06-13

Efficacy of Antimicrobial Preservation according to Ph. Eur., current Edition

criteria of acceptance
for topical preparations:

	log reduction				
	criteria	2 d	7 d	14 d	28 d
bacteria	A	2	3	-	NI
	B	-	-	3	NI
fungi	A	-	-	2	NI
	B	-	-	1	NI

legend: d = days, NI = no increase

Results of recovery and evaluation

Test organisms	Inoculum (CFU/ml or g)	t ₀	2 d	7 d	14 d	28 d
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	1.9 x 10 ⁵	10 ⁵ - 10 ⁶	2.9 x 10 ⁵	< 100	< 100	< 100
correspond to criteria B						
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	4.0 x 10 ⁵	10 ⁵ - 10 ⁶	1.4 x 10 ⁵	1.4 x 10 ⁵	8.3 x 10 ⁴	3.0 x 10 ³
fails criteria A and B						
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	5.5 x 10 ⁵	10 ⁵ - 10 ⁶			1.8 x 10 ⁴	2.6 x 10 ⁴
correspond to criteria B						
<i>Aspergillus brasiliensis</i> * ATCC 16404	2.4 x 10 ⁵	10 ⁵ - 10 ⁶			1.5 x 10 ⁵	1.1 x 10 ⁵
fails criteria A and B						


The test was performed in laboratory vessels. Results of recovery in CFU per g or ml.

BioChem GmbH


Tanja Völkel

reviewed by: employee of microbiology

U:\Berichte\KBL\Uni Mainz\IR_MB_KBL626058.01.doc



Dr. Holger Kühn

approved by: head of microbiological laboratory

Prüfberichte der Langzeit-Stabilitätsuntersuchung ImiGEL über insgesamt sechs Monate. Es sind jeweils ein mikrobieller Befund und ein Einlagerungsvermerk hinterlegt. Letzterer entspricht der Probe, die im Institut einer Gehaltsanalytik unterzogen wurde.

1/6

									
BioChem GmbH · Daimlerstraße 5b · D-76185 Karlsruhe	Labor für biologische und chemische Analytik GmbH								
Johannes Gutenberg-Universität Mainz Institut für Pharmazie und Biochemie - Therapeutische Lebenswissenschaften Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie Mark Denny Staudinger Weg 5 55099 Mainz									
Ihr Ansprechpartner:									
Gesine Haberey Durchwahl: -119 Email: gesine.haberey@biochem.de									
28.07.2016									
Auslagerung Imigel 5% Gel, Protokoll: IMI.Gel001 Studie 1									
Sehr geehrter Herr Denny,									
anbei erhalten Sie die u.g. Probe zum Prüfzeitpunkt t = 1 Monat. Die Probe wurde am 28.07.2016 ausgelagert. Wie mit Herrn Leis besprochen, erhalten Sie nur eine Probe statt wie im Plan angegeben 2.									
<table border="1"> <thead> <tr> <th>Material</th> <th>Charge</th> <th>BioChem Eing.-Nr.</th> <th>Klimabedingung</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Imigel 5% Gel</td> <td>Protokoll: IMI.Gel001</td> <td>586953-03-001</td> <td>30 °C / 65 % rel. F.</td> </tr> </tbody> </table>	Material	Charge	BioChem Eing.-Nr.	Klimabedingung	Imigel 5% Gel	Protokoll: IMI.Gel001	586953-03-001	30 °C / 65 % rel. F.	<i>100,03%</i>
Material	Charge	BioChem Eing.-Nr.	Klimabedingung						
Imigel 5% Gel	Protokoll: IMI.Gel001	586953-03-001	30 °C / 65 % rel. F.						
Mit freundlichen Grüßen BioChem GmbH									
 Gesine Haberey Laborleitung Analytik	 Anke Reinker Mitarbeiterin Analytik								
Daimlerstraße 5b D-76185 Karlsruhe Tel. 07 21/97 37-0 Fax 07 21/97 37-222 biochem@biochem.de www.biochem.de									
Geschäftsführer: Dr. Jürgen Branke Gerhard Ried Amtsgericht Mannheim HRB 103147 UStId-Nr.: DE140592071									
Anschreiben: Z_PB_J13_160727_Studie 1_586953_Auslagerung_t01.01.doc Seite 1 von 1									



Labor für biologische und
chemische Analytik GmbH

BioChem GmbH · Daimlerstraße 5b · D-76185 Karlsruhe

Johannes Gutenberg-Universität Mainz
Institut für Pharmazie und Biochemie - Therapeutische Lebenswissenschaften
Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie
Mark Denny
Staudinger Weg 5
55099 Mainz

Ihr Ansprechpartner:

Gesine Haberey
Durchwahl: -119

Email: gesine.haberey@biochem.de

28.09.2016

Auslagerung

Imigel 5% Gel, Protokoll: IMI.Gel001
Studie 1

Sehr geehrter Herr Denny,

anbei erhalten Sie die u.g. Probe zum Prüfzeitpunkt $t = 3$ Monat. Die Probe wurde am
28.09.2016 ausgelagert.

Material	Charge	BioChem Eing.-Nr.	Klimabedingung
Imigel 5% Gel	Protokoll: IMI.Gel001	586953-03-007	30 °C / 65 % rel. F.

100,05

Mit freundlichen Grüßen
BioChem GmbH


Gesine Haberey
Laborleitung Analytik


Jana Essebier
Mitarbeiterin Analytik

Anschreiben: Z_PB_J13_160927_Studie 1_586953_Auslagerung_103.01
Seite 1 von 1

Daimlerstraße 5b
D-76185 Karlsruhe
Tel. +49 721/9737-0
Fax +49 721/9737-222
biochem@biochem.de
www.biochem.de

Geschäftsführer:
Dr. Jürgen Bronke
Amtsgericht Mannheim
HRB 103147
USt-ID-Nr.: DE143592071



Labor für biologische und
chemische Analytik GmbH

BioChem GmbH - Daimlerstraße 5b - D-76185 Karlsruhe

Johannes Gutenberg-Universität Mainz
Institut für Pharmazie und Biochemie - Therapeutische Lebenswissenschaften
Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie
Mark Denny
Staudinger Weg 5
55099 Mainz

Ihr Ansprechpartner:

Gesine Haberey
Durchwahl: -119

Email: gesine.haberey@biochem.de

27.12.2016

Auslagerung

Imigel 5% Gel, Protokoll: IMI.Gel001
Studie 1


Sehr geehrter Herr Denny,


anbei erhalten Sie die u.g. Probe zum Prüfzeitpunkt t = 6 Monate. Die Probe wurde am
27.12.2016 ausgelagert.

Material	Charge	BioChem Eing.-Nr.	Klimabedingung
Imigel 5% Gel	Protokoll: IMI.Gel001	586953-03-010	30 °C / 65 % rel. F.

98,77%

Mit freundlichen Grüßen
BioChem GmbH


Gesine Haberey
Laborleitung Analytik


Dr. Romain Coulon
Laborleitung Analytik


Daimlerstraße 5b
D-76185 Karlsruhe
Tel. +49 721/9737-0
Fax +49 721/9737-222
biochem@biochem.de
www.biochem.de

Geschäftsführer:
Dr. Jürgen Branka
Claude E. Kröll
Amtsgericht Mannheim
HRB 103147
UStId-Nr.: DE143582071

Anschreiben: Z_PB_J13_161227_Studie 1_586953_Auslagerung_t06.01
Seite 1 von 1

Prüfberichte der mikrobiellen Stabilitätsuntersuchung ImiGEL mit verschiedenen Konzentration der Konservierungsmittel (0,05 %, 0,5 % und 0,15 %).

1/6

Dalmierstraße 5b D-78165 Karlsruhe Tel. +49 721/9737-0 Fax +49 721/9737-222 biochem@biochem.de www.biochem.de	Geschäftsführer: Dr. Jürgen Branke Amtsgericht Mannheim HRB 103147 UStId-Nr.: DE14360201	 BioChem Labor für biologische und chemische Analytik GmbH
--	--	---

Johannes Gutenberg-Universität Mainz
 Herr Mark Denny
 Staudinger Weg 5
 55099 Mainz

Ria Kurstak
 Durchwahl -114

Prüfbericht

Probe : Imigel 5%, t-0 Wert
 Ch.-B. : 30.06.17, 0,07% Eingang-Nr. : 636175
 Auftraggeber : Johannes-Gutenberg Uni Mainz Eingang-Datum : 20.07.2017
 Durchführung : 25.07.2017 – 31.07.2017 Ausgang-Datum : 01.08.2017

Prüfparameter	Akzeptanzkriterien für Präparate zur kutanen Anwendung	Ergebnisse
TAMC*	$\leq 10^2$ KBE/g	$< 10^1$ KBE/g
TYMC**	$\leq 10^1$ KBE/g	$< 10^1$ KBE/g
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	in 1 g nicht nachweisbar	in 1 g nicht nachweisbar
<i>Staphylococcus aureus</i>	in 1 g nicht nachweisbar	in 1 g nicht nachweisbar


* Total Aerobic Microbial Count (aerob wachsende, mesophile Mikroorganismen)
 ** Total Combined Yeast/Moulds Count (Hefen/Pilze)


Sonstige Keime pro g: nicht nachweisbar

Bewertung: Das untersuchte Prüfmuster entspricht hinsichtlich der untersuchten Prüfparameter den Spezifikationen.

Durchführung gemäß validiertem Prüfverfahren der Ph. Eur., aktuelle Ausgabe, 2.6.12 (Plattenguss-Methode) und 2.6.13

BioChem GmbH


 Kerstin Piecha
 Geprüft: Mitarbeiter Mikrobiologie


 Ria Kurstak
 genehmigt: Laborleitung Mikrobiologie

U:\Berichte\Keimzahl\Johannes-Gutenberg Uni Mainz\R_MB_K636175 01.doc

Dolmetsstraße 5a
D-76185 Karlsruhe
Tel. +49 721/9737-0
Fax +49 721/9737-222
biochem@biochem.de
www.biochem.de

Geschäftsführer:
Dr. Jürgen Brinke
Amtsgericht Mannheim
HRB 103147
UStId-Nr.: DE143092071



BioChem
Labor für biologische und
chemische Analytik GmbH

Johannes Gutenberg Universität Mainz
Institut für Pharmazie und Biochemie -
Therapeutische Lebenswissenschaften
Mark Denny
Staudinger Weg 5
55099 Mainz

Test item: IMIGEL 5% (0,07% Konservierung)
Batch: 300617
Sponsor: Universität Mainz - Pharmazie
Entry no.: 636172
Date of Receipt: 2017-07-20
Date of Report: 2017-08-30

Efficacy of Antimicrobial Preservation according to Ph. Eur., current Edition

criteria of acceptance
for topical preparations:

	log reduction				
	criteria	2 d	7 d	14 d	28 d
bacteria	A	2	3	-	NI
	B	-	-	3	NI
fungi	A	-	-	2	NI
	B	-	-	1	NI

legend: d = days, NI = no increase

Results of recovery and evaluation

Test organisms	Inoculum (CFU/ml or g)	t ₀	2 d	7 d	14 d	28 d
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	4.9 x 10 ⁵	10 ⁵ - 10 ⁶	7.6 x 10 ⁴	3.9 x 10 ³	< 100	< 100
corresponds to criteria B						
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	3.7 x 10 ⁵	10 ⁵ - 10 ⁶	2.6 x 10 ⁵	2.4 x 10 ⁵	1.4 x 10 ⁵	4.9 x 10 ³
fails criteria A and B						
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	3.8 x 10 ⁵	10 ⁵ - 10 ⁶			6.6 x 10 ⁴	2.0 x 10 ²
fails criteria A and B						
<i>Aspergillus brasiliensis</i> * ATCC 16404	2.1 x 10 ⁵	10 ⁵ - 10 ⁶			6.9 x 10 ⁴	1.2 x 10 ⁶
fails criteria A and B						

The test was performed in laboratory vessels. Results of recovery in CFU per g or ml.

BioChem GmbH

Kerstin Piecha

reviewed by: employee of microbiology

Dr. Holger Kühn

approved by: head of microbiological laboratory

U:\Berichte\KBL\Uni Mainz\IR_MB_KBL636172.01.doc

Dalmierstraße 5b
D-76185 Karlsruhe
Tel. +49 721/9737-0
Fax +49 721/9737-222
biochem@biochem.de
www.biochem.de

Geschäftsführer:
Dr. Jürgen Bräse
Amtsgericht Mannheim
HRB 103147
UStId-Nr.: DE143502071



BioChem
Labor für biologische und
chemische Analytik GmbH

Johannes Gutenberg-Universität Mainz
Herr Mark Denny
Staudinger Weg 5
55099 Mainz

Ria Kurstak
Durchwahl -114

Prüfbericht

Probe : Imigel 5%, t-0 Wert
Ch.-B. : 060717, 0,1% Eingangs-Nr. : 636176
Auftraggeber : Johannes-Gutenberg Uni Mainz Eingangs-Datum : 20.07.2017
Durchführung : 25.07.2017 – 31.07.2017 Ausgangs-Datum : 01.08.2017

Prüfparameter	Akzeptanzkriterien für Präparate zur kutanen Anwendung	Ergebnisse
TAMC*	$\leq 10^2$ KBE/g	$< 10^1$ KBE/g
TYMC**	$\leq 10^1$ KBE/g	$< 10^1$ KBE/g
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	in 1 g nicht nachweisbar	in 1 g nicht nachweisbar
<i>Staphylococcus aureus</i>	in 1 g nicht nachweisbar	in 1 g nicht nachweisbar

* Total Aerobic Microbial Count (aerob wachsende, mesophile Mikroorganismen)

** Total Combined Yeast/Moulds Count (Hefen/Pilze)

Sonstige Keime pro g: nicht nachweisbar

Bewertung: Das untersuchte Prüfmuster entspricht hinsichtlich der untersuchten Prüfparameter den Spezifikationen.

Durchführung gemäß validiertem Prüfverfahren der Ph. Eur., aktuelle Ausgabe, 2.6.12 (Plattenguss-Methode) und 2.6.13

BioChem GmbH


Kerstin Piecha
Geprüft: Mitarbeiter Mikrobiologie


Ria Kurstak
genehmigt: Laborleitung Mikrobiologie

U:\Berichte\Keimzahl\Johannes-Gutenberg Uni Mainz\IR_MB_K636176.01.doc

Danklerstraße 5b
D-76185 Karlsruhe
Tel. +49 721/9737-0
Fax +49 721/9737 222
biochem@biochem.de
www.biochem.de

Geschäftsführer:
Dr. Jürgen Brinke
Amtsgericht Mannheim
HRB 103147
USt/G-Nr.: DE143502071



BioChem
Labor für biologische und
chemische Analytik GmbH

Johannes Gutenberg Universität Mainz
Institut für Pharmazie und Biochemie -
Therapeutische Lebenswissenschaften
Mark Denny
Staudinger Weg 5
55099 Mainz

Test item: IMIGEL 5% (0,1% Konservierung)
Batch: 060717
Sponsor: Universität Mainz - Pharmazie
Entry no.: 636173
Date of Receipt: 2017-07-20
Date of Report: 2017-08-30

Efficacy of Antimicrobial Preservation according to Ph. Eur., current Edition

criteria of acceptance
for topical preparations:

	log reduction				
	criteria	2 d	7 d	14 d	28 d
bacteria	A	2	3	-	NI
	B	-	-	3	NI
fungi	A	-	-	2	NI
	B	-	-	1	NI

legend: d = days, NI = no increase

Results of recovery and evaluation

Test organisms	Inoculum (CFU/ml or g)	t ₀	2 d	7 d	14 d	28 d
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	4.9 x 10 ⁵	10 ⁵ - 10 ⁶	4.2 x 10 ⁴	8.1 x 10 ²	< 100	< 100
corresponds to criteria B						
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	3.7 x 10 ⁵	10 ⁵ - 10 ⁶	2.7 x 10 ⁵	1.7 x 10 ⁵	7.3 x 10 ⁴	1.0 x 10 ³
fails criteria A and B						
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	3.8 x 10 ⁵	10 ⁵ - 10 ⁶			1.2 x 10 ⁴	< 100
corresponds to criteria B						
<i>Aspergillus brasiliensis</i> * ATCC 16404	2.1 x 10 ⁵	10 ⁵ - 10 ⁶			1.4 x 10 ⁵	3.3 x 10 ⁴
fails criteria A and B						

The test was performed in laboratory vessels. Results of recovery in CFU per g or ml

BioChem GmbH

Kerstin Piecha

reviewed by: employee of microbiology

Dr. Holger Kühn

approved by: head of microbiological laboratory

U:\Berichte\KBL\Uni Mainz\R_MB_KBL636173.01.doc

Daimlerstraße 5b
D-76185 Karlsruhe
Tel. +49 721/9737-0
Fax +49 721/9737-222
biochem@biochem.de
www.biochem.de

Geschäftsführer:
Dr. Jürgen Bronke
Amtsgericht Mannheim
HRB 103147
UStId-Nr.: DE143592071



Johannes Gutenberg-Universität Mainz
Herr Mark Denny
Staudinger Weg 5
55099 Mainz

Ria Kurstak
Durchwahl -114

Prüfbericht

Probe : Imigel 5%, t-0 Wert
Ch.-B. : 120717, 0,15% Eingangs-Nr. : 636177
Auftraggeber : Johannes-Gutenberg Uni Mainz Eingangs-Datum : 20.07.2017
Durchführung : 25.07.2017 – 31.07.2017 Ausgangs-Datum : 01.08.2017

Prüfparameter	Akzeptanzkriterien für Präparate zur kutanen Anwendung	Ergebnisse
TAMC*	$\leq 10^2$ KBE/g	$< 10^1$ KBE/g
TYMC**	$\leq 10^1$ KBE/g	$< 10^1$ KBE/g
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	in 1 g nicht nachweisbar	in 1 g nicht nachweisbar
<i>Staphylococcus aureus</i>	in 1 g nicht nachweisbar	in 1 g nicht nachweisbar

* Total Aerobic Microbial Count (aerob wachsende, mesophile Mikroorganismen)
** Total Combined Yeast/Moulds Count (Hefen/Pilze)

Sonstige Keime pro g: Aerobe Sporenbildner

Bewertung: Das untersuchte Prüfmuster entspricht hinsichtlich der untersuchten Prüfparameter den Spezifikationen.

Durchführung gemäß validiertem Prüfverfahren der Ph. Eur., aktuelle Ausgabe, 2.6.12 (Plattenguss-Methode) und 2.6.13

BioChem GmbH


Kerstin Piecha
Geprüft: Mitarbeiter Mikrobiologie


Ria Kurstak
genehmigt: Laborleitung Mikrobiologie

U:\Berichte\Keimzahl\Johannes-Gutenberg Uni Mainz\IR_MB_K636177.01.doc

Dämerstraße 5b
D-76185 Karlsruhe
Tel. +49 721/8737-0
Fax +49 721/8737-222
biochem@biochem.de
www.biochem.de

Geschäftsführer:
Dr. Jürgen Bräse
Amtsgericht Mannheim
HRG 100147
UStId-Nr.: DE143592071



BioChem
Labor für biologische und
chemische Analytik GmbH

Johannes Gutenberg Universität Mainz
Institut für Pharmazie und Biochemie -
Therapeutische Lebenswissenschaften
Mark Denny
Staudinger Weg 5
55099 Mainz

Test item: IMIGEL 5% (0,15% Konservierung)

Batch: 120717

Sponsor: Universität Mainz - Pharmazie

Entry no.: 636174

Date of Receipt: 2017-07-20

Date of Report: 2017-08-30

Efficacy of Antimicrobial Preservation according to Ph. Eur., current Edition

criteria of acceptance

for topical preparations:

	log reduction				
	criteria	2 d	7 d	14 d	28 d
bacteria	A	2	3	-	NI
	B	-	-	3	NI
fungi	A	-	-	2	NI
	B	-	-	1	NI

legend: d = days, NI = no increase

Results of recovery and evaluation

Test organisms	Inoculum (CFU/ml or g)	t_0	2 d	7 d	14 d	28 d
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	4.9×10^5	$10^5 - 10^6$	5.0×10^4	1.4×10^5	2.5×10^5	7.4×10^5
fails criteria A and B						
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	3.7×10^5	$10^5 - 10^6$	1.9×10^5	1.7×10^5	1.4×10^5	6.5×10^3
fails criteria A and B						
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	3.8×10^9	$10^5 - 10^6$			4.0×10^5	3.7×10^5
fails criteria A and B						
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ^a ATCC 16404	2.1×10^5	$10^5 - 10^6$			8.1×10^4	3.9×10^4
fails criteria A and B						

The test was performed in laboratory vessels. Results of recovery in CFU per g or ml.

BioChem GmbH

Kerstin Piecha

reviewed by: employee of microbiology

Dr. Holger Kühn

approved by: head of microbiological laboratory

U:\Berichte\KBL\Uni Mainz\R_MB_KBL636174-01.doc