
Aus der Universitätsklinik und Poliklinik für Dermatologie und Venerologie der
Medizinischen Fakultät an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
(Direktor: Prof. Dr. med. habil. Cord Sunderkötter)

**Präklinische Untersuchungen zur kutanen Bioäquivalenz
topischer Präparate am Beispiel Lidocain-haltiger Sprays**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt
der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Bianca Yasmin Juha

Betreuer: apl. Prof. Dr. med. habil. Johannes Wohlrab

Gutachter: apl. Prof. Dr. med. habil. Johannes Wohlrab
Prof. Dr. rer. nat. habil. Dr. h.c. Reinhard Neubert
Prof. Dr. med. Joachim Fluhr (Berlin)

04.12.2018

18.09.2019

meiner Familie gewidmet

Referat

Bei topisch applizierten Arzneimitteln mit überwiegend lokaler Wirkung auf die Haut oder Schleimhaut gibt es aktuell noch keine verbindlichen regulatorischen Vorschriften, aufgrund derer die Durchführung einer klinischen Studie zur therapeutischen Äquivalenz zwischen Originator und Innovator für die Zulassung eines Generikums ersetzt werden kann.

In der vorliegenden Arbeit wird eine zweistufige präklinische Validierungsstrategie vorgestellt, welche am Beispiel von zwei topischen, konzentrationsgleichen Lidocain-haltigen Arzneimitteln mit ähnlicher Zusammensetzung der Hilfsstoffe Äquivalenznachweise auf pharmakokinetischer Ebene und zur Verträglichkeit an validierten Modellen untersucht.

Dabei wurde an gesunder und artifiziell geschädigter ex-vivo Humanhaut das Penetrationsprofil des Wirkstoffs Lidocain im Franz'schen Diffusions-Modell und die lokale Toxizität im HET-CAM-Modell vergleichend ermittelt. Beide Prüfpräparate zeigten dabei im direkten Vergleich nahezu identische Werte, die als Äquivalenznachweis interpretiert werden können.

Auf Grund dieser Ergebnisse wird vorgeschlagen, diese Validierungsstrategie als Ersatz für therapeutische Äquivalenzstudien, zumindest für Lidocain-haltige Präparationen, als alternativen Nachweis der Bioäquivalenz anzuerkennen, um klinische Prüfung zu vermeiden, Kosten zu sparen und generische Zulassungsverfahren zu beschleunigen.

Juha, Bianca Yasmin: **Präklinische Untersuchungen zur kutanen Bioäquivalenz topischer Präparate am Beispiel Lidocain-haltiger Sprays.** Halle, Univ., Med. Fak., Diss., 65 Seiten, 2018

Inhaltsverzeichnis

Referat	
Inhaltsverzeichnis	I
Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole	III
Verzeichnis der Abbildungen	IV
Verzeichnis der Tabellen	V
1 Einleitung	1
1.1 Grundlagen der Pharmakologie topischer Präparate.....	1
1.1.1 <i>Kutane Bioverfügbarkeit</i>	1
1.1.2 <i>Haut- und Schleimhaut-Toxizität</i>	4
1.2 Regulatorische Anforderungen an die Bioäquivalenz von Topika.....	5
1.2.1 <i>Allgemeine Anforderungen an Bioäquivalenz</i>	5
1.2.2 <i>Anforderungen an die Bioäquivalenz von Topika</i>	5
1.3 Pharmakologie von Lidocain-HCl.....	8
1.3.1 <i>Begründung der Präparate-Auswahl</i>	8
1.3.2 <i>Wirkung von Lidocain in der Lokalanästhesie</i>	8
1.3.3 <i>Präklinische Eigenschaften von Lidocain</i>	9
1.3.4 <i>Klinische Eigenschaften von Lidocain</i>	10
2 Zielstellung	13
3 Material und Methodik	14
3.1 Präparate.....	14
3.2 Penetrationsuntersuchung in der Franz´schen Diffusionszelle.....	14
3.2.1 <i>Einleitung</i>	14
3.2.2 <i>Material</i>	14
3.2.3 <i>Durchführung</i>	15
3.2.4 <i>Auswertungs-Prozess</i>	18
3.3 HET-CAM-Untersuchung zur Schleimhauttoxizität.....	19
3.3.1 <i>Einleitung</i>	19
3.3.2 <i>Material</i>	19
3.3.3 <i>Durchführung</i>	20
3.3.4 <i>Auswertungs-Prozess</i>	21
4 Ergebnisse	24
4.1 Penetration von Lidocain in der Franz´schen Diffusionszelle.....	24
4.2 Schleimhauttoxizität von Lidocain in der HET-CAM-Untersuchung.....	31
4.2.1 <i>Ergebnisse der visuellen Auswertung</i>	31
4.2.2 <i>Ergebnisse der Auswertung mittels Laser-Doppler-Fluxmetrie</i>	39
5 Diskussion	42
5.1 Einleitung.....	42
5.2 Penetrationsuntersuchung in der Franz´schen Diffusionszelle.....	42
5.3 HET-CAM-Untersuchung.....	45

5.4	Regulatorische Relevanz.....	47
5.5	Übertragbarkeit auf andere Moleküle/Galeniken.....	54
5.6	Pharmakoökonomische Aspekte.....	55
6	Zusammenfassung	57
	Literaturverzeichnis	58
	Thesen der Dissertation.....	64
	Tabellarischer Lebenslauf	
	Selbstständigkeitserklärung	
	Erklärung über frühere Promotionsversuche	
	Danksagung.....	

Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole

Abkürzung	Bedeutung
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AUC	Area under curve
BCS	Biopharmaceutic Classification System
BfArM	Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte
C	Koagulation
CRS	Confocal Raman spectroscopy
DPK	Dermatopharmacokinetic study
DMD	Dermal micordialysis
EMA	European Medicines Agency
FDA	Food and Drug Administration
H	Hämorrhagie
HET-CAM	Hühnerei-Test – Chorion-Allantois-Membran – Methode
HPLC	high performance liquid chromatography
IS	Irritationsscore
IVR	In vitro-release
L	Lyse
LD50	Mittlere letale Dosis
NIHS	National Institute of Health Service
NIR	Near-infrared spectroscopy
PK	Pharmacokinetic study
SLS	Natriumlaurylsulfat
TCS	Topical Classification System

Verzeichnis der Abbildungen

Abbildung 1 Chemische Struktur von Lidocain	10
Abbildung 2 Wirkdauer von Lidocain	11
Abbildung 3 Mittlere Plasmakonzentration von Lidocain	11
Abbildung 4 Schema einer Franz-Kammer	16
Abbildung 5 Übersicht über den Ablauf der Penetrationsprüfung.....	18
Abbildung 6 Penetrationsprofile für Prüf- und Referenzpräparat.....	26
Abbildung 7 Übersicht über die Tiefenprofile	27
Abbildung 8 Einzelbetrachtung der Tiefenprofile	28
Abbildung 9 Mittelwerte der AUC.....	28
Abbildung 10 Tiefenprofile in molarer Darstellung	30
Abbildung 11 Mittelwerte der AUC in molarer Darstellung	30
Abbildung 12 Photographie 12 Hühnereier Baseline und nach Applikation von Xylocain®.....	37
Abbildung 13 Photographie 12 Hühnereier Baseline und nach Applikation des Prüfpräparates	38
Abbildung 14 Graphische Darstellung Doppler-Fluxmetrie Positiv- und Negativkontrolle	40
Abbildung 15 Graphische Darstellung Doppler-Fluxmetrie Xylocain® und Prüfpräparat	41
Abbildung 16 Proposed Studies for Topical Bioequivalence	49
Abbildung 17 Topical Drug Classification System.....	51
Abbildung 18 Entscheidungsbaum im TCS-System.....	51
Abbildung 19 Working Paradigm for the generic.....	52
Abbildung 20 Entscheidungsbaum	53
Abbildung 21 Approaches for BE assessment of topical dermatological products	54

Verzeichnis der Tabellen

Tabelle 1 In vivo-Methoden	2
Tabelle 2 In vitro-Methoden.....	3
Tabelle 3 Vor- und Nachteile der Oberflächenanästhesie.....	9
Tabelle 4 Mittlere letale Dosen von Lidocain	10
Tabelle 5 Schweregrade	22
Tabelle 6 Mittlerer Anteil an Lidocain für Prüf- und Referenzpräparat.....	25
Tabelle 7 Wiederfindungsraten.....	27
Tabelle 8 Mittlerer Anteil an Lidocain für Prüf- und Referenzpräparat in molarer Darstellung.....	29
Tabelle 9 Irritationsscore Xylocain®	32
Tabelle 10 Irritationsscore Prüfpräparat.....	32
Tabelle 11 Irritationsscore 1% Natriumlaurylsulfat.....	33
Tabelle 12 Irritationsscore Aqua dest.	33
Tabelle 13 Schweregrad Xylocain®.....	34
Tabelle 14 Schweregrad Prüfpräparat.....	34
Tabelle 15 Schweregrad 1% Natriumlaurylsulfat	35
Tabelle 16 Schweregrad Aqua dest.....	35
Tabelle 17 Zusammenfassung der Ergebnisse der visuellen Beurteilung	36

1 Einleitung

1.1 Grundlagen der Pharmakologie topischer Präparate

Mit dem Begriff Topikum (nach griechisch topos = Ort) werden Arzneimittel zur lokalen Anwendung bezeichnet, also solche Arzneimittel, die lokal appliziert werden und annahmegemäß ihren Wirkort am Applikationsort haben (European Medicines Agency, 1996). Dies findet z.B. bei Ophthalmologika, vor allem aber bei Dermatologika Anwendung. Im Vergleich zu oral applizierten Präparaten entstehen bei topisch applizierten Arzneimitteln Besonderheiten:

Einerseits erreichen sie ihren Ziel-Wirkort meist nicht über den Blutkreislauf, also systemisch, sondern lokal, sodass sich Besonderheiten hinsichtlich der Bioverfügbarkeit ergeben. Andererseits muss durch den direkten Kontakt mit der Haut ein besonderes Augenmerk auf die lokale Toxizität gelegt werden. Beide Besonderheiten werden im Folgenden näher betrachtet.

1.1.1 Kutane Bioverfügbarkeit

Die in dieser Arbeit primär betrachteten topischen Dermatologika sind so konzipiert, dass sie nach Auftragen auf die Hautoberfläche eine lokale Wirkung in der (erkrankten) Haut erzeugen.

Das Ziel ist daher, die Wirkstoffkonzentration in der Haut – also die kutan verfügbare Wirkstoffmenge - zu maximieren, die systemische Aufnahme des Wirkstoffes aber zu minimieren (Herkenne et al., 2008) - denn die systemische Verfügbarkeit trägt nicht zur Wirksamkeit bei, kann aber zu Nebenwirkungen führen.

Zur Ermittlung der lokalen Bioverfügbarkeit gibt es verschiedene Verfahren. Einerseits kann die Ermittlung in vivo an Tieren oder an Menschenhaut erfolgen, andererseits stehen aber auch verschiedene in vitro-Methoden zur Verfügung. Diese Methoden werden in den Tabellen 1 und 2 kurz mit ihren Vor- und Nachteilen erläutert.

Tabelle 1 In vivo-Methoden		
Methoden	Vorteile	Nachteile
<p>Tape Stripping Test/dermatopharmakokinetische Methode</p> <ul style="list-style-type: none"> - an tierischer Haut, z.B. Rattenhaut (Dary et al., 2001) - an humaner Haut (Zhai et al., 2013; N'Dri-Stempfer et al., 2009) - kann auch in vitro angewendet werden (Lademann et al., 2008) 	<ul style="list-style-type: none"> - kostengünstig - minimalinvasiv 	<ul style="list-style-type: none"> - methodische Ungenauigkeiten gefährden Vergleichbarkeit - Methode zeigt teilweise andere Ergebnisse als vergleichende in vivo-Studien (z.B. García Ortiz et al., 2011) - keine zeitliche Auflösung - für die Anwendung an gesunder Haut mit intaktem Stratum corneum konzipiert, dies entspricht aber nicht der Praxis (erkrankte Haut) - keine Aussage über den Gehalt in anderen Schichten: laut Incecayir et al. (2011) keine Korrelation z.B. mit Gehalt in Dermis, aber laut Herkenne et al. (2008) gute Korrelation mit Gehalt in tieferen Schichten
<p>Dermale Mikrodialyse (Yacobi et al., 2014; Tetey-Amlalo et al., 2009; Au et al., 2012; Benfeldt et al., 2007)</p>	<ul style="list-style-type: none"> - minimalinvasiv - keine Beschränkung auf Messung an gesunder Haut - hohe zeitliche Auflösung - genauer als z.B. Vasoconstrictor assay (Lehman et al., 2014) 	<ul style="list-style-type: none"> - erschwerte Anwendbarkeit bei sehr lipophilen oder zu einem großen Anteil proteingebundenen Substanzen - methodische Ungenauigkeiten gefährden Vergleichbarkeit - Bestimmung nur in der vitalen Epidermis oder Dermis, nicht im Stratum corneum
<p>Vasoconstrictor assay (Baynes et al., 2012)</p>	<ul style="list-style-type: none"> - minimalinvasiv - einzige offiziell anerkannte Surrogatmethode 	<ul style="list-style-type: none"> - Sättigung der Blässereaktion - Begrenztheit auf Kortikoide - Auswertung nicht 100% objektiv (Chromameter)
<p>Hautbiopsie (Baynes et al., 2012)</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Aussage über alle Schichten 	<ul style="list-style-type: none"> - sehr invasiv
<p>Suction blister (Herkenne et al., 2008)</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Messung direkt am Wirkort - hohe zeitliche Auflösung 	<ul style="list-style-type: none"> - erschwerte Anwendbarkeit bei sehr lipophilen oder zu einem großen Anteil gebundenen Substanzen - sehr invasiv

Tabelle 2 In vitro-Methoden		
Methoden	Vorteile	Nachteile
<p>Isolierte Perfusion von</p> <ul style="list-style-type: none"> - tierischen Hautlappen (Grosse-Siestrup et al., 2002; Riviere et al., 1986; Kjaersgaard, 1954) - menschlichen Hautlappen (Hiernickel, 1985) - Ratten (Cross et al., 1994) - Kaninchenohren (Rischbieter, 1913) - Schweineohren (de Lange et al., 1992) - Rindereutern (Pittermann et al., 1995; 1997); Pittermann und Kietzmann, 2006; Kietzmann et al., 1993; Kietzmann und Löscher, 1993; Ziv und Sulman, 1975) 	<ul style="list-style-type: none"> - nicht invasiv - zeitliche Auflösbarkeit 	<ul style="list-style-type: none"> - bei Verwendung von tierischer Haut Unterschiede zwischen tierischer und humaner Haut (Baynes et al. (2012); z.B. Unterschiede in der Dicke der Dermis, Menge und Anordnung der Haarfollikel und Hautdrüsen
<p>In vitro-Freisetzungsverfahren (Franz, 1975; Bayes et al., 2012)</p>	<ul style="list-style-type: none"> - nicht invasiv - höhere Standardisierung bei Verwendung künstlicher Membranen - zeitliche Auflösbarkeit 	<ul style="list-style-type: none"> - Veränderungen der lebenden Haut, etwa metabolischer Natur, können nicht erfasst werden - bei Verwendung von tierischer Haut ggf. andere Eigenschaften als menschliche Haut - bei Verwendung künstlicher Membran ggf. andere Eigenschaften als (menschliche) Haut

1.1.2 Haut- und Schleimhaut-Toxizität

Neben der kutanen Bioverfügbarkeit spielt bei kutaner Applikation eines Pharmakons auch die Haut- und Schleimhauttoxizität des zu applizierenden Pharmakons eine zentrale Rolle. Mit Toxizität (von griechisch Toxicon = Gift) werden giftige und gesundheitsschädigende, grundsätzlich von der Dosis abhängige Eigenschaften und Wirkung von chemischen Substanzen und physikalischen Faktoren bezeichnet.

Um diese bei der Applikation von topischen Präparaten zu testen, stehen verschiedene Modelle zur Verfügung.

Standard war hierbei lange Zeit der Draize-Test (Draize et al., 1944). Dabei handelt es sich um einen Tierversuch am Kaninchen zur Augen- und Hautverträglichkeitsprüfung einer Substanz. Die zu testende Substanz wird auf das Kaninchenauge appliziert und die lokale Reaktion beurteilt.

Da Tierversuche wo immer möglich vermieden werden sollten, deren Übertragbarkeit auf den Menschen immer wieder angezweifelt wurde und dieser Test nicht zuletzt mit einer hohen Subjektivität behaftet ist, wurden die Entwicklung verschiedener in vitro-Alternativen zum Draize-Test weltweit vorangetrieben (Macfarlane et al., 2009).

Alternative Untersuchungsmethoden sind zum Beispiel der Red Blood Cell Test, der Hämoglobin-Denaturierungs-Test, Tests an isolierter Hornhaut oder ganzen isolierten Augen und Zellkulturtests – hierfür sind inzwischen auch verschiedene kommerzielle Testkits verfügbar (vgl. Vinardell und Mitjans, 2008; Holden, 1988). Als neuere Methode wurde die Cytosensor Microphysiometer Technologie entwickelt (Scott et al., 2010).

Als neuester Trend sind weiterhin in-silico-Systeme in der Diskussion (Verma und Matthews, 2015).

Aktuell gibt es allerdings auch im neuesten Bericht der EU Kommission über Alternativmethoden für Tierversuche noch keine konkreten Vorschläge, welche Tests hier nun im Einzelfall konkret anzuwenden sind (Europäische Kommission, 2016).

Die am breitesten etablierte Alternative ist derzeit die Hühnerei-Test – Chorion-Allantois-Membran – Methode (HET-CAM), bei dem das zu prüfende Präparat auf die Chorion-Allantois-Membran eines befruchteten Hühnereies aufgebracht wird. Dabei handelt es sich um eine gut vaskularisierte Fruchthülle, die im Rahmen der Eientwicklung des Hühnereies als Respirationsorgan dient (Fáncsi und Fehér, 1979). Durch die gute Vaskularisierung lassen sich Auswirkungen des

Prüfpräparates auf die Gefäße sehr gut erkennen und daraus Rückschlüsse auf die Toxizität des Präparates ziehen.

1.2 Regulatorische Anforderungen an die Bioäquivalenz von Topika

1.2.1 Allgemeine Anforderungen an Bioäquivalenz

Die weltweit anerkannte Methode zum effizienten Nachweis der Gleichheit zweier Präparate ist der Nachweis der Bioäquivalenz, der bei verschiedenen Produktkategorien und Darreichungsformen unterschiedlich erbracht werden kann.

Die europäische Arzneimittelüberwachungsbehörde European Medicines Agency (EMA) definiert, dass zwei Produkte bioequivalent sind, wenn sie denselben Wirkstoff beinhalten, pharmazeutisch gleichwertig sind bzw. pharmazeutische Alternativen sind und ihre Unterschiede in der Bioverfügbarkeit (Rate und Ausmaß) nur innerhalb bestimmter festgelegter Grenzen differieren

1.2.2 Anforderungen an die Bioäquivalenz von Topika

Wie in Kapitel 1.1.1 zur kutanen Bioverfügbarkeit dargelegt, muss bei Dermatologika, die ausschließlich lokal wirken und somit keinen messbaren Blutspiegel erzeugen sollen, insbesondere die Bioverfügbarkeit in der Haut betrachtet werden. Damit sollte aber auch ein Vergleich der Bioverfügbarkeit zweier Präparate bzw. die Überprüfung von deren Bioäquivalenz auf die Wirkstoffkonzentration am Wirkort, und nicht auf die systemische Bioverfügbarkeit, abzielen. Borsadia hat dazu schon 1992 Vorschläge zur Klassifikation veröffentlicht (Borsadia et al., 1992).

Die amerikanische Arzneimittelüberwachungsbehörde Food and Drug Administration (FDA) erklärt in ihrer „Guidance for industry: Topical dermatologic corticosteroids: In vivo bioequivalence“ (Food and Drug Administration, 1995), dass, wenn Messungen der systemischen Wirkstoffkonzentration in Blut, Plasma oder Urin nicht praktikabel sind, die Bioverfügbarkeit und Bioäquivalenz auch durch andere Methoden nachgewiesen werden kann. Es werden folgende generell mögliche Methoden aufgezählt:

- 1) pharmakodynamische Messungen,
- 2) klinische Studien,

3) in vivo-Studien am Tier,

4) in vitro-Studien.

Hierin erwähnt die FDA aber auch, dass bisher nur pharmakodynamische Messungen, insbesondere der in dieser Leitlinie beschriebene vasoconstrictor assay für topische Cortikosteriode und klinische Studien für die Erteilung einer Zulassung anerkannt wurden.

Es existierte in der Vergangenheit auch ein Entwurf für eine „Guidance for industry: Topical Dermatological Drug Product NDAs and ANDAs – In Vivo Bioavailability, Bioequivalence“ für topische dermatologische Produkte generell, in dem auch der Tape Stripping Test als Surrogatmethode diskutiert wurde und eine genaue Verfahrensweise für seine Anwendung zur Ermittlung von Bioverfügbarkeit oder Bioäquivalenz beschrieben wurde (Food and Drug Administration, 1998). Dieser Leitfaden wurde allerdings 2002 zurückgezogen, nachdem in verschiedenen Laboren verschiedene Ergebnisse erzielt wurden und so Zweifel an der Wertigkeit der Methode aufkamen (Herkenne et al., 2008).

Lionberger, ein Direktor der FDA, hat 2015 ein komprimiertes Update zum Thema generische Zulassung für topische Produkte für die Industrie herausgegeben, in dem ein produktbezogener, risiko-basierter Ansatz favorisiert wird (Lionberger, 2015).

Die EMA erläutert ihre Vorstellungen bezüglich topischer Produkte unter anderem in ihrer „Note for guidance on the clinical requirements for locally applied, locally acting products containing known constituents“ (European Medicines Agency, 1996) sowie in ihren „Questions & Answers Generic Applications“ (European Medicines Agency, 2017a).

Bei zwar bekannten, aber bisher nicht lokal eingesetzten Wirkstoffen soll demnach ein komplettes Zulassungsdossier mit den dafür notwendigen umfangreichen präklinischen und klinischen Studien eingereicht werden.

Wurde der Wirkstoff bereits lokal eingesetzt, aber nun wird eine andere Indikation oder eine andere Dosierung beantragt oder liegt eine andere Formulierung vor, müssen diese Änderungen durch entsprechende klinische Studien belegt werden. Bei generischen Zulassungen oder Änderungsanzeigen sind, wenn möglich, pharmakodynamische Studien oder lokale Bioverfügbarkeitsstudien einzureichen. Letzteres können möglicherweise auch in vitro-Studien sein. Im Falle geringer Abweichungen kann, bei entsprechender Argumentation, auch auf eine lokale Bioverfügbarkeitsstudie verzichtet werden, wenn die Vergleichbarkeit von

Wirksamkeit und Sicherheit durch andere Methoden dargestellt werden kann. In allen anderen Fällen sind klinische Studien notwendig.

Aktuell ist die „Guideline on quality and equivalence of topical products“ in Bearbeitung (European Medicines Agency, 2014), deren Veröffentlichung für Mitte 2016 geplant war, aber bisher nicht erfolgt ist. Im Entwurf wird noch einmal bestätigt, dass generell klinische Studien notwendig sind, um die therapeutische Gleichwertigkeit topischer Produkte zu belegen. Andere Methoden können jedoch verwendet werden, sofern sie adäquat validiert sind. Hier werden in vitro-release, Tape Stripping Test und Mikrodialyse genannt. Im Falle von topisch angewandten Lösungen (einphasige Systeme) kann unter Umständen auf einen klinischen Beleg verzichtet werden.

Aktuell gibt es einen weiteren Richtlinienentwurf der EMA zum Beleg der Bioäquivalenz für lokal wirksame Produkte im Magen-Darm-Trakt. Hierin bezieht sich ein Kapitel auf Topika im Bereich der Mundschleimhaut, und es werden ausdrücklich auch Lokalanästhetika erwähnt. In diesem Entwurf wird vorgeschlagen, dass auf klinische Studien zum Beleg der Bioäquivalenz komplett verzichtet werden kann, wenn der Wirkstoff bekannt ist, in Lösung vorliegt und die Hilfsstoffe ähnlich sind (European Medicines Agency, 2017b)

Die japanische Arzneimittelüberwachungsbehörde National Institute of Health Service (NIHS) hat bereits 2003 eine Richtlinie für Bioäquivalenz-Studien von topischen Produkten veröffentlicht. Hier werden zum Nachweis der Produktgleichheit Tests an gesunden Probanden gefordert – unter anderem die Untersuchung der lokalen Pharmakokinetik mittels Tape Stripping Test, bei Corticoiden der Vasokonstriktor-Test. Ausschließliche Tests an der Tierhaut werden bei antiseptisch wirkenden Substanzen, Hämostatika und Wundheilungsmitteln akzeptiert, wenn die topisch applizierten Arzneimittel das Stratum corneum nicht durchdringen. Der ausschließliche Einsatz von vergleichenden in vitro-Tests ist nur bei bakteriziden, desinfizierenden oder antiseptischen Topika möglich, wenn diese das Stratum corneum nicht durchdringen (National Institute of Health Service, 2003).

Die kanadische Zulassungsbehörde Health Canada veröffentlichte bereits 1990 eine Richtlinie, die besagte, dass generische Produkte der Kategorie 1 (einfache Formulierungen, keine Hilfsstoffe, die die Penetration/Absorption beeinflussen) keine klinische Testung benötigen, sondern dass die extensive physiko-chemische Testung verschiedener Parameter für den Nachweis der Bioäquivalenz ausreichen

(Health Canada, 1990). Diese ist bis heute gültig, in einem Entwurf für eine weitere Richtlinie zur Bioverfügbarkeit von 2004 wird ausdrücklich noch einmal auf die Möglichkeit eines Biowavers bei topischen Produkten hingewiesen (Health Canada, 2004).

Soares et al. fassen den aktuellen Stand der regulatorischen Anforderungen an den Nachweis der Bioäquivalenz von generischen topischen dermatologischen Präparaten in Brasilien zusammen (Soares et al., 2015). Hier steht insbesondere die Resolution RDC nr. 37 vom 03. August 2011 der brasilianischen Zulassungsbehörde Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2011) im Vordergrund. Hiernach kann für solche Produkte auf eine klinische Studie verzichtet werden, wenn beide zu vergleichenden Präparate denselben Wirkstoff in derselben Konzentration sowie Hilfsstoffe in derselben Funktion enthalten. Demnach sind unter diesen Voraussetzungen nur in vitro-Studien zum Nachweis der Bioäquivalenz notwendig.

1.3 Pharmakologie von Lidocain-HCl

1.3.1 Begründung der Präparate-Auswahl

Um die Voraussetzungen für den Beleg der Bioäquivalenz von lokal applizierten Produkten an einem praktischen Beispiel darstellen zu können, wurde für die vorliegende Arbeit ein topisches Lidocain-Spray (Xylocain®) ausgewählt, das vergleichend mit einem generischen Test-Präparat in einem ausschließlich aus in vitro-Untersuchungen bestehenden Set-Up untersucht wird.

Die Auswahl von Lidocain erfolgte, weil es ein seit langem bekannter Wirkstoff ist, der topisch sowohl auf der Schleimhaut, als auch auf der unverletzten und verletzten Haut eingesetzt werden kann. Die Auswahl der Galenik in Form eines Sprays erfolgte, weil man davon ausgehen kann, dass die Wirkstoff-Freisetzung aus der Lösung sofort erfolgt und eine gleichmäßige Applikation gewährleistet ist.

1.3.2 Wirkung von Lidocain in der Lokalanästhesie

Die Lokalanästhesie ist eine örtliche Betäubung bzw. örtlich begrenzte Schmerzausschaltung bei Operationen oder im Rahmen von Schmerztherapien unter Anwendung von Lokalanästhetika.

Eine besondere Form der Lokalanästhesie ist die Oberflächenanästhesie, bei der das Lokalanästhetikum auf die - in der Regel unverletzte - Haut oder Schleimhaut aufgesprüht wird, in die Subcutis an die freien Nervenendigungen diffundiert und so die Schmerzweiterleitung verhindert.

Vor- und Nachteile der Oberflächenanästhesie gegenüber anderen Lokalanästhesieformen sind in Tabelle 3 dargelegt.

Tabelle 3 Vor- und Nachteile der Oberflächenanästhesie	
Vorteile:	Nachteile:
Keine Injektion erforderlich	Geringerer Wirkungsbereich
Schonende Dosierung möglich	Langsamer Wirkungseintritt
Unkomplizierte Anwendung	Unsichere Dosierung

Als Wirkstoffe für die Oberflächenanästhesie wurde zuerst 1884 von dem Österreicher Carl Koller das natürliche Kokain eingesetzt (Goerig et al., 2012), danach dann Procain als besser verträgliches Derivat entwickelt. Heute kommt in der Regel Lidocain zum Einsatz, welches 1943 entwickelt wurde und Procain in klinischen Tests überlegen ist (Holmdahl, 1998). Auch zur externen Lokalanästhesie werden heute in Deutschland fast ausschließlich lidocainhaltige Präparate angeboten, teilweise in fixer Kombination mit Prilocain (Rote Liste, 2017).

1.3.3 Präklinische Eigenschaften von Lidocain

Lidocain wurde 1943 entdeckt und war bei seiner Einführung Ende der 1940er Jahre das erste klinisch eingesetzte Lokalanästhetikum vom Amid-Typ. Lidocain gehört in der Gruppe der Lokalanästhetika zu denen mit mittlerer Stärke (relative Stärken: Procain = 1, Lidocain = 4, Tetracain = 10, Bupivacain = 16). Es inhibiert örtlich begrenzt und reversibel durch Blockade der Natriumkanalöffnung die Weiterleitung an den sensiblen Nervenfasern, bei steigender Dosierung wird zuerst die Schmerzempfindung und dann nacheinander das Empfinden von Kälte/Wärme, Berührung und Druck herabgesetzt. Die eigentliche wirksame Substanz ist das protonierte Molekül, das bei pH 7,4 zu 72% vorliegt (Ruetsch et al., 2001; Ganzberg und Kramer, 2010).

Abbildung 1 zeigt die chemische Struktur von Lidocain.

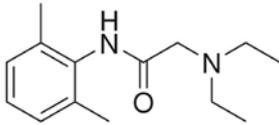


Abbildung 1 Chemische Struktur von Lidocain

Studien zur Mutagenität, Teratogenität und Kanzerogenität zeigten wenig pathologische Veränderungen, und diese auch erst beim Einsatz sehr hoher Dosierungen (ABDA Drug Dossier, 2008).

Präklinische Toxizitätstests an verschiedenen Spezies haben die in Tabelle 4 genannten mittleren letalen Dosen (LD₅₀) ergeben.

Tabelle 4 Mittlere letale Dosen von Lidocain (nach ABDA Drug Dossier, 2008)		
Spezies	Route	LD ₅₀ (mg/kg Körpergewicht)
Maus	subcutan	163
	oral	22
	intravenös	15
Ratte	subcutan	570
	intravenös	21
Meerschweinchen	intravenös	24.5
Kaninchen	intravenös	25.6

1.3.4 Klinische Eigenschaften von Lidocain

Lidocain wird topisch vor allem in der Regional-, Leitungs- und Lokalanästhesie eingesetzt, und zwar in Form von Sprays, Inhalaten, Gelen und Injektionen. Es dient zur Behandlung von Schmerzzuständen oder zur begleitenden Anästhesie bei medizinischer Behandlung oder diagnostischen Eingriffen, die mit Schmerzen verbunden sind. In der Regel erfolgt eine einmalige Anwendung, es kommen meist Gels, Cremes, Salben oder Sprays mit einem Wirkstoffgehalt von 2 - 5% zum Einsatz, Sprays auch mit Wirkstoffgehalten bis 10%. Bei der 10% Sprühlösung erfolgt die Applikation in der Form, dass bei einem Sprüh-Stoss (0,1 ml) 10mg Lidocain appliziert werden (vgl. Indikation 2-4; ABDA Drug Dossier, 2008).

Abbildung 2 zeigt beispielhaft die Dauer der Lokalanästhesie nach Applikation von 1%, 2% oder 4% Lidocainlösung in Probanden mit bronchialer Hyperreaktivität. Diese liegt bei 15-30 Minuten und steigt mit steigender Konzentration.

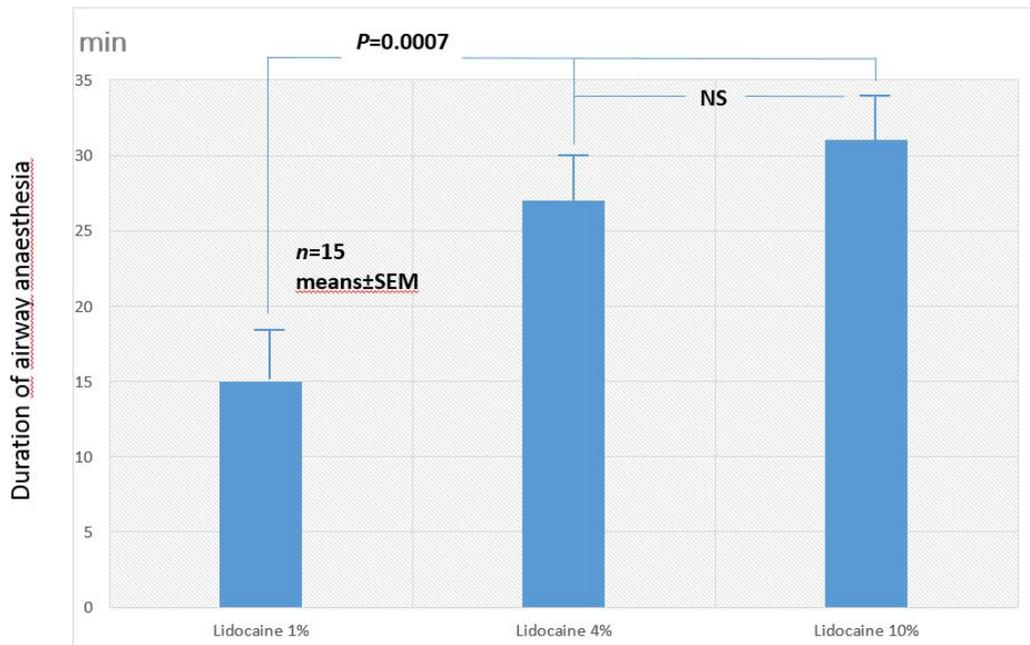


Abbildung 2 Wirkdauer von Lidocain (nach Groeben et al., 2000)

Abbildung 3 zeigt die mittlere Plasmakonzentration nach Applikation von Lidocain als topisches Endotrachealspray und zum Vergleich als intravenöse Injektion.

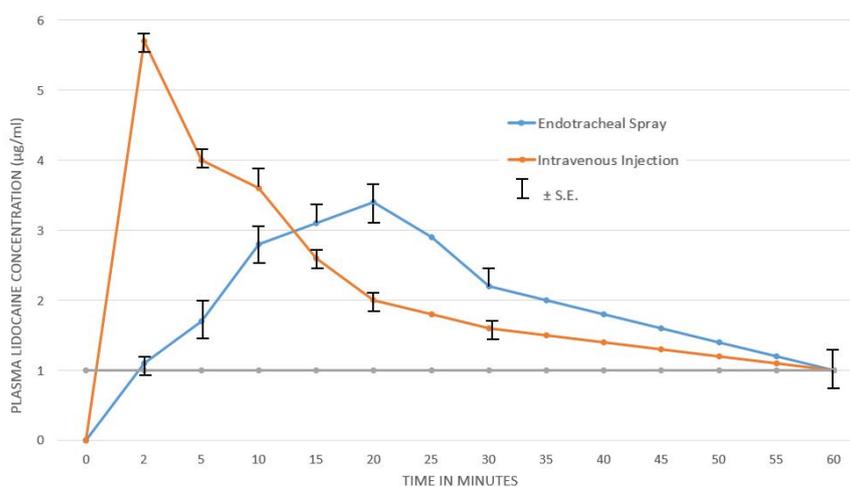


Abbildung 3 Mittlere Plasmakonzentration von Lidocain (nach Chu et al., 1975)

Da es in der vorliegenden Arbeit ausschließlich um die Untersuchung von topischen Lidocain-Präparaten geht, wird auf eine weitergehende Darstellung der

systemischen Lidocain-Wirkung verzichtet, da die systemische Aufnahme des Wirkstoffes bei topischen Präparaten zu unerwünschten Nebenwirkungen führen kann, aber nicht deren therapeutisches Ziel ist (Herkenne et al., 2008).

2 Zielstellung

Ziel der vorliegenden Arbeit ist der Nachweis der Bioäquivalenz durch in vitro-Untersuchungen am Beispiel zweier topischer Lidocain-Präparate zur Oberflächenanästhesie.

Es liegt hier – wie im Kapitel zu den regulatorischen Grundlagen beschrieben – ein Minimalfall im Sinn der regulatorischen Anforderungen vor (Shah et al., 2015):

- Kein tiefes Eindringen in die Haut bei lokaler Applikation,
- Wirkstoff lange bekannt und topisch weitgehend gut verträglich,
- Wirkstoff liegt in Lösung vor,
- Referenz- und Test-Präparat weisen eine ähnliche Formulierung auf.

Insbesondere wurden folgende Fragen formuliert:

1. In welchem Ausmaß penetriert Lidocain-Hydrochlorid in die menschliche Haut?
2. Ob und wie unterscheiden sich Prüf- und Vergleichspräparat hinsichtlich des Penetrationsverhaltens voneinander?
3. Wie ist die Haut- und Schleimhauttoxizität von topisch appliziertem Lidocain-Hydrochlorid einzuschätzen?
4. Ob und wie unterscheiden sich Prüf- und Vergleichspräparat hinsichtlich Haut- und Schleimhauttoxizität voneinander?

Um einerseits diese Fragen zu beantworten, andererseits aber unter Beachtung der regulatorischen Rahmenbedingungen die jeweils am wenigsten invasiven Tests anzuwenden, wurde zur Untersuchung der Penetration von topisch appliziertem Lidocain und zum Vergleich von Referenz- und Test-Präparat die Untersuchung in der Franz-Kammer-Zelle ausgewählt. Zur Abschätzung der lokalen Toxizität und zum Vergleich des toxischen Potentials beider untersuchten Produkte wurde die Untersuchung im HET-CAM-Test durchgeführt.

Als Zusatzaufgabe dieser Arbeit besteht die Frage, wie die Ergebnisse bei einer Eignung beider Untersuchungsmethoden für das Produkt und bei einer Übereinstimmung von Referenz- und Test-Präparat regulatorisch einzuordnen und letztendlich wirtschaftlich verwertbar sind.

3 Material und Methodik

3.1 Präparate

Als Referenzpräparat wurde das Oberflächen-Anästhetikum Xylocain® mit dem Wirkstoff Lidocain von Astra Zeneca gewählt.

Um ein möglichst ähnliches Vergleichsprodukt zu entwickeln, wurde das Referenzprodukt von einem in der Produktion von topischen Lidocain-Präparaten erfahrenen Arzneimittel- Lohnhersteller (Zellaerosol, Zell im Wiesental, Deutschland) analysiert und anschließend mit möglichst ähnlicher Zusammensetzung nachproduziert.

3.2 Penetrationsuntersuchung in der Franz´schen Diffusionszelle

3.2.1 Einleitung

Ziel dieses Testes ist die Messung der Penetration des Prüfpräparates im Vergleich zum Vergleichspräparat Xylocain® mittels Franz´scher Diffusionszelle, deren Funktionsweise in Kapitel 3.2.3 näher erläutert wird.

Als Modell für verletzte Haut bzw. Schleimhaut wird dabei exzidierte Mamma-Haut verwendet, von der das Stratum corneum mittels eines adhäsiven Films entfernt wurde.

3.2.2 Material

Geräte:

Franz´sche Diffusionszelle	Crown Glass Company Inc., Somerville, USA
Gefriermikrotom Modell 1206	Jung Frigomobil, Heidelberg, D
Kromayer Stanze Typ 1006 Biopsy Punch Ø6mm	Stiefel-Laboratorium, Offenbach, D
Pipetten	Eppendorf AG, Hamburg, D

Materialien:

Tesafilm, 2cm breit	Willy Heckmann GmbH&Co., Meerbusch-Lank, D
Wattestäbchen	NOBA Verbrauchsmittel Danz GmbH u. Co KG, Wetter, Deutschland
Gaze Sartolon Polyamid	Sartorius Stedium Biotech GmbH, Göttingen, Deutschland

Substanzen:

Lidocainhydrochlorid, LOT 13343014	Caesar & Loretz GmbH, Hilden, D
Lidocain Pumpspray-Placebo, MFD 10.09.2014	Cheplapharm Arzneimittel GmbH, Greifswald, D
Lidocain 10% Spray, Charge 071402, MFD 01.07.2014	Cheplapharm Arzneimittel GmbH, Greifswald, D
Methanol	HyPerSolv CHROMANORM VWR International, Leuven, B
Wasser, gereinigt	Wasseraufbereitungsanlage der Abteilung für experimentelle Dermatologie, Universitätsklinik und Poliklinik für Dermatologie und Venerologie, Halle (Saale), D
Xylocain® Pumpspray Charge Nr. R275 A	Astra Zeneca GmbH, Wedel, D

3.2.3 Durchführung

Die Bestimmung der perkutanen Absorption erfolgt mittels der Franz'schen Diffusionszelle bzw. Franz-Kammer (Franz, 1975). Diese besteht aus einer mit einem Akzeptormedium gefüllten Akzeptorkammer, auf der die auf Filtergaze liegende Testhaut platziert wird. Den oberen Abschluss der Franz-Kammer bildet ein Glasdeckel. Die Akzeptorkammer ist von einem Wasserbad umgeben. Dieses hat einen Wasserzu- sowie -abfluss. Weiterhin gibt es ein in die Akzeptorkammer führendes Probenentnahmerohr. Das Schema einer Franz-Kammer ist in Abbildung 4 dargestellt.

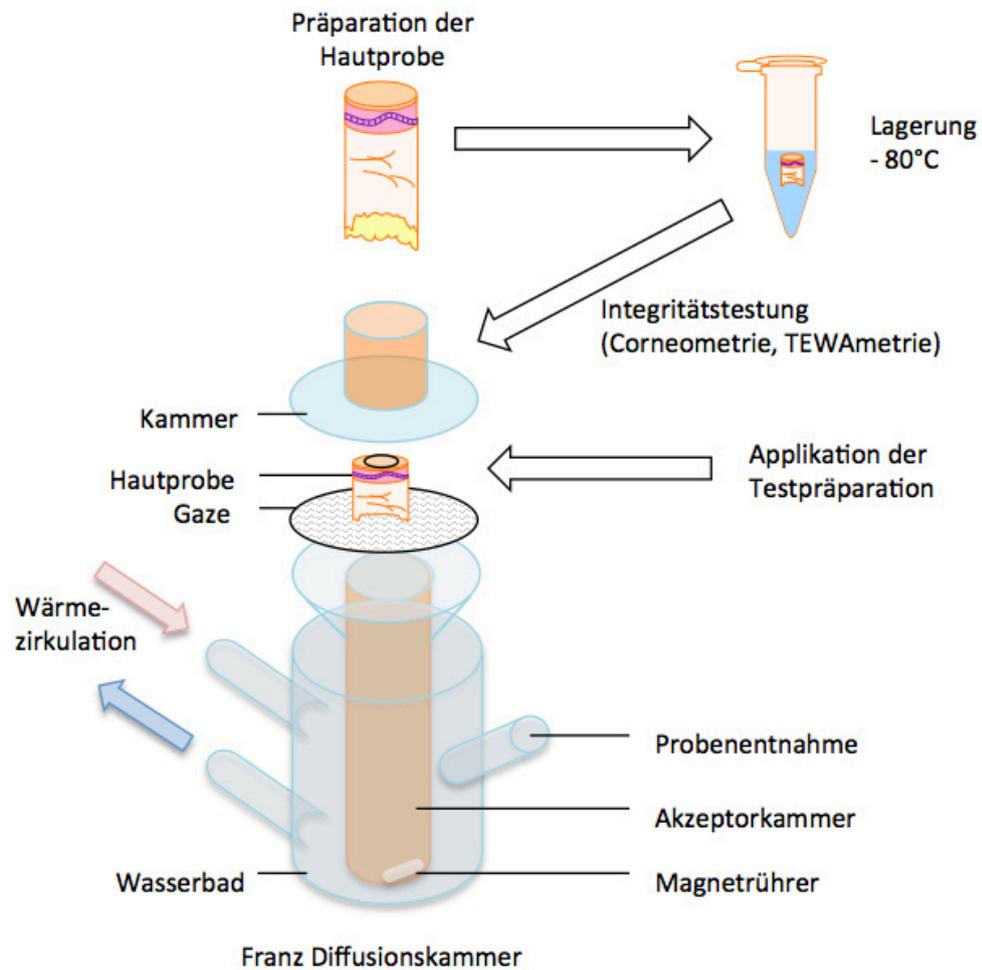


Abbildung 4 Schema einer Franz-Kammer (nach Franz, 1975)

Für die Penetrationsuntersuchungen wurde im vorliegenden Fall humane Mamma-Haut verwendet, die nach der operativen Gewinnung in einzelne kreisrunde Präparate mit einem Durchmesser von 20mm separiert und tiefgefroren worden war. Im ersten Schritt wurden die Präparate daher bei Raumtemperatur aufgetaut und die auf der Hautoberseite haftende Feuchtigkeit mit einem Wattestäbchen entfernt. Es wurden insgesamt 9 Hautpräparate für das Prüfpräparat und 9 Präparate für das Vergleichspräparat verwendet. Anschließend wurden die aufgetauten Hautpräparate 20mal mit Tesafilm „gestrippt“ und so das Stratum corneum entfernt, um verletzte Haut bzw. Schleimhaut zu simulieren. Pro Hautpräparat wurden nun 20mg des Prüf- oder des Vergleichspräparates aufgesprüht (= 1 Sprühstoß).

Das so benetzte Hautpräparat wurde nun auf eine Filtergaze gelegt, und die Gaze mit dem darauf befindlichen Präparat dann auf der Akzeptorkammer einer mit 20ml Wasser

gefüllten und auf 32°C temperierten Franz-Kammer platziert. Dabei befindet sich die Epidermis auf der von der Gaze abgewandten Seite, die Subcutis grenzt direkt an die Filtergaze. Die Gaze grenzt wiederum direkt an das Akzeptormedium.

Als Akzeptormedium wurde destilliertes Wasser verwendet, um bei der späteren Analytik per Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (high performance liquid chromatography, HPLC) eine Beeinflussung der Ergebnisse durch Salze ausschließen zu können. Es folgte nun eine Inkubationszeit, im vorliegenden Fall entweder 30, 100 oder 300 Minuten, wobei für das Prüf- und das Vergleichspräparat jeweils 3 Hautpräparate je Inkubationszeit verwendet wurden. Bei längeren Inkubationszeiten wurde regelmäßig der Stand der Akzeptorlösung überprüft und gegebenenfalls aufgefüllt.

Nach Ende der Inkubationszeit wurden die Hautproben mit einer Pinzette aus der Franz-Kammer entnommen. Die Gaze wurde ebenfalls mit einer Pinzette entnommen und in ein beschriftetes 15ml-Röhrchen überführt. Soweit vorhanden, wurde ein auf der Hautoberfläche befindlicher nicht penetrierter Anteil des Lidocain mit einem Wattestäbchen abgenommen und der Kopf des Wattestäbchens ebenfalls in ein beschriftetes 15ml-Röhrchen überführt. Die gesamte Akzeptorlösung wurde mit Hilfe einer Pipette in ein gekennzeichnetes 20ml Röhrchen überführt.

Aus jedem Hautstück wurden mit Hilfe von 6mm Hautbiopsie-Stanzen 3 Stanzen entnommen und in eine Petrischale überführt, sodass sich bei 3 Hautproben pro Präparat und Inkubationszeit $3 \times 3 = 9$ Stanzen ergaben.

Diese Stanzen wurden nun am Gefriermikrotom geschnitten. Dabei diente destilliertes Wasser als Eindeckmittel. Der Schnitt erfolgte so genau wie möglich parallel zur Hautoberfläche und horizontal zur Epidermis. Es wurden 4 Schnitte à 20µm (entsprechend der Epidermis ohne das durch Strippen entfernte Stratum corneum), und dann nochmal fünf mal 5 Schnitte à 40µm (entsprechend Dermis Teil 1-5) angefertigt. Die Schnitte sowie der verbleibende Stumpf wurden in entsprechend gekennzeichnete Röhrchen überführt und bis zur Analyse tiefgefroren gelagert. Abbildung 5 gibt eine graphische Übersicht über die Durchführung des Penetrationsversuches.

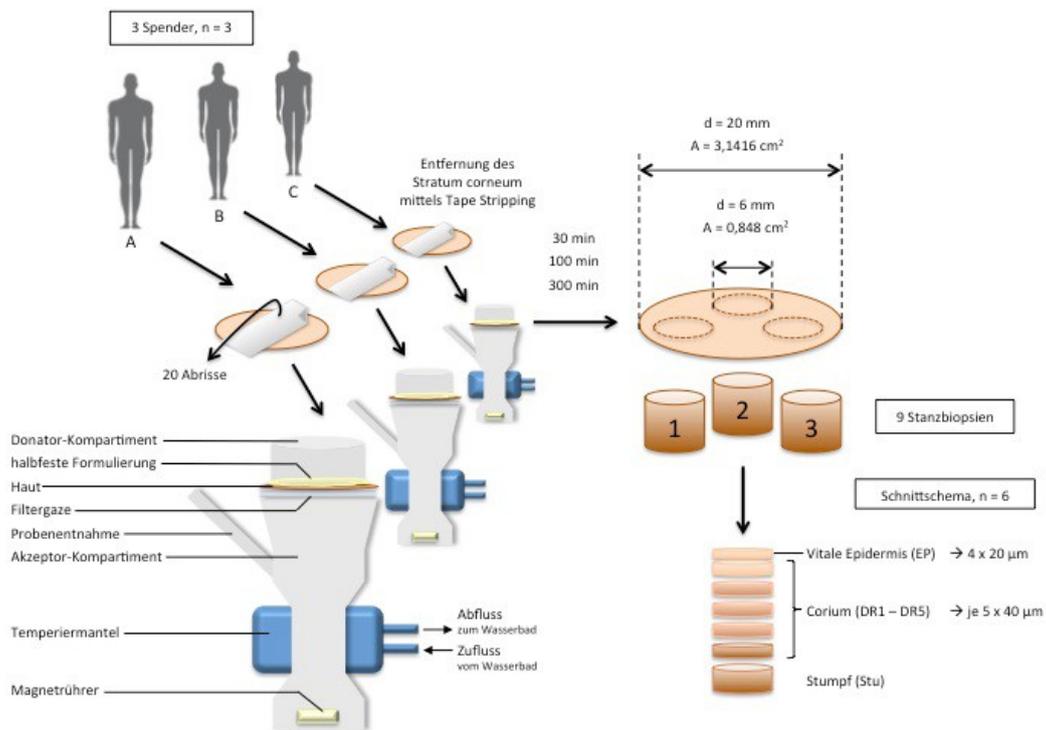


Abbildung 5 Übersicht über den Ablauf der Penetrationsprüfung (Wohlrab und Sommer, 2015)

3.2.4 Auswertungs-Prozess

Die jeweiligen Proben wurden durch das An-Institut für angewandte Dermatopharmazie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg e.V. mittels HPLC analysiert. Dabei wurde eine validierte Methodik zur Aufarbeitung und Analyse der Proben angewendet. Die dabei zugrundegelegten Qualitätsstandards entsprechen anerkannten Vorschriften (European Medicines Agency, 2011; Organisation for Economic Co-operation and Development, 2004a, 2004b)

3.3 HET-CAM-Untersuchung zur Schleimhauttoxizität

3.3.1 Einleitung

Ziel dieses Testes ist die Ermittlung toxischer Wirkungen des Prüfpräparates und des Vergleichspräparates Xylocain® mittels der Hühnerei-Test – Chorion-Allantois-Membran – Methode (HET-CAM). Dies ist ein in den 1980er Jahren von Lüpke entwickeltes Verfahren zur Abschätzung der Haut- bzw. Schleimhauttoxizität von Substanzen (Lüpke, 1985). In diesem Test werden Substanzen an Hühnereiern hinsichtlich ihres toxischen Potentials untersucht und daraus Annahmen hinsichtlich der Haut- und Schleimhauttoxizität abgeleitet. Die zu testenden Substanzen werden dabei auf die von Blutgefäßen durchzogene Aderhaut des Hühnereis, der sogenannten Chorion-Allantois-Membran, aufgetragen. Chorion und Allantois gehören zu den Fruchthüllen, die bei Wirbeltieren den Embryo umgeben, zahlreiche Blutgefäße enthalten und als Respirationsorgan dienen (Fáncsi und Fehér, 1979). Sind nach Auftragen einer Testsubstanz auf die Chorion-Allantois-Membran in den Gefäßen Hämorrhagien, Gefäßlysen oder Koagulationen zu beobachten, deutet dies auf toxische Wirkungen der Substanz hin.

3.3.2 Material

Geräte:

Brutschrank INCO 2	Memmert GmbH, Schwalbach, D
Fotoapparat Canon PC 1234	Canon, Tokio, JP
Laser-Fluxmetriegerät	Moor Instruments Ltd., Millwey, England,

Materialien:

Natürlich befruchtete Hühnereier, Rasse „New Hampshire“	Bereitstellung am Legetag durch das Nutztierwissenschaftliche Zentrum der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle, D
Gebogene und gerade Pinzette	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, D
Präparationsnadel	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, D

Substanzen:

Lidocain 10% Spray, Charge 071402, MFD 01.07.2014	Cheplapharm Arzneimittel GmbH, Greifswald, D
Xylocain® Pumpspray, Charge Nr. R275 A	Astra Zeneca GmbH, Wedel, D
1% Natriumlaurylsulfat	Hergestellt aus Originalsubstanzen der Firma Merck A/S, Hellerup, DK
0,9% isotonische NaCl	Braun, Melsungen, D

3.3.3 Durchführung

Zur Sicherstellung gleichbleibender Testbedingungen erfolgte die Durchführung in klimatisierten Räumen mit konstanten Temperaturbedingungen.

Die natürlich befruchteten Hühnereier wurden 7 Tage lang bebrütet. Der HET-CAM-Test wird generell an Eiern vor dem Ende des 10. Bebrütungstags durchgeführt, um zu gewährleisten, dass der Hühnerembryo noch keine nervale Innervation aufweist.

Nach Ablauf dieser Brutzeit wurden die Eier aus dem Brutschrank entnommen. Mittels einer lichtstarken Lampe wurden die Eipole durchleuchtet und die Luftkammer lokalisiert. Im Bereich der Luftkammer wurde ein Loch mit einem Durchmesser von etwa 1,5 cm in den konvexen Pol des Eis geschnitten.

Es wurde zunächst überprüft, ob die Befruchtung erfolgreich war. Nicht befruchtete Eier wurden verworfen. Die Eihaut der befruchteten Eier wurde mit 37°C warmer physiologischer Kochsalzlösung befeuchtet. Anschließend folgte eine 20-30 Minuten lange Ruhezeit im Brutschrank.

Durch anschließende vorsichtige Präparation mit sterilem mikrochirurgischem Besteck (gerade und gebogene Pinzette, Präparationsnadel) erfolgte dann die Entfernung der äußeren Eihaut und die Freilegung der Chorion-Allantois-Membran.

Schließlich wurden je 300 µl jeder Testsubstanz auf die Chorion-Allantois-Membran von jeweils 12 Eiern appliziert.

Getestet wurden:

- Prüfpräparat
- Xylocain®-Spray
- Steriles Wasser als Negativkontrolle
- 1% Natriumlaurylsulfat (SLS) als Positivkontrolle

Nach Applikation der Testsubstanz wurde das Gefäßsystem der Chorion-Allantois-Membran im Hinblick auf irritative Effekte bewertet. Sodann erfolgte eine Auswertung über 5 Minuten (300 Sekunden) nach Applikation einerseits durch Beurteilung visuell erfassbarer Veränderungen und andererseits mittels Laser-Fluxmetrie. Beide Auswertungsmethoden werden im Folgenden erläutert.

3.3.4 Auswertungs-Prozess

3.3.4.1 Auswertung visuell erfassbarer Veränderungen

Hierbei erfolgte zunächst eine Beobachtung der Eier über 5 Minuten (300 Sekunden) nach Applikation und eine Bewertung sichtbarer Veränderungen an der Chorion-Allantois-Membran hinsichtlich des Schweregrades sowie des Zeitpunktes des Auftretens. Zur Dokumentation wurden die Eier im geöffneten Bereich vor Applikation der jeweiligen Präparation sowie nach 300 Sekunden in standardisierter Entfernung fotografiert (siehe Anlage 3).

Folgende Kategorien sichtbarer Veränderungen wurden beobachtet:

- Auftreten von Hämorrhagien (H). Die Extravasation von Erythrozyten aus den Gefäßen wurde als Hämorrhagie bewertet.
- Gefäßlyse (L). Das Transparentwerden von Gefäßwänden wurde als Gefäßlyse bewertet.
- Koagulation (C). Das Stagnieren des Blutflusses und Zeichen intravasaler Gerinnung wurden als Koagulation gewertet.

Bezüglich des Schweregrades wurden folgende Grade unterschieden:

0 = keine Reaktion

1 = leichte Reaktion

2 = mäßige Reaktion

3 = starke Reaktion

Tabelle 5 enthält eine Übersicht über die halbquantitative Zuordnung der beobachteten Veränderungen in den Bereichen Hämorrhagie, Lyse und Koagulation zu den Schweregraden:

Tabelle 5 Schweregrade				
	Grad 0	Grad 1	Grad 2	Grad 3
Hämorrhagie (H)	Keine sichtbaren Kapillarblutungen, morphologisch intakte Kapillaren	Einzelne Kapillarblutungen bei morphologisch intakten Kapillaren	Multiple Kapillarblutungen bei morphologisch intakten Kapillaren	Morphologisch geschädigte Kapillaren
Lyse (L)	Keine transparenten Kapillarabschnitte	Vereinzelte transparente Kapillarabschnitte	Transparenz ganzer Kapillaren	Komplette Gefäßlysen
Koagulation (C)	Keine Kapillarthrombosen, morphologisch intakte Kapillaren	Einzelne Kapillarthrombosen bei morphologisch intakten Kapillaren	Multiple Kapillarthrombosen bei morphologisch intakten Kapillaren	Geschädigte Kapillaren mit langstreckigen Kapillarthrombosen

Die Ergebnisse wurden dabei in einem Irritationsscore (IS) nach folgender Formel zusammengefasst:

$$IS = \frac{(301 - \text{sekH})}{300} * 5 + \frac{(301 - \text{sekL})}{300} * 7 + \frac{(301 - \text{sekC})}{300} * 9$$

IS = Irritationsscore

sek = Sekunden bis Beginn des Ereignisses

H = Hamorrhagie

L = Lyse

C = Koagulation

3.3.4.2 Auswertung mittels Laser-Doppler-Fluxmetrie

Weiterhin wurde zur Validerung der Perfusion der Laser-Doppler-Flux mittels Laser-Doppler-Fluxmetrie in bestimmten Zeitintervallen ebenfalls über insgesamt 5 Minuten (300 Sekunden) nach Applikation bestimmt. Hierbei wurde die Chorion-Allantois-Membran mit monochromatischem, niedrigenergetischem Laserlicht-Signalen (Helium-Neon Laser mit 632,8nm - rot) beleuchtet.

Das gesendete Laser-Licht wird dann bei Kollision mit bewegten und unbewegten Strukturen reflektiert. Während bei Kollision mit unbewegten Strukturen die Wellenlänge gleich bleibt, erfolgt bei Kollision mit bewegten Strukturen (zum Beispiel Erythrozyten) eine proportional zur Geschwindigkeit der bewegten Struktur verschobene Änderung der Wellenlänge. Diese Änderung wird durch das Laser-Fluxmetriegerät wahrgenommen, und durch einen Mikroprozessor werden die Signale so berechnet, dass sie eine entsprechend des zeitlichen Verlaufs orientierte Amplitude ergeben, die direkt proportional zur Blutperfusion (Flux) innerhalb der Blutgefäße der Chorion-Allantois-

Membran ist. Somit lässt sich aus der Änderung der Wellenlänge die Anzahl der Erythrozyten ermitteln, die innerhalb eines bestimmten Zeitraumes durch das beleuchtete Blutgefäß ziehen.

Um die Beeinflussung durch verschiedene Faktoren des Gerätes selbst sowie des beleuchteten Gewebes (Volumen, Verteilung des lokalen Blutflusses, Gefäßanzahl) zu antizipieren, wird zunächst ein sogenannter Baseline-Wert ermittelt, d.h. es wird der Laser-Fluxmetriewert vor Beginn des Einflussfaktors (hier also vor Applikation des Lidocain Sprays) ermittelt. Die nach Beginn des Einflussfaktors ermittelten Werte werden dann jeweils in Form eines Indexes in Verhältnis zum Baseline-Wert gesetzt. Ein Indexwert von 1 heißt also, dass sich der per Laser-Fluxmetrie ermittelte Wert nach Beginn des Einflussfaktors nicht gegenüber dem Baseline-Wert verändert hat, der Einflussfaktor also keinen Einfluss auf die Durchblutung hatte.

Liegt der Indexwert unter 1, so hat sich die Durchblutung reduziert, liegt er über 1, so hat sich die Durchblutung durch den Einflussfaktor gesteigert.

4 Ergebnisse

4.1 Penetration von Lidocain in der Franz'schen Diffusionszelle

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Penetrationsuntersuchung dargestellt.

Tabelle 6 zeigt die Mittelwerte für die prozentualen Anteile des in den einzelnen Probenarten (Tupfer, Hautproben, Gaze, Akzeptor) gefundenen Lidocains im Verhältnis zur Gesamtdosis. So finden sich bei Prüf- und Referenzpräparat nach 30 Minuten 53% des applizierten Lidocains im Tupfer wieder, nach 100 Minuten noch 44% (Prüfpräparat) bzw. 55% (Referenzpräparat) und nach 300 Minuten 13%.

Abbildung 6 zeigt die in Tabelle 6 dargestellten Ergebnisse als graphische Penetrationsprofile für Prüf- und Referenzpräparat für die jeweiligen Inkubationszeiten sowie zusätzlich für jede Inkubationszeit das Differenzprofil zwischen Prüf- und Referenzpräparat.

Tabelle 6 und Abbildung 6 zeigen, dass bei kürzerer Inkubationszeit noch ein relativ hoher Lidocain-Anteil im Tupfer vorliegt, und dieser mit zunehmender Inkubationszeit sinkt. Gleichzeitig steigen die Lidocain-Anteile in den Zellkompartimenten Dermis und Stumpf mit zunehmender Inkubationszeit an.

Der durch die Haut permeierte Anteil des Lidocains (d.h. der Lidocain-Anteil in Akzeptor und Gaze) ist nach 30 Minuten mit ca. 2% sehr gering und steigt auch bei längeren Inkubationszeiten lediglich auf ca. 5% an.

Die Differenzprofile zeigen, dass sich die Penetrationsprofile von Prüf- und Referenzpräparat nur geringfügig unterscheiden. Bis auf eine Ausnahme (Tupfer nach 300 Minuten) sind die Unterschiede geringer als 15%.

Tabelle 7 zeigt die Wiederfindungsraten, also den Anteil von Lidocain der in sämtlichen Prüfmustern (Tupfer bis Akzeptormedium) gefunden wurde im Verhältnis zur applizierten Menge.

Es zeigen sich generell hohe Wiederfindungsraten, mit Ausnahme des Prüfpräparates nach einer Inkubationszeit von 300 Minuten.

Tabelle 6 Mittlerer Anteil an Lidocain für Prüf- und Referenzpräparat

% der applizierten Dosis	Prüfpräparat						Referenzpräparat					
	30 min		100 min		300 min		30 min		100 min		300 min	
	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD
Tupfer	52,61	7,79	43,78	24,50	12,77	6,60	52,91	5,86	55,03	7,73	43,42	13,22
Epidermis	16,55	3,64	13,44	4,40	16,32	8,01	16,03	7,36	11,91	4,07	12,76	5,17
Dermis 1	13,99	5,16	12,47	10,38	16,46	5,35	8,08	4,42	12,99	4,89	10,89	4,70
Dermis 2	3,72	1,24	7,71	7,62	7,13	2,74	4,62	2,06	6,17	2,98	6,19	1,47
Dermis 3	2,48	1,05	6,14	5,87	6,10	1,63	2,83	1,15	4,21	1,80	4,60	1,94
Dermis 4	1,56	0,54	3,51	2,67	4,82	1,45	1,83	0,58	3,35	1,67	2,89	0,87
Dermis 5	0,92	0,48	2,43	1,72	3,69	1,08	1,30	0,63	2,37	1,37	2,58	1,52
Dermis (Summe)	22,67	6,45	32,25	26,62	38,21	10,43	18,66	7,66	29,09	10,62	27,14	6,82
Stumpf	4,16	2,21	7,95	4,13	10,83	1,92	3,22	1,54	10,37	4,48	11,11	4,45
Gaze	1,80	0,80	1,39	1,08	2,95	0,24	1,53	0,49	0,73	0,65	2,45	1,93
Akzeptor	0,26	0,01	0,35	0,15	2,56	1,43	0,27	0,14	1,39	0,26	3,46	2,39

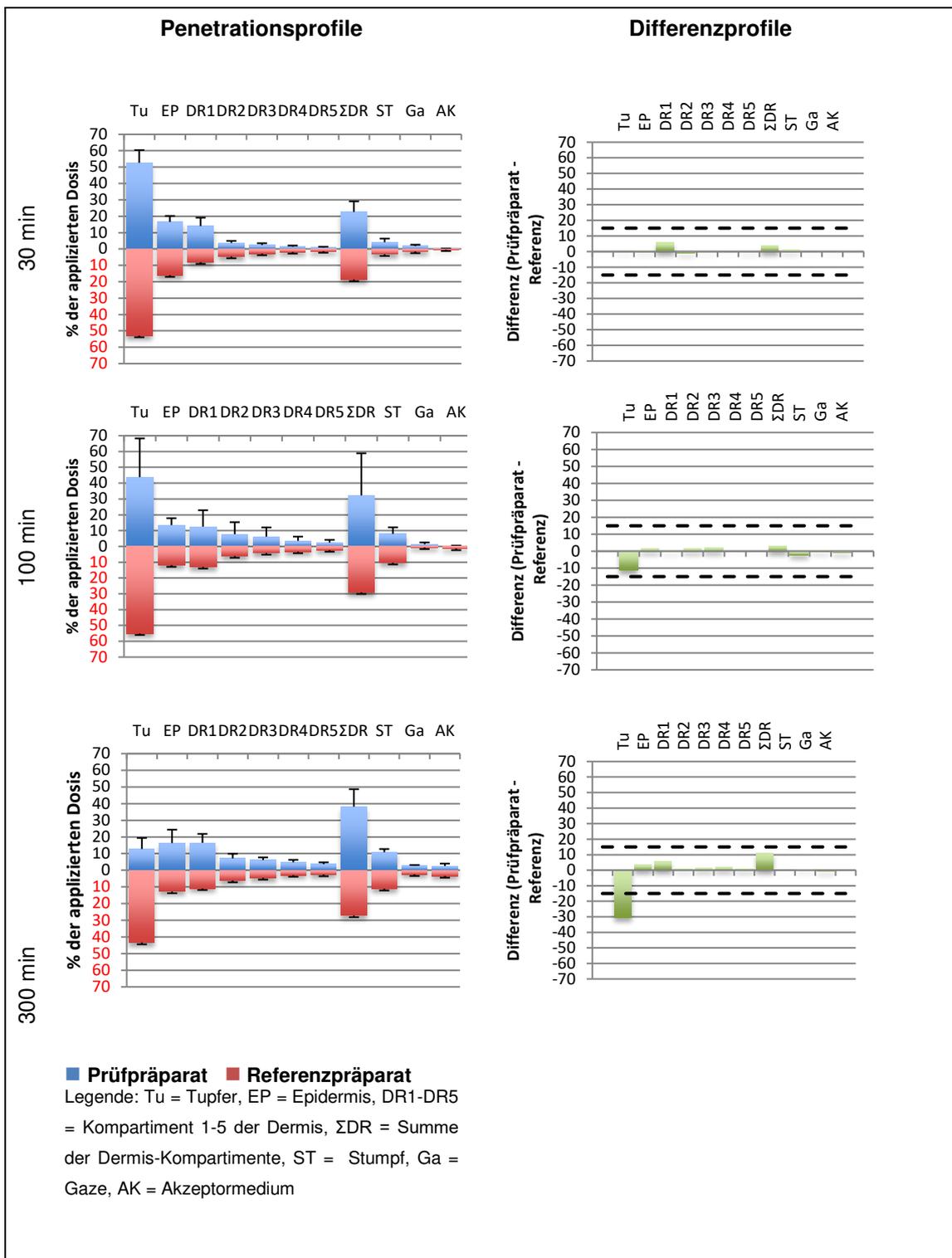


Abbildung 6 Penetrationsprofile für Prüf- und Referenzpräparat

Tabelle 7 Wiederfindungsraten		
	Prüfpräparat	Referenzpräparat
30 min	98,06 ± 4,64	92,61 ± 14,63
100 min	99,16 ± 13,62	108,53 ± 18,47
300 min	83,64 ± 14,24	100,35 ± 12,20

Abbildung 7 zeigt eine Übersicht über die Tiefenprofile für die verschiedenen Inkubationszeiten, also den Lidocain-Gehalt als Anteil der applizierten Dosis in Abhängigkeit von der Hauttiefe.

Wie schon in den Penetrationsprofilen zeigt sich, dass der Lidocaingehalt mit zunehmender Hauttiefe abnimmt. Während nach 30 Minuten Inkubationszeit ein deutliches Konzentrationsgefälle mit höherem Lidocaingehalt in oberflächlicheren Hautschichten und niedrigerem Gehalt in tieferen Schichten zu sehen ist, gleicht sich der Lidocaingehalt in den einzelnen Hautschichten mit zunehmender Inkubationszeit an. Vor allem in den oberen Hautschichten zeigt sich zudem eine starke Schwankung der Ergebnisse.

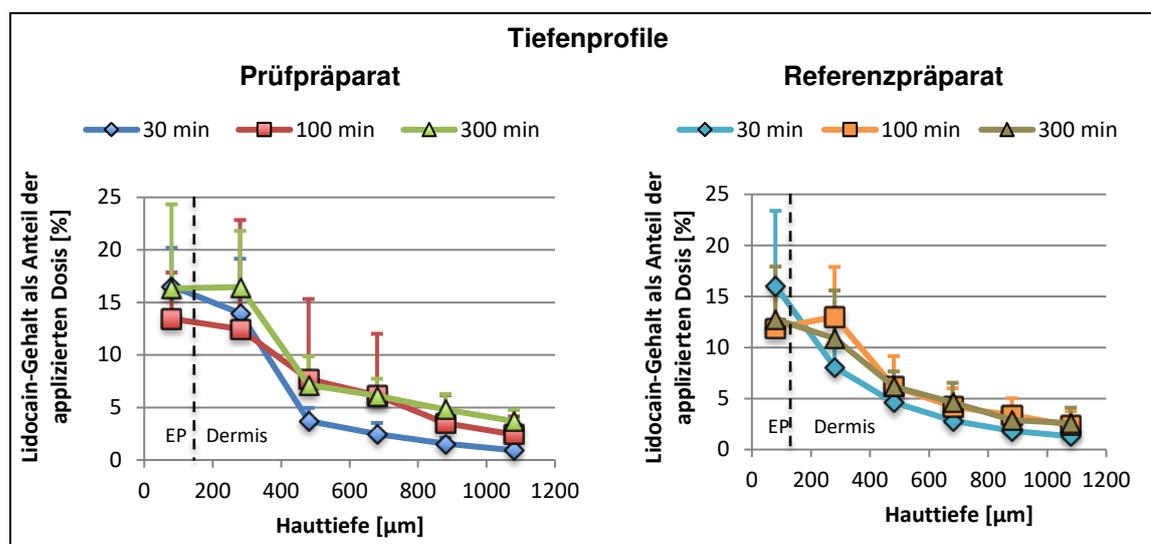


Abbildung 7 Übersicht über die Tiefenprofile

Die Einzelbetrachtung der Stanzen (Abbildung 8) zeigt, dass die Grundlage hierfür sowohl Schwankungen zwischen den einzelnen Hautpräparaten (A, B, C) als auch zwischen den einzelnen Stanzen eines Präparates (1, 2, 3) sind.

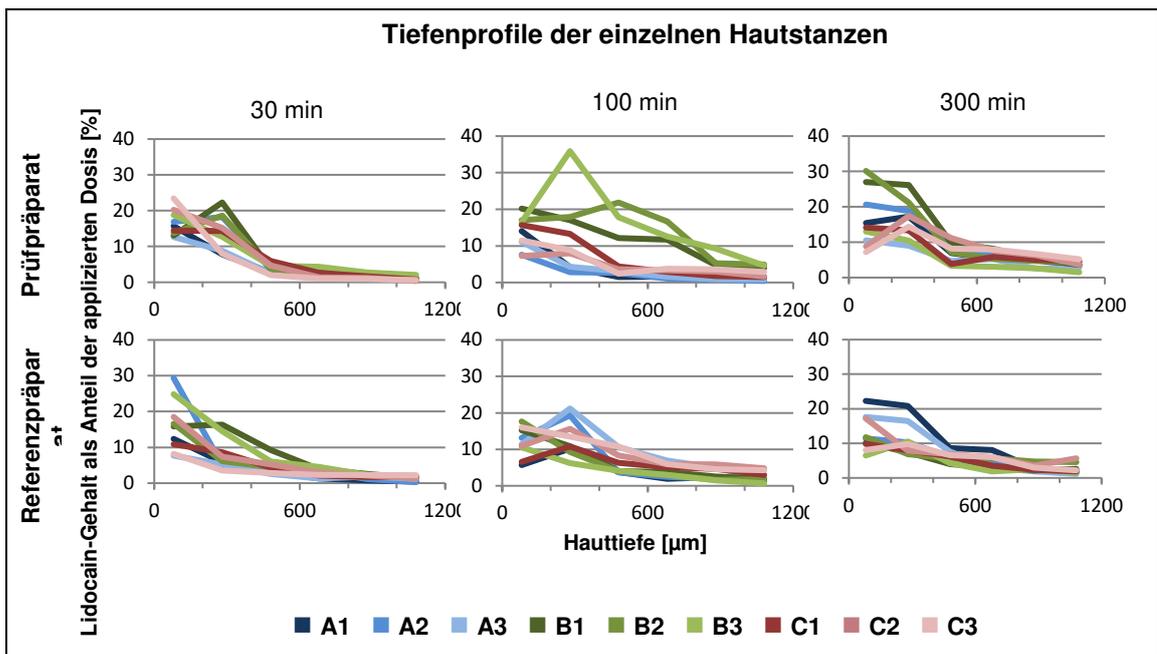


Abbildung 8 Einzelbetrachtung der Tiefenprofile

Abbildung 9 zeigt die aus den Tiefenprofilen im Bereich der Dermis ermittelten Area under curves (AUC) für Prüf- und Referenzpräparat. Auch hier ergeben sich sehr ähnliche Werte für Inkubationszeiten von 30 und 100 Minuten und ein größerer Unterschied für eine Inkubationszeit von 300 Minuten.

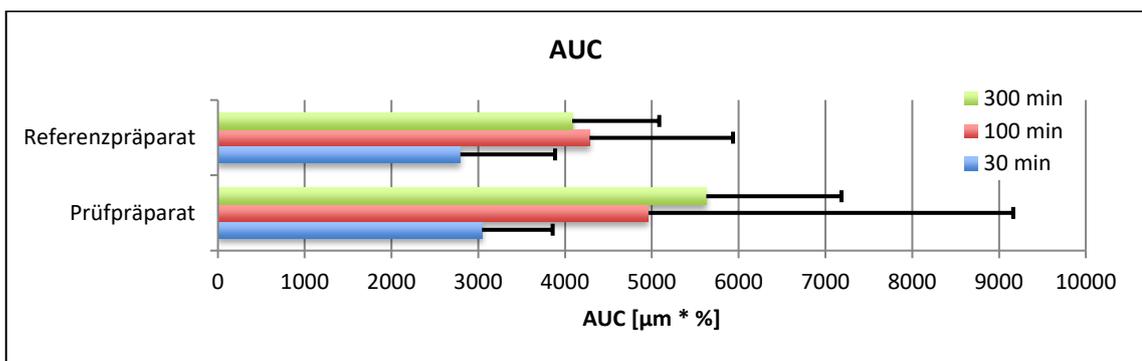


Abbildung 9 Mittelwerte der AUC

Bezieht man die unterschiedliche Dicke der Hautschnitte mit ein, ergibt sich das in Tabelle 8 und Abbildung 10 dargestellte Tiefenprofil in molarer Darstellung. Die daraus ermittelten AUC-Werte sind in Abbildung 11 dargestellt.

Wie bei der vorhergehenden prozentualen Betrachtung ist die Lidocain-Konzentration in der Epidermis am größten und nimmt in den tieferen Hautschichten ab.

Für die AUC zeigen sich dieselben Schwankungen wie in der prozentualen Darstellung.

Tabelle 8 Mittlerer Anteil an Lidocain für Prüf- und Referenzpräparat in molarer Darstellung

Lidocain-Konzentration [µM]	Prüfpräparat						Referenzpräparat					
	30 min		100 min		300 min		30 min		100 min		300 min	
Hauttiefe [µm]	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD
80	57053	12548	45639	14949	55430	27211	54691	25123	40861	13948	43551	17632
280	19295	7114	16936	14096	22361	7261	11032	6039	17828	6713	14861	6411
480	5125	1715	10469	10345	9691	3718	6304	2816	8467	4092	8445	2002
680	3416	1446	8342	7976	8286	2215	3857	1563	5773	2466	6278	2649
880	2150	742	4763	3625	6549	1968	2500	788	4591	2291	3946	1185
1080	1270	664	3300	2336	5016	1465	1778	858	3249	1885	3524	2073

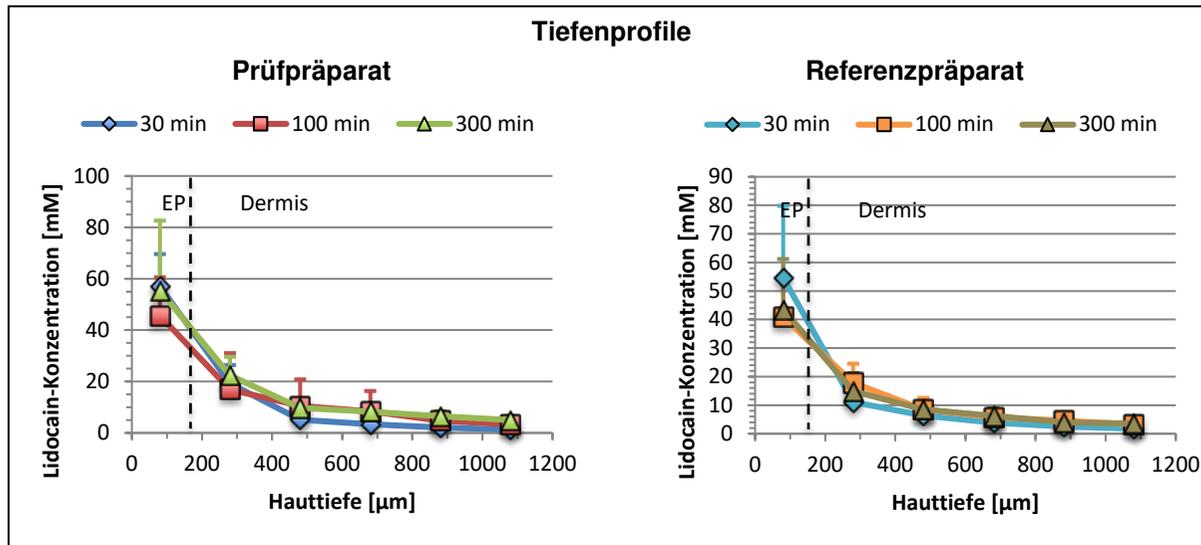


Abbildung 10 Tiefenprofile in molarer Darstellung

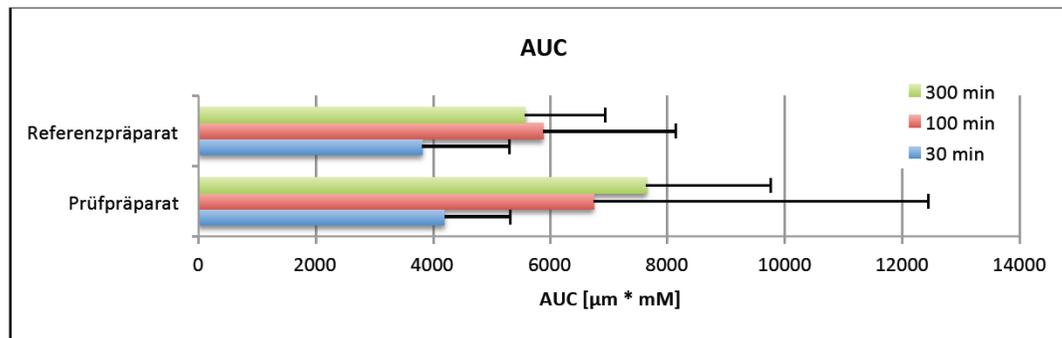


Abbildung 11 Mittelwerte der AUC in molarer Darstellung

4.2 Schleimhauttoxizität von Lidocain in der HET-CAM-Untersuchung

4.2.1 Ergebnisse der visuellen Auswertung

Die folgenden Tabellen zeigen die Ergebnisse der in Kapitel 3.3.4.1 beschriebenen Beurteilung visuell erfassbarer Veränderungen an der Chorion-Allantois-Membran.

Die Tabellen 9 - 12 zeigen die Zeit bis Ereignisbeginn der beobachteten Parameter Hämorrhagie, Lyse und Koagulation und den daraus ermittelten Irritationsscore der einzelnen Bereiche sowie den Gesamt-Irritationsscore. Zunächst werden die Ergebnisse des Referenzpräparates (Tabelle 9) sowie des Prüfpräparates (Tabelle 10) dargestellt. Anschließend werden zum Vergleich die Ergebnisse der Positivkontrolle 1% Natriumlaurylsulfat (Tabelle 11) sowie der Negativkontrolle Aqua dest. (Tabelle 12) dargestellt.

Die Tabellen 13 - 16 zeigen die Ergebnisse der Beurteilung des Schweregrades der beobachteten Parameter Hämorrhagie, Lyse und Koagulation nach 300 Sekunden für das Referenzpräparat (Tabelle 13), das Prüfpräparat (Tabelle 14), 1% Natriumlaurylsulfat (Tabelle 15) und Aqua dest. (Tabelle 16).

Tabelle 17 gibt eine gesamthafte Übersicht über die Ergebnisse der visuellen Auswertung sowie eine daraus abgeleitete Einschätzung zum irritativen Potential der 4 verwendeten Substanzen.

Die bildhafte Darstellung der Hühnereier jeweils vor Applikation und nach Applikation von Xylocain® beziehungsweise Prüfpräparat erfolgt in Abbildung 12 respektive 13.

Die Positivkontrolle 1% Natriumlaurylsulfat zeigte hohe Mittelwerte im Bereich des Irritationsscores und hinsichtlich des Schweregrades visuell erfassbarer Veränderungen. Die Negativkontrolle Aqua dest. hingegen führte zu keinerlei sichtbaren Veränderungen. Hinsichtlich eines Vergleiches von Referenz- und Prüfpräparat zeigt sich, dass beide keine sichtbaren Veränderungen im Bereich Gefäßlyse hervorrufen, jedoch Hämorrhagien und Koagulationen sichtbar wurden. Hämorrhagien traten dabei beim Referenzpräparat früher auf und waren stärker ausgeprägt als beim Prüfpräparat. Koagulationen traten bei beiden Präparaten bei ähnlich vielen Eiern, ähnlich schnell und mit ähnlichem Schweregrad auf, mit leicht höheren Werten beim Prüfpräparat. Insgesamt zeigten beide Präparate ein mäßiges irritatives Potential.

Ei Nr	Sekunden bis Ereignisbeginn			Irritationsscore			
	Hämorrhagie	Lyse	Koagulation	Hämorrhagie	Lyse	Koagulation	Gesamt
1	91	0	162	3,50	0	4,17	7,67
2	89	0	76	3,53	0	6,75	10,28
3	0	0	0	0	0	0	0
4	121	0	217	3,00	0	2,52	5,52
5	157	0	0	2,4	0	0	2,40
6	91	0	0	3,50	0	0	3,50
7	24	0	0	4,62	0	0	4,62
8	71	0	165	3,83	0	4,08	7,91
9	44	0	0	4,28	0	0	4,28
10	96	0	0	3,42	0	0	3,42
11	71	0	0	3,83	0	0	3,83
12	57	0	0	4,07	0	0	4,07
Mittelwert	-	-	-	3,33	0	1,46	4,79

Ei Nr	Sekunden bis Ereignisbeginn			Irritationsscore			
	Hämorrhagie	Lyse	Koagulation	Hämorrhagie	Lyse	Koagulation	Gesamt
1	0	0	0	0	0	0	0
2	242	0	0	0,98	0	0	0,98
3	132	0	0	2,82	0	0	2,82
4	231	0	0	1,17	0	0	1,17
5	92	0	0	3,48	0	0	3,48
6	177	0	212	2,07	0	2,67	4,74
7	217	0	82	1,40	0	6,57	7,97
8	192	0	0	1,82	0	0	1,82
9	0	0	157	0	0	4,32	4,32
10	72	0	0	3,82	0	0	3,82
11	84	0	218	3,62	0	2,49	6,11
12	142	0	201	2,65	0	3,00	5,65
Mittelwert	-	-	-	1,98	0	1,59	3,57

Tabelle 11 Irritationsscore 1% Natriumlaurylsulfat							
Ei Nr	Sekunden bis Ereignisbeginn			Irritationsscore			
	Hämorrhagie	Lyse	Koagulation	Hämorrhagie	Lyse	Koagulation	Gesamt
1	229	0	10	1,2	0	8,73	9,93
2	77	0	125	3,73	0	5,28	9,01
3	57	0	13	4,07	0	8,64	12,71
4	19	192	163	4,7	2,54	4,14	11,38
5	24	217	109	4,62	1,96	5,76	12,34
6	281	0	28	0,33	0	8,19	8,52
7	177	0	34	2,07	0	8,01	10,08
8	18	0	123	4,72	0	5,34	10,06
9	0	0	11	0	0	8,70	8,70
10	176	221	53	2,08	1,87	7,44	11,39
11	27	0	32	4,57	0	8,07	12,64
12	34	0	19	4,45	0	8,46	12,91
Mittelwert	-	-	-	3,04	0,53	7,23	10,81

Tabelle 12 Irritationsscore Aqua dest.							
Ei Nr	Sekunden bis Ereignisbeginn			Irritationsscore			
	Hämorrhagie	Lyse	Koagulation	Hämorrhagie	Lyse	Koagulation	Gesamt
1	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0	0
9	0	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0	0
11	0	0	0	0	0	0	0
12	0	0	0	0	0	0	0
Mittelwert	-	-	-	0	0	0	0

Tabelle 13 Schweregrad Xylocain®			
Ei Nr	Schweregrad nach 300 Sekunden		
	Hämorrhagie	Lyse	Koagulation
1	2	0	1
2	3	0	2
3	0	0	0
4	2	0	1
5	1	0	0
6	1	0	0
7	1	0	0
8	2	0	1
9	1	0	0
10	2	0	0
11	2	0	0
12	1	0	0
Mittelwert	1,5	0	0,4

Tabelle 14 Schweregrad Prüfpräparat			
Ei Nr	Schweregrad nach 300 Sekunden		
	Hämorrhagie	Lyse	Koagulation
1	1	0	0
2	1	0	0
3	0	0	0
4	0	0	0
5	0	0	0
6	0	0	1
7	0	0	1
8	0	0	0
9	0	0	2
10	0	0	0
11	0	0	1
12	0	0	1
Mittelwert	0,2	0	0,5

Tabelle 15 Schweregrad 1% Natriumlaurylsulfat			
Ei Nr	Schweregrad nach 300 Sekunden		
	Hämorrhagie	Lyse	Koagulation
1	1	0	3
2	1	0	2
3	2	0	3
4	2	1	2
5	2	1	3
6	1	0	3
7	2	0	3
8	2	0	3
9	0	0	3
10	1	1	3
11	2	0	3
12	2	0	3
Mittelwert	1,5	0,3	2,8

Tabelle 16 Schweregrad Aqua dest.			
Ei Nr	Schweregrad nach 300 Sekunden		
	Hämorrhagie	Lyse	Koagulation
1	0	0	0
2	0	0	0
3	0	0	0
4	0	0	0
5	0	0	0
6	0	0	0
7	0	0	0
8	0	0	0
9	0	0	0
10	0	0	0
11	0	0	0
12	0	0	0
Mittelwert	0	0	0

Tabelle 17 Zusammenfassung der Ergebnisse der visuellen Beurteilung				
	<i>Xylocain®</i>	<i>Prüfpräparat</i>	<i>1% SLS</i>	<i>Aqua dest.</i>
<i>Irritationsscore Hämorrhagie</i>	3,33	1,98	3,04	0
<i>Irritationsscore Lyse</i>	0	0	0,53	0
<i>Irritationsscore Koagulation</i>	1,46	1,59	7,23	0
<i>Irritationsscore Gesamt</i>	4,79	3,57	10,81	0
<i>Schweregrad Hämorrhagie</i>	1,50	0,17	1,50	0
<i>Schweregrad Lyse</i>	0	0	0,25	0
<i>Schweregrad Koagulation</i>	0,42	0,50	2,83	0
<i>Irritatives Potential</i>	<i>mäßig</i>	<i>mäßig</i>	<i>stark</i>	<i>kein</i>

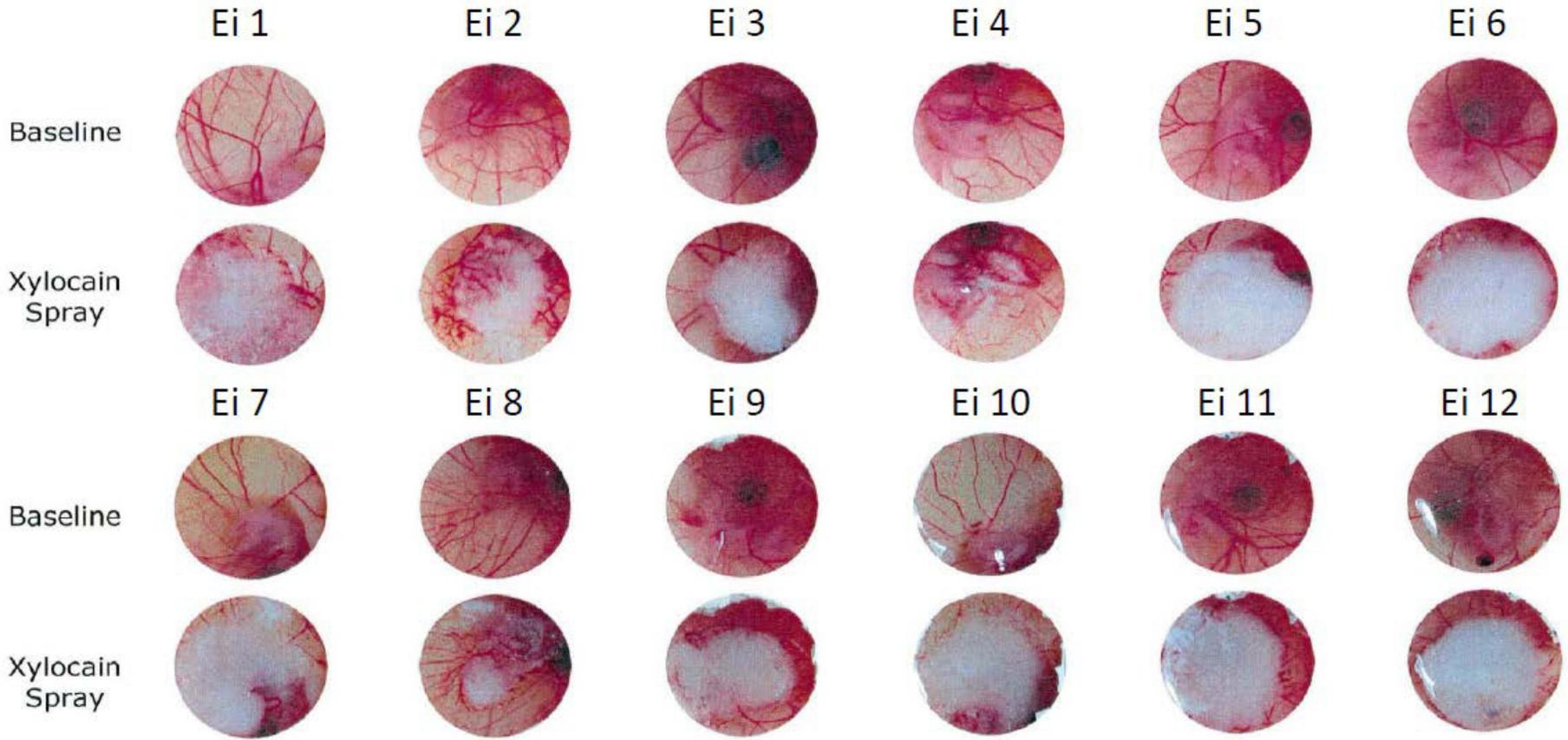


Abbildung 12 Photographie 12 Hühnereier Baseline und nach Applikation von Xylocain®

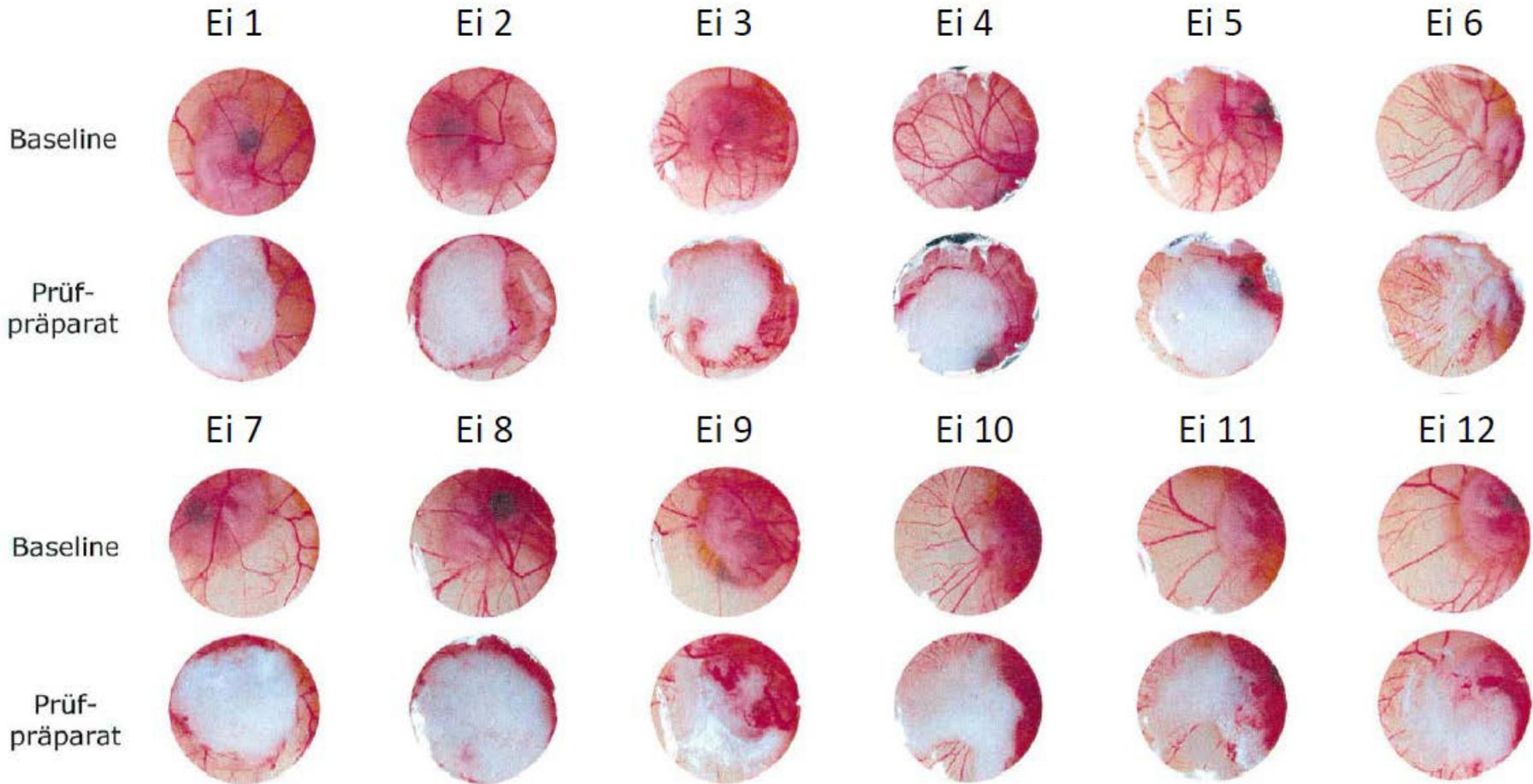


Abbildung 13 Photographie 12 Hühnereier Baseline und nach Applikation des Prüfpräparates

4.2.2 Ergebnisse der Auswertung mittels Laser-Doppler-Fluxmetrie

Die graphischen Ergebnisse der Laser-Fluxmetrie sind in Abbildung 14 und 15 dargestellt.

Abbildung 14 zeigt eine graphische Darstellung der Werte für die Negativkontrolle Aqua dest. und die Positivkontrolle 1% Natriumlaurylsulfat,

Abbildung 15 stellt einen Vergleich zwischen Referenz- und Prüfpräparat dar.

Die Mediane des Prüf- und des Referenzpräparates liegen bei 1,357 respektive 1,412.

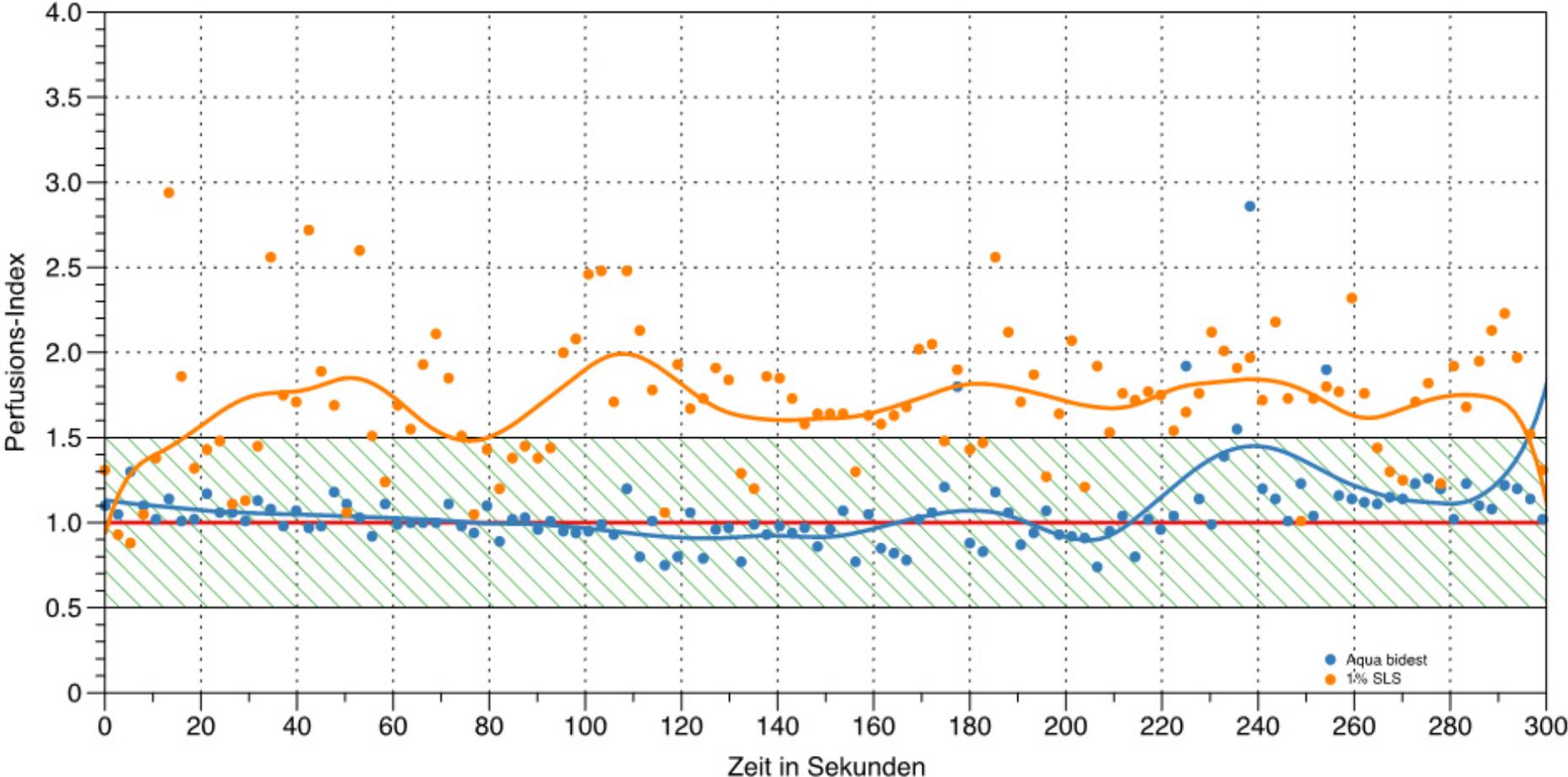


Abbildung 14 Graphische Darstellung Doppler-Fluxmetrie Positiv- und Negativkontrolle

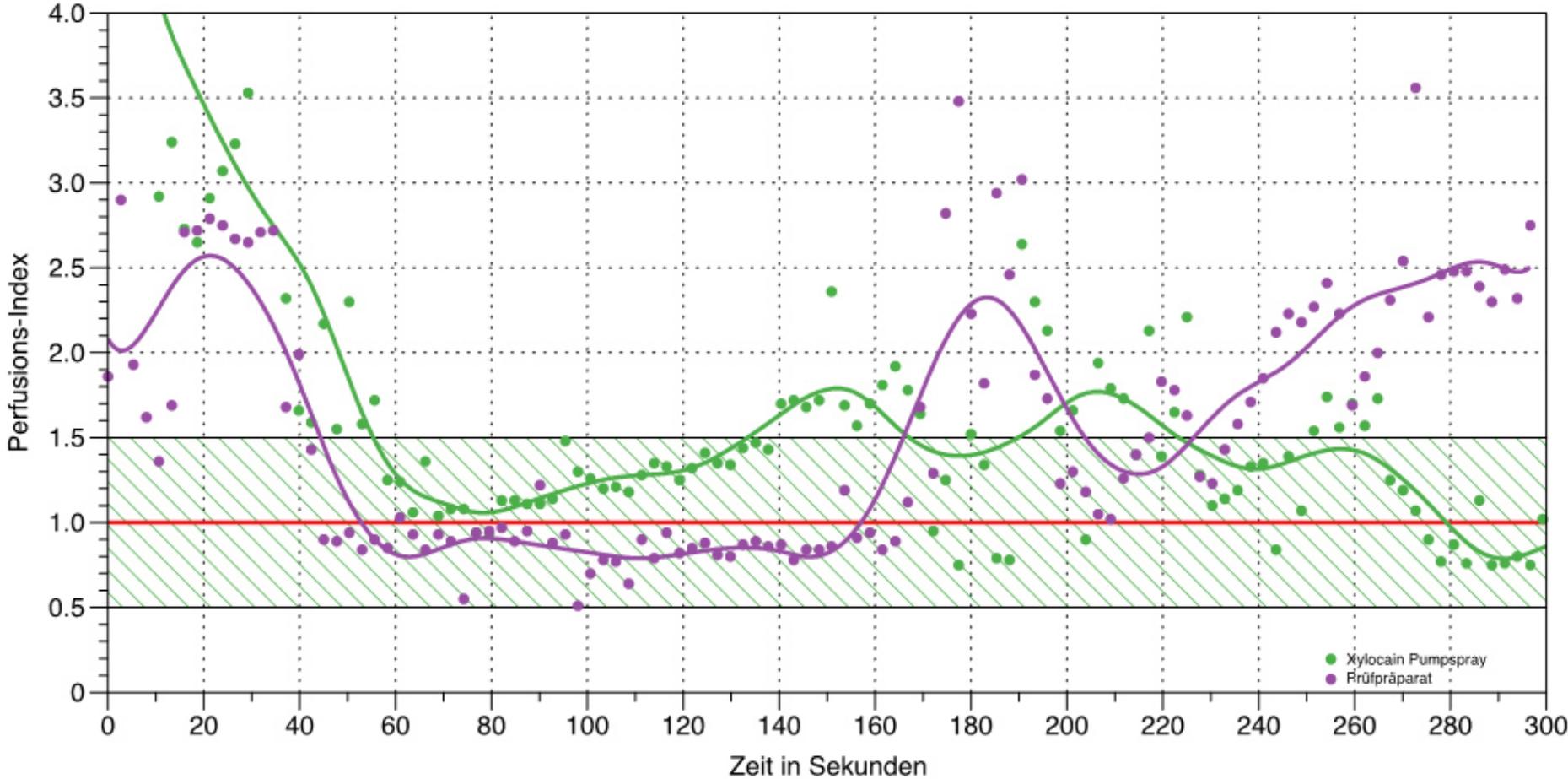


Abbildung 15 Graphische Darstellung Doppler-Fluxmetrie Xylocain® und Prüfpräparat

5 Diskussion

5.1 Einleitung

Auch wenn die Ergebnisse ein hohes Übereinstimmungspotential beider Präparate zeigen, sollte man genau hinterfragen, wie dies zu interpretieren ist. Daher werden im Folgenden noch einmal die gewählten Methoden kritisch beleuchtet und die aus den Ergebnissen abzuleitenden Schlußfolgerungen inklusive deren regulatorischer Relevanz hinterfragt.

5.2 Penetrationsuntersuchung in der Franz'schen Diffusionszelle

Diese Untersuchung wurde gewählt, um das Potential von nicht invasiven Versuchen zum Beleg der Bioäquivalenz am Beispiel zweier Lidocain-Präparate näher zu betrachten.

Wie in der Einleitung bereits aufgeführt, gibt es zurzeit primär zwei etablierte Gruppen zur in vitro-Ermittlung der lokalen Bioverfügbarkeit: Verfahren auf Basis isolierter Perfusion und in vitro-Freisetzungsverfahren, dem auch die Franz'sche Diffusionszelle (Franz, 1975) zugerechnet wird.

Bei in vitro-Freisetzungsverfahren können humane Haut, tierische Haut, aber auch semipermeable künstliche Membranen verwendet werden. Die Verwendung semipermeabler künstliche Membranen ist ein sehr neues Verfahren, deren Vergleichbarkeit mit dem Verhalten der natürlichen menschlichen Haut nur bedingt gegeben ist. Künstliche Membranen sind aber gut geeignet, um Freisetzungsprofile zu beurteilen (Chang et al., 2013).

Der Franz-Kammer-Test als wohl ältestes und aussagekräftigstes in vitro-Freisetzungsverfahren ist ein lange bekanntes und bewährtes Verfahren zum Beleg des Penetrations-Verhaltens von topisch aufgetragenen Substanzen, allerdings wird sie regulatorisch nicht als Surrogat-Parameter zum Beleg der Bioäquivalenz akzeptiert (Jain, 2014).

Was bedeutet dies für die vorliegenden Ergebnisse? Gemäß Fachinformation kann das Referenzpräparat Xylocain® „als Spray auf Schleimhäute, auf Wunden und bei Verbrennungen auf die Haut“ aufgebracht werden (Astra Zeneca, 2014). Da bei Wunden und bei Verbrennungen im Bereich neben der verletzten Haut auch immer ein Auftragen auf unverletzte Haut erfolgt, ist auch deren Penetration durchaus therapeutisch gewollt, um den lokalanästhetischen Effekt zu vergrößern. Daher stellt eine Untersuchung, die das Eindringen in die nahezu unverletzte menschliche Haut, so wie diese als Haut-

Exzision in der Franz-Kammer vorliegt (das „stripping“ führt nur zur Reduktion des Stratum corneums) – in gewisser Weise eine „worst case-Barriere“ für die Substanz dar.

Daher müssen die vorliegenden Ergebnisse unter 2 Aspekten betrachtet werden, die bereits bei der Zielstellung formuliert wurden:

1. In welchem Ausmaß penetriert Lidocain-Hydrochlorid in die menschliche Haut?

Die entscheidende Schicht für den Wirkungseintritt ist die Lederhaut (Dermis) mit den Nozizeptoren, die allerdings teilweise auch bereits in der Epidermis vorliegen (Dubin und Patapoutian, 2010).

Da die Dermis – je nach Zeitpunkt - von 20-40% des Wirkstoffs im Referenzpräparat erreicht wird, kann man von einer ausreichenden Wirkung von Lidocain Spray auf der nahezu unverletzten Haut oder der Schleimhaut ausgehen, da durch das „stripping“ der exzidierten Mamma-Haut nur das Stratum corneum entfernt wurde.

Dies wird klinisch dadurch bestätigt, dass es in anderen Ländern durchaus topische Lidocain-Lösungen mit einer Zulassung zur Anwendung auf der unverletzten Haut gibt (ABDA Drug Dossier, 2008), und hierbei muss ja dann zusätzlich auch das Stratum corneum als äußere Hautschicht vom Wirkstoff passiert werden.

Daher kann man aufgrund der vorliegenden Ergebnisse feststellen, dass die Franzkammer ein geeignetes Verfahren zu sein scheint, um das Penetrationsverhalten von Lidocain in der (Schleim)-Haut zu untersuchen und Hinweise zur möglichen Wirkung im Ziel-Kompartiment zu erhalten.

Wie man aus den Ergebnissen sehr gut erkennen kann, findet man beim Referenzpräparat Xylocain® folgende Verteilung in den Hautschichten:

Nach 30 Minuten befindet sich ca. 53% der applizierten Dosis im Tupfer, 16% in der Epidermis und 19% in der Dermis. Nach 100 Minuten befinden sich 55% der applizierten Dosis im Tupfer, 12% in der Epidermis und 29% in der Dermis. Nach 300 Minuten befinden sich 43% der applizierten Dosis im Tupfer, 13% in der Epidermis und 27% in der Dermis.

Beim Prüfpräparat befinden sich nach 30 Minuten 53% der applizierten Dosis im Tupfer, 17% in der Epidermis und 23% in der Dermis. Nach 100 Minuten finden sich 44% im Tupfer, 13% in der Epidermis und 32% in der Dermis. Nach 300 Minuten finden sich 13% im Tupfer, 16% in der Epidermis und 38% in der Dermis.

Allerdings muss man bei den hier durchgeführten Untersuchungen beachten, dass Lidocain nur in protonierter Form wirksam ist (Ganzberg und Kramer, 2010). Dies bedeutet, dass das in der Zielschicht gemessene Lidocain nicht unbedingt ein direktes

Bild der möglichen Wirksamkeit zeigt, da hier protoniertes und unprotoniertes Lidocain gemessen werden.

2. *Ob und wie unterscheiden sich Prüf- und Vergleichspräparat hinsichtlich des Penetrationsverhaltens voneinander?*

Die Differenzen der Penetrationsprofile von Referenz- und Prüfpräparat liegen bis auf eine Ausnahme durchgehend im Bereich von unter 15% der applizierten Lidocain-Dosis und somit im Toleranzbereich der Test-Methode.

Einzig beim Lidocaingehalt des Tupfers ergeben sich nach 300 Minuten Differenzwerte von ca. 30% zwischen beiden untersuchten Präparaten. Dies steht vermutlich im Zusammenhang mit der verhältnismäßig geringen Wiederfindungsrate beim Prüfpräparat nach 300 Minuten von nur 84%, welche testbedingt ist.

Der relativ breite Toleranzbereich von 15% kommt dadurch zustande, dass die für diese Untersuchung verwendete Probenzahl mit 3 Hautproben und je 3 Hautstanzen pro Probe, also insgesamt 9 Hautstanzen aus statistischer Sicht sehr gering ist.

Diese Erhöhung der Probenzahl erscheint in Abwägung des damit erreichten höheren Sicherheitsniveaus im Vergleich zu den dafür aufzuwendenden Kosten und vor allem unter Berücksichtigung ethischer Aspekte als ungünstig und sollte vermieden werden. Daher wird auf eine statistische Auswertung dieses Tests verzichtet. Dies wird auch von regulatorischen Behörden (z.B. vom Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte, BfArM) so akzeptiert.

Neben der geringen Probenanzahl gibt es weitere Aspekte, die bei der Bewertung der Ergebnisse zu berücksichtigen sind.

So stammen die Hautbiopsien von (in diesem Falle 3) verschiedenen Spendern und unterliegen somit wie alle biologischen Proben unterschiedlichen Ursprungs einer biologischen Variabilität hinsichtlich Parameter wie Dicke der einzelnen Hautschichten oder Alter der Hautprobe, welche die Penetration und somit das Ergebnis beeinflussen können.

Auch die Penetrationskinetik selbst unterliegt einer Variabilität und ist z.B. vom Zustand der Hautzellen und der damit verbundenen Durchlässigkeit abhängig.

Weiterhin ist – wie bereits oben angemerkt – hierbei besonders kritisch zu erwähnen, dass Lidocain ein Wirkstoff ist, der nur in seiner protonierten Form Wirksamkeit zeigt. Das heißt aber im Umkehrschluss, dass von einer gleichen Menge an Wirkstoff nicht auf gleiche Bioverfügbarkeit geschlossen werden kann, sofern keine Kenntnisse über den pH-Wert und somit das Verhältnis der protonierten zur unprotonierten Form vorliegen.

Somit bleibt, obwohl die Werte von Prüf- und Referenzpräparat zum größten Teil innerhalb des Toleranzbereiches liegen, eine Restunsicherheit, ob daraus auf Bioäquivalenz beider Präparate geschlossen werden kann.

Da es sich in der vorliegenden Arbeit um einen Vergleich von zwei ähnlichen Formulierungen in gleichem experimentellen Set-Up handelt und da eine weitgehend ähnliche Zusammensetzung von Referenz- und Prüfpräparat vorliegt, ist allerdings davon auszugehen, dass beide sich in einem gegebenen pH-Wert im Zielkompartiment auch ähnlich verhalten werden.

Somit kann mit hoher Wahrscheinlichkeit von einer Übereinstimmung der Menge des protonierten Licocains in der Dermis der Franz-Kammer-Haut und voraussichtlich auch in vivo ausgegangen werden.

Dies bedeutet, dass die vergleichende Untersuchung der Penetration in der Franz-Kammer ein geeignetes Verfahren ist, um 2 topische Lidocain-Präparate hinsichtlich Penetration und vermutlicher Bioäquivalenz vergleichend zu beurteilen.

5.3 HET-CAM-Untersuchung

Bei Anwendung des HET-CAM-Tests in der vorliegenden Untersuchung stellen sich auch hier die beiden in der Zielstellung bereits aufgeworfenen Fragen:

1. Wie ist die Haut- und Schleimhauttoxizität von topisch appliziertem Lidocain-Hydrochlorid einzuschätzen?

Bei der visuellen Beurteilung zeigen sich deutliche Unterschiede in den Ergebnissen zwischen Aqua dest. als Negativ- und 1% Natriumlarurylsulfat als Positivkontrolle. Der Irritationsscore für Aqua dest. hat in allen drei Bereichen, Hämorrhagie, Gefäßlyse und Koagulation, einen Wert von 0, und somit ist auch der gesamte Irritationsscore 0. Die Schweregrade sind ebenfalls in allen drei Bereichen 0, und das irritative Potential gering. Dagegen ergeben sich für 1% Natriumlarurylsulfat hohe Werte für die Irritationsscores und die Schweregrade, und somit insgesamt ein starkes irritatives Potential.

Auch in der Auswertung der Laser-Fluxmetrie zeigen sich unterschiedliche Mediane für Negativ- und Positivkontrolle.

Das Verfahren HET-CAM ist also offensichtlich in der Lage, zwischen Präparaten mit hohem gefäßtoxischem Potential und Präparaten mit niedrigem gefäßtoxischem Potential zu differenzieren und somit geeignet diesbezügliche Aussagen zu Lidocain-Präparaten zu treffen.

Bei der HET-CAM-Untersuchung der beiden Lidocainpräparate zeigten sich in der visuellen Auswertung sowohl beim Prüf- als auch beim Referenzpräparat keine sichtbaren Veränderungen im Bereich Gefäßlyse, es wurden jedoch Hämorrhagien und Koagulationen sichtbar.

Insgesamt haben beide Präparate ein irritatives Potential mit gesamten Irritationsscores von 3,57 (Prüfpräparat) bzw. 4,79 (Xylocain®).

Das heißt, sowohl das Prüf- als auch das Referenzpräparat zeigten toxische bzw. irritative Wirkungen, die in beiden Fällen allerdings deutlich unter der toxischen Wirkung der Positivkontrolle liegen und somit als mäßig einzuschätzen sind. Da Lidocain als Einzelstoff nicht getestet wurde und die (in beiden Präparaten quantitativ identen) Hilfsstoffe auch toxische Wirkungen haben können, kann nicht festgelegt werden wie weit diese toxischen Wirkungen auf das Lidocain oder auf die Hilfsstoffe zurückzuführen sind. Fazit ist jedoch dass topisch appliziertes Lidocain maximal mäßig toxisch wirkt.

2. Ob und wie unterscheiden sich Prüf- und Referenzpräparat hinsichtlich Haut- und Schleimhauttoxizität voneinander?

Wie erwähnt weisen sowohl Prüf- als auch Referenzpräparat mäßig toxische Wirkungen. Hämorrhagien traten dabei beim Referenzpräparat deutlich früher auf und waren deutlich stärker ausgeprägt als beim Prüfpräparat. Koagulationen traten bei beiden Präparaten bei ähnlich vielen Eiern, ähnlich schnell und mit ähnlichem Schweregrad auf, mit leicht höheren Werten beim Prüfpräparat. Somit ist das Verhalten bezüglich Gefäßlyse und Koagulation beider Präparate ähnlich.

Auch die Irritationsscores haben ähnliche Werte.

Mit einem Median von 1,412 bei Xylocain® bzw. 1,357 beim Prüfpräparat zeigten beide Präparate auch in der Laser-Fluxmetrie ein ähnliches Verhalten.

Die statistische Auswertung zwischen Aqua bidest als Negativkontrolle (Median 0,873) sowie beiden Präparaten mittels Friedman repeated measures of variances on ranks ergab einen Chi-Quadrat von 92,513 mit zwei Freiheitsgraden ($p < 0,001$). Somit wird die Nullhypothese, dass sich Negativkontrolle, Prüf- und Referenzpräparat bezüglich der Laser-Fluxmetrie nicht signifikant voneinander unterscheiden, abgelehnt.

Zur weiteren Differenzierung welche der getesteten Substanzen sich unterscheiden wurde der All Pairwise Multiple Comparison Procedures Test (Dunn's Method) angewendet. Dieser ergab statistisch signifikante Unterschiede für Aqua bidest und Xylocain® sowie Aqua bidest und Prüfpräparat (p jeweils $< 0,05$), jedoch nicht für Xylocain® und Prüfpräparat ($p > 0,05$). (XLSTAT, 2011)

Da beide Präparate eine sehr ähnliche Formulierung haben, und beide sich im HET-CAM-Test statistisch nicht signifikant unterscheiden, ist der HET-CAM-Test also offenbar ein Testverfahren, mit dem zwei Lidocain-Formulierungen hinsichtlich ihres toxischen Potentials verglichen werden können.

Einschränkend ist zu sagen, dass eine in vitro-Methode wie das HET-CAM-Verfahren die Gegebenheiten in vivo nie vollständig widerspiegeln können und sich somit potentiell Unterschiede zwischen dem Verhalten im HET-CAM-Test und dem Verhalten bei Anwendung am Menschen ergeben können. Zeigt sich im HET-CAM-Test kein irritatives Potential ist dies eben nur ein – wenn auch sehr gewichtiger - Anhaltspunkt für die Nicht-Toxizität einer Substanz, aber keine Garantie, dass die Substanz in vivo keinerlei Schädigungen hervorruft.

Zudem können folgende Faktoren die Validität der erhaltenen Ergebnisse einschränken:

1. Die Gefäßdichte
2. Die Durchblutung der Chorio-Allantois-Membran
3. Die Inkubationszeit

Die Fehlerquote durch diese Faktoren konnte allerdings durch repetitive Messungen minimiert werden.

5.4 Regulatorische Relevanz

In den letzten Jahren zeigt sich bezüglich der regulatorischen Anforderungen an den Nachweis der Bioäquivalenz eine zunehmende Tendenz zur Reduktion der Komplexität bei Bioäquivalenz-Nachweisen für orale Produkte und für Biosimilars.

Dies läßt sich auch bei Topika beobachten. Nachdem die Gesellschaft für Dermopharmazie eine Substituierung wirkstoffidentischer Topika 2006 noch mit großer Skepsis gesehen hat (GD Gesellschaft für Dermopharmazie, 2006), wird dies in neuerer Zeit unter Beachtung der Vergleichbarkeit durchaus für möglich angesehen, allerdings wird auch betont dass eine zu liberale Auslegung der Austauschbarkeit in bestimmten Fällen eine Veränderung der gewünschten Wirkung hervorrufen und somit negative Auswirkungen auf das therapeutische Konzept des Arztes haben kann (Wohlrab, 2014).

Schon in der Zeit der deutschen Nachzulassung (2000 bis 2005) wurden aufgrund der Mängelrügen des BfArM auch einige klinische Prüfmodelle für Topika an gesunden Probanden entwickelt, die der Behörde für den Vergleich der Bioäquivalenz von verschiedenen Topika für die Zulassung vorgelegt und zum großen Teil auch akzeptiert wurden. Dies sind in vivo-Tests, bei denen Surrogat-Parameter untersucht wurden; somit gab es damals schon eine Tendenz, vom Modell der klassischen klinischen Phase

III Studien abzuweichen und Vereinfachungen zuzulassen.

Beispiele dazu sind:

- Vergleich von antientzündlich wirkenden Substanzen auf die Linderung von artifiziell erzeugtem Sonnenbrand (Jocher et al., 2005)
- Vergleich der ausgelösten Rötung bei Rubefaciens (Schempp, 2004, nicht veröffentlicht)
- Vergleich von Präparaten zur Behandlung von Mückenstichen (Rzany, 2004 – nicht veröffentlicht)
- Vergleich von topischen Antiseptika (Jünger, 2005 – nicht veröffentlicht)
- Mit lokal injiziertem Lidocain wurden bereits zwei klinische Studien an gesunden Probanden durchgeführt, allerdings ging es hier primär um die Wirkungsverstärkung des lokalanästhetischen Effektes durch einen zweiten Arzneimittel-Zusatz (Wohlrab, 2010a und 2010b)
- Neuere Konzepte untersuchen topische Präparate für die Behandlung von artifiziell Juckreiz – auch dies wäre für einen Vergleich von Topika ein erfolversprechender Ansatz (Metz, 2012).

Daher stellt sich die generelle Frage, wie in Zukunft die generische Entwicklung von Topika regulatorisch gestaltet werden wird, beziehungsweise ob es Möglichkeiten gibt, die in den aktuellen Richtlinien aufgeführten Vorgaben, die in der Einleitung bereits dargestellt wurden, unter bestimmten Umständen modifizieren zu können.

Narkar postulierte 2010, dass es für die Bioäquivalenz-Prüfung von Topika auch zukünftig keine Universal-Methode zum Vergleich von Surrogaten an Gesunden oder in vitro geben wird, da die Topika ihre Wirkung an unterschiedlichen Körperstellen und in unterschiedlicher Hauttiefe entfalten. Daher muss für jede Topika-Wirkstoffklasse separat eine geeignete Methode identifiziert, in verschiedenen Laboren reproduziert und validiert werden (Narkar, 2010).

Diesbezüglich sei vor allem das „Critical Opportunities Programm“ der FDA sowie das „Concept paper on the development of a guideline on quality and equivalence of topical products“ der EMA (European Medicines Agency, 2014) zu nennen.

In Anbetracht dieser Entwicklung ist davon auszugehen, dass prinzipiell zunehmend auch präklinische validierte Tests zum Nachweis der Bioäquivalenz von Topika bei den Zulassungsbehörden Akzeptanz finden werden. Die Eignung des jeweiligen Verfahrens sollte dabei jedoch immer substanzspezifisch betrachtet und die Besonderheiten topischer Produkte berücksichtigt werden.

Einen Vorschlag hierzu findet man bei Kasha und Banga (Kasha und Banga, 2012). Hier werden unterschiedliche Wirkstoffen unterschiedlichen Wirtktiefen in der Haut zugeordnet und in Analogie dazu, wie in Abbildung 16 dargestellt, die untersuchten Wirtktiefen in den Zielkompartimenten der Haut den in Kapitel 1.1.1 dargestellten Verfahren zugeordnet:

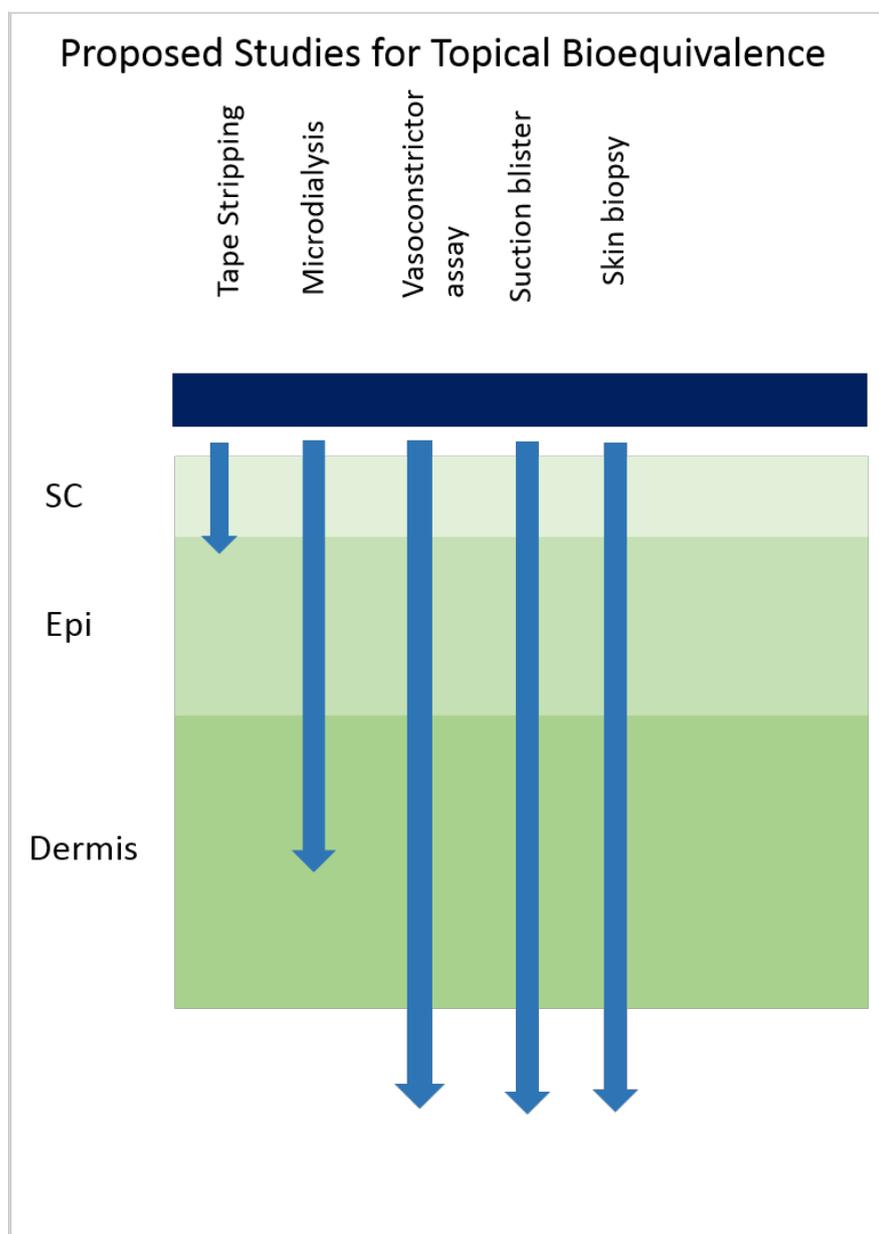


Abbildung 16 Proposed Studies for Topical Bioequivalence (nach Kasha und Banga, 2012)

Da Lidocain bei der Applikation auf die (allerdings „gestrippte“) Haut bis in die Dermis vordringt, wären nach dieser Arbeit für den Nachweis der Bioäquivalenz alle Methoden ausser Tape Stripping Test geeignet.

Weitere Aspekte zeigt ein Artikel von Shah et al. auf, in dem die Autoren in Analogie zum Biopharmaceutic Classification System (BCS; siehe z.B. Shah et al., 2015) ein Klassifizierungssystem für topische Formulierungen vorschlagen (Topical Classification System, TCS), bei dem zwei zu vergleichende Formulierungen anhand verschiedener Parameter in eine von vier Gruppen zugeordnet werden. Die Parameter sollen Anhaltspunkte über zu erwartende Unterschiede in der Bioverfügbarkeit liefern, und aus der Gruppenzuordnung somit dann Aussagen zu regulatorischen Anforderungen an den Nachweis der Bioäquivalenz der beiden zu vergleichenden Formulierungen abgeleitet werden können. Hierbei gilt: je größere Unterschiede in der Bioverfügbarkeit sich durch die betrachteten Parameter erwarten lassen, desto höher die zu stellenden Anforderungen zum Nachweis der Bioäquivalenz.

Die betrachteten Parameter sind qualitative (Q1) und quantitative (Q2) Gleichheit der Formulierung sowie strukturelle Gleichheit (Q3). Als Maß für die strukturelle Gleichheit wird das Verhalten in der in vitro-release-Testung (IVR – siehe hierzu auch Kapitel 1.1.1.) verglichen.

Hieraus werden nun 4 Klassen abgeleitet. Sind Q1, Q2 und Q3 gleich, sind also beide Formulierungen qualitativ, quantitativ und strukturell gleich, werden sie der Klasse 1 zugeordnet, bei der von geringen Unterschieden in der Bioverfügbarkeit ausgegangen werden kann und somit ein Biowaiver – der Verzicht auf eine in vivo-Bioäquivalenzstudie – gewährt werden kann. Sind Q1 und Q2 gleich, aber Q3 unterschiedlich, werden die Formulierungen der Klasse 2 zugeordnet. Hier muss aufgrund des unterschiedlichen Freisetzungsprofils – trotz gleicher Zusammensetzung – von größeren Unterschieden in der Bioverfügbarkeit ausgegangen werden und eine in vivo-Bioäquivalenzstudie gefordert werden.

Sind Q1 oder Q2 nicht gleich, hängt die Einteilung und Beurteilung von Q3 ab:

Sind die Freisetzungsprofile gleich, die Unterschiede in der Zusammensetzung also ohne große Auswirkung, erfolgt die Zuordnung in die Klasse 3, bei der trotz Unterschieden in der Zusammensetzung von geringen Unterschieden in der Bioverfügbarkeit ausgegangen wird.

Unterscheiden sich die Freisetzungsprofile, erfolgt die Zuordnung in Klasse 4, es wird von größeren Unterschieden in der Bioverfügbarkeit ausgegangen.

Sivaraman und Banga wiesen 2015 unterstützend darauf hin, dass die Generika-Industrie bei der Entwicklung von topischen Generika sehr stark den Aspekt des „Quality

by Design“ schon in der galenischen Konzeption beachten sollte, um hier von Beginn an eine möglichst große Übereinstimmung in den Klassifizierungen zu erreichen (Sivarman et Banga, 2015).

Graphisch wird dies in Abbildung 17 zusammengefasst.

Abbildung 18 zeigt den dazugehörigen Entscheidungsbaum im TCS-System.

Topical Drug Classification System, TCS

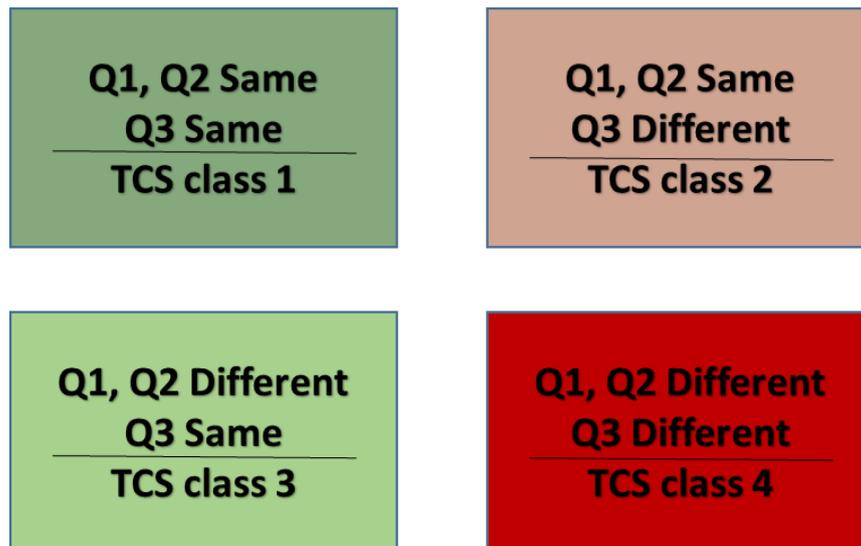


Abbildung 17 Topical Drug Classification System (nach Shah et al., 2015)

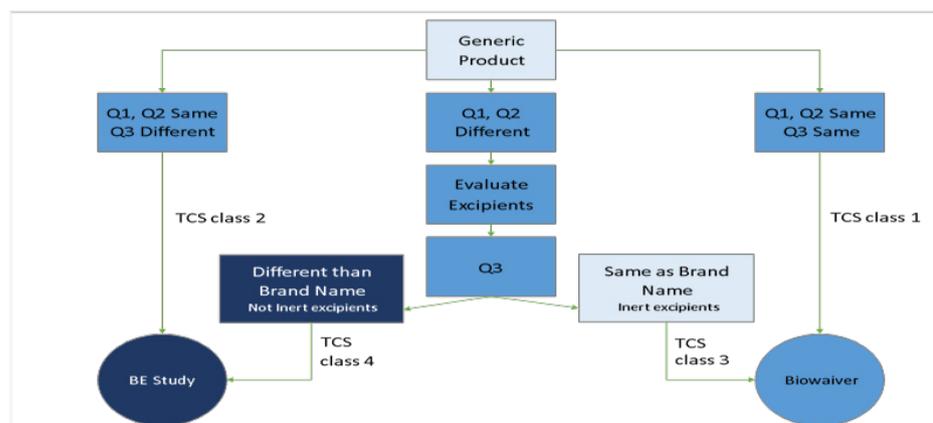


Abbildung 18 Entscheidungsbaum im TCS-System (nach Shah et al., 2015)

Die Anwendung dieses Systems würde für die in dieser Arbeit untersuchten Produkte folgendes bedeuten:

Q1 – gegeben

Q3 – gegeben (da Lösung)

Q2 – minimale Unterschiede

Dies würde für die Präparate dieser Arbeit eine Zuordnung in Klasse 3 ergeben, die zu einem Biowaver führen kann. Dann wären die hier gezeigten Ergebnisse für die Erlangung einer Zulassung eventuell ausreichend.

Die FDA stellte 2015 zur Situation der Topika fest, dass das Fehlen von effizienten Methoden zur Messung der Bioäquivalenz von topischen Produkten die Verfügbarkeit von Generika in diesem Bereich stark einschränkt und sie unternimmt in den letzten Jahren einige Anstrengungen, um diese Situation zu verbessern. Sie hält bei topischen Präparaten mit den gleichen Komponenten in der gleichen Dosierung, bei der Galenik in Lösungen die Mikro-Struktur ebenfalls für bioäquivalent und fordert in solchen Fällen keine weiteren Studien (Lionberger, 2015). Bei unterschiedlicher Dosierung der Komponenten, so wie es bei den beiden in dieser Arbeit untersuchten Produkten der Fall ist, werden in vitro-Studien (wie zum Beispiel der Franz-Kammer-Test) gefordert, falls die Differenz der Zusammensetzung nur marginal ist.

Fahmy hat dies 2015 folgendermaßen zusammengefasst:

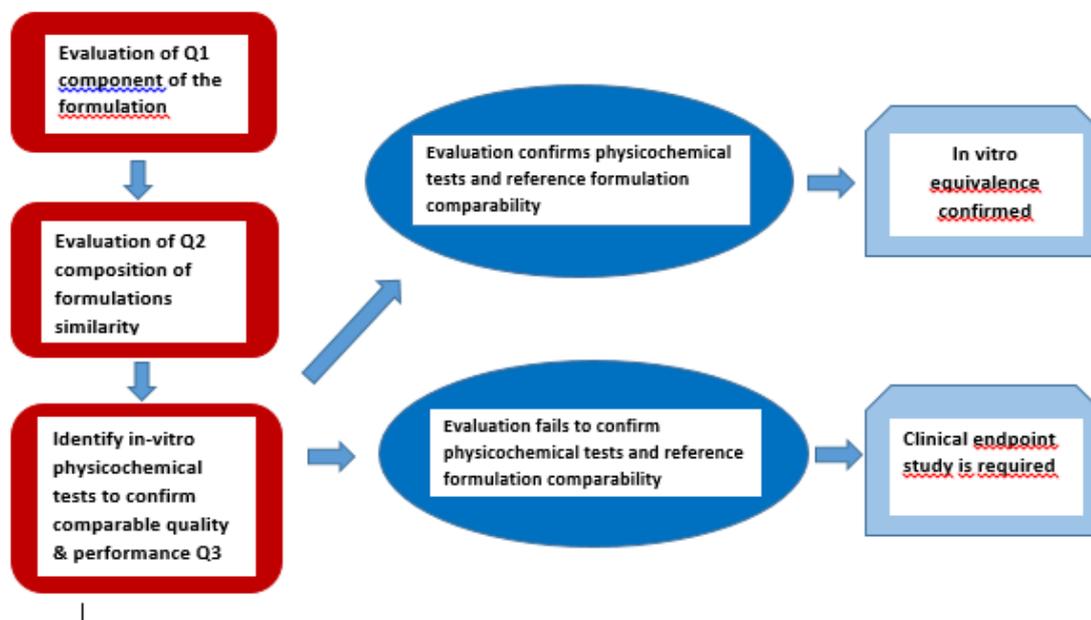


Abbildung 19 Working Paradigm for the generic (nach Fahmy, 2015)

Somit hätte man auch bei der FDA mit den Ergebnissen dieser Arbeit gute Chancen für eine Zulassung des Test-Präparats, falls das Referenz-Präparat in den USA zugelassen wäre.

Die aktuellste Entwicklung in Europa ist der in der Einleitung bereits erwähnte EMA Entwurf einer Richtlinie für die generische Entwicklung von Magen-Darm-Präparaten (European Medicines Agency, 2017a). In dem Kapitel für die topischen Produkte, die nur im Mundraum wirken, wird folgender Entscheidungsbaum vorgeschlagen:

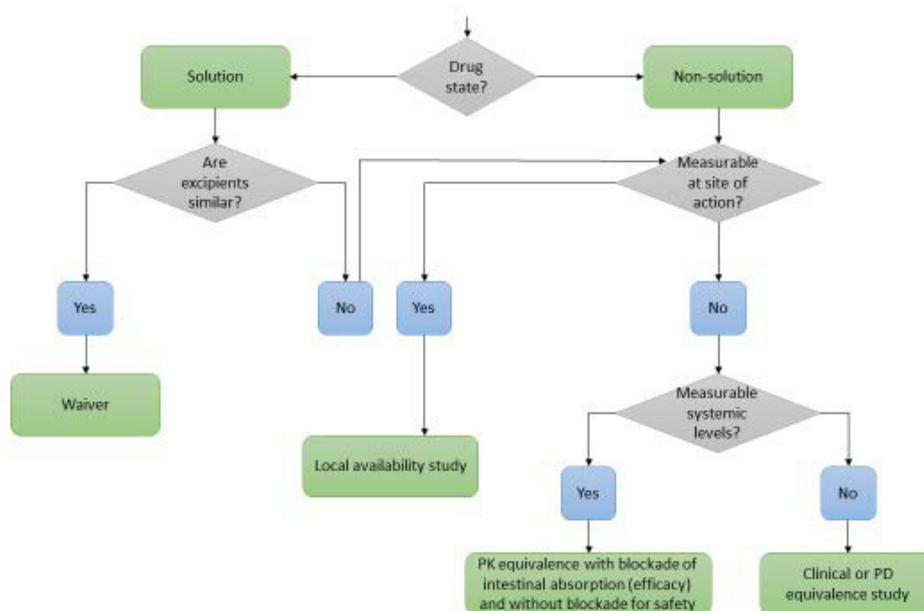


Abbildung 20 Entscheidungsbaum (nach European Medicines Agency, 2017a)

Da die Wirkung eines Topikums auf die Mundschleimhaut medizinisch eine ähnliche Relevanz hat, wie das Aufbringen auf die verletzte Haut, kann man diesen Vorschlag durchaus auch auf topische Lokalnästhetika übertragen.

Dies würde für den vorliegenden Fall von Referenz- und Prüfpräparat bedeuten, dass eine klinische Studie vermieden werden könnte, wenn diese Richtlinie Bestandskraft erhält.

Braddy et al haben 2015 noch einmal die wichtigsten internationalen Regelungen von 15 internationalen Institutionen für die Zulassung von topischen Generika zusammengefasst (Braddy et al., 2015) – aktuell haben nur Europa, die USA, Canada und Japan entsprechende Richtlinien für die Zulassung von topischen Generika.

Demnach gibt es zurzeit weltweit nur 3 konsistente Ansätze:

1. Klinische Studien

2. In vivo pharmakodynamische Studien an gesunden Probanden, insbesondere der Vasoconstrictions-Test für Corticoide
3. Biowaiver und Vorlage von in vivo dermatopharmakokinetischen oder von in vitro-Studien.

Lu et al. haben zu dieser Problematik 2016 eine ausführliche Übersicht veröffentlicht, welche die verschiedenen möglichen Herangehensweisen zusammenfasst:

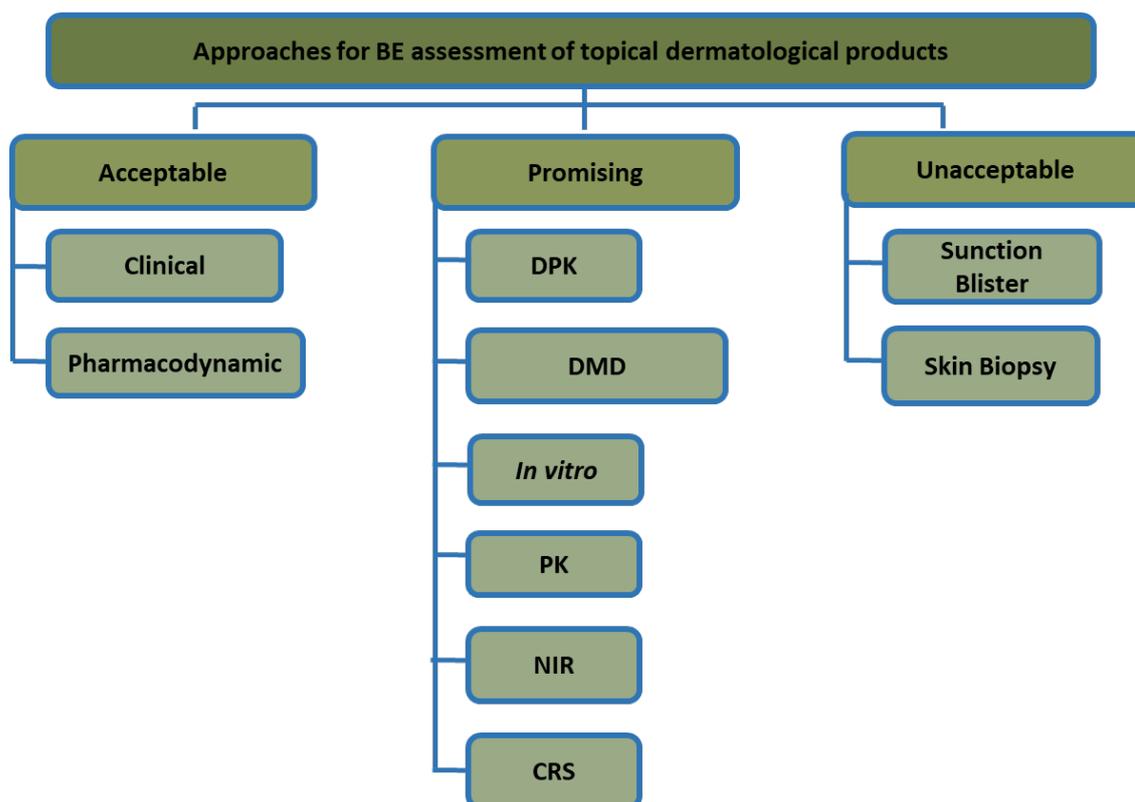


Abbildung 21 Approaches for BE assessment of topical dermatological products (nach Lu et al., 2016)

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit könnten einen Beitrag dazu leisten, für topische Lidocain-haltige Formulierungen zur Oberflächen-Anästhesie, die Bioäquivalenz durch die Kombination von zwei in vitro-Studien zu belegen. Somit würden die neuesten Trends und Ansätze der regulatorischen Behörden weltweit Berücksichtigung finden.

5.5 Übertragbarkeit auf andere Moleküle/Galeniken

Die vorliegenden Erkenntnisse sind – so wie es bei Topika die Regel ist – keinesfalls generell auf andere Produkte, Moleküle oder Galeniken übertragbar.

Jedes Topikum reagiert unterschiedlich und muss durch den Facharzt unterschiedlich eingesetzt werden. Bei jedem Vehikel und jeder Galenik gibt es unterschiedliches

Resorptionsverhalten und Penetrationstiefen. Dies setzt fachärztliche Kenntnisse „zur Interaktion der Wirksubstanz und des Vehikelsystems mit dem Hautorgan voraus“ (Wohlrab et al., 2014).

Zusätzlich können moderne Vehikel-Systeme wie Mikro-Emulsionen, transdermale Applikationsformen, parallele Applikation von (intracutan applizierter) Hyaluronidase oder andere topische Resorptions-Beschleuniger etc. eine erwünschte Penetration von topisch applizierten Arzneimitteln steigern (Trommer und Neubert, 2006; Raut et. al., 2014; Wohlrab et al., 2014).

Die substanzspezifische Betrachtungsweise der internationalen Behörden wird durch einen aktuellen Richtlinien-Entwurf der FDA für die Entwicklung von Generika zu 46 Substanzen untermauert. Unter diesen befinden sich auch 6 Topika: Betamethason, Dapsone, Docosanol, Erythromycin, Ivermectin und Permethrin. Bei diesen Produkten sind die Forderungen zum Belege der Bioäquivalenz stark unterschiedlich: neben Vasokontraktions-Tests (bei Betamethason), werden zumindest pharmakokinetische Studien (Dapsone und Ivermectin) gefordert, teilweise auch eine komplette Studie mit klinischen Endpunkten (Permethrin). Für eine Zulassung ohne klinische Studie gibt es nur die Empfehlung für 2 Produkte: Docosanol, wo eine IVR-Studie zum Beleg der Bioäquivalenz bei sonst nahezu gleichen Präparaten als ausreichend angesehen wird, und Erythromycin, wo ein ausschließlicher physikochemischer Beleg der Gleichheit beider Produkte zur Zulassung ausreicht (Food and Drug Administration, 2017).

5.6 Pharmakoökonomische Aspekte

Wenn eine industrielle Verwertung der Ergebnisse für eine Zulassung ins Auge gefaßt wird, muss man sich damit befassen, wo ein topisches Lidocain Spray bereits zugelassen ist, wobei die Anwendungsgebiete sowohl auf der Schleimhaut (zum Beispiel intra-oral) als auch auf der Haut genehmigt sein sollten.

In Europa gibt es für ein 10% Lidocain Kutan-Spray neben Deutschland und Österreich Zulassungen in Italien, der Schweiz, Polen und Spanien, Dänemark, Finnland, Norwegen, Schweden, Grossbritannien, Frankreich, den Niederlanden und Belgien, sowie in der Türkei und Canada. Weitere Zulassungen bestehen als Procomil® Spray (allerdings mit veränderter Zusammensetzung) in 19 Ländern (IMS PADDS Dataview, 2012)

Eine identische Zusammensetzung wie das in dieser Arbeit eingesetzte in Österreich zugelassene Xylocain® Spray mit 10% Lidocain wird vermutlich bei den Präparaten von Astra Zeneca in Belgien, Dänemark, Deutschland, Finnland, Norwegen, Schweden, der

Schweiz, Grossbritannien, Frankreich, den Niederlanden, Canada und der Türkei eingesetzt.

Bei einer vermuteten identischen Zusammensetzung gibt es die Möglichkeit der bezugnehmenden Zulassung – so dass nach Erhalt der ersten Zulassung in Europa – in Österreich (Bundesamt für Sicherheit im Gesundheitswesen, 2017) – eine Zulassung in den anderen europäischen Ländern, in denen Xylocain Spray zugelassen ist – *ohne* weitere klinische Studien sehr wahrscheinlich ist.

Der Umsatz für topisches Lidocain betrug in den letzten Jahren durchschnittlich 80 Mio €, der für Xylocain® war davon 4,2 Mio € (IMS PADDs Dataview, 2012).

Hier könnten folglich erhebliche Einsparungen für die sozialen Sicherungs-Systeme in anderen Ländern erzielt werden. Um dies umzusetzen, sollte nach inzwischen erfolgtem Erhalt der ersten europäischen Zulassung in Österreich aufgrund der in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse darauf bezugnehmend auch in den anderen Ländern mit Xylocain® Umsatz eine Zulassung für das Referenzprodukt beantragt werden.

6 Zusammenfassung

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass mit den vorliegenden Ergebnissen eine große Übereinstimmung von zwei lidocainhaltigen Topika in zwei verschiedenen in vitro-Tests nachgewiesen werden konnte.

Sowohl das Penetrationsverhalten in der Franz-Kammer als auch die Toxizitätsparameter im HET-CAM-Test zeigten keine relevanten Unterschiede. Da dies zwei Parameter sind, die für die klinische Wirkung eine besondere Bedeutung haben, kann daher auch von einer klinischen Bioäquivalenz ausgegangen werden.

Die vorliegenden Ergebnisse haben zu einer generischen Zulassung in Österreich geführt, so dass weitere Zulassungen in Europa und teilweise auch in anderen Ländern möglich sind.

Angesichts der aktuellen Diskussion in Europa und weltweit, die Zulassung von Generika zu vereinfachen und zu beschleunigen, muss man die Besonderheiten von topischen Präparaten beachten. Die aktuelle Diskussion innerhalb der EMA (European Medicines Agency, 2014) zielt darauf ab, eine Richtlinie für die Entwicklung von topischen Generika zu erstellen, in der Kriterien für die Evaluation der Bioäquivalenz von topischen Präparaten für die Zulassung festgelegt werden sollen.

Die FDA gibt ihre Empfehlungen inzwischen substanz-spezifisch heraus, ob dies auch in Europa so übernommen wird, muss abgewartet werden (Food and Drug Administration, 2017).

Somit stellen die vorliegenden Ergebnisse einen Beitrag zur substanz-spezifischen Evaluation der Bioäquivalenz zweier topischer Lidocainhaltiger Präparate dar und könnten somit in den weiteren regulatorischen Kontext in Europa Eingang finden.

Literaturverzeichnis

- Rote Liste 2017. Arzneimittelverzeichnis für Deutschland (einschließlich EU-Zulassungen und bestimmter Medizinprodukte) (2017). 57. Ausgabe. Frankfurt.
- ABDA Drug Dossier (2008). ABDATA Pharma Daten Service, Berlin, Deutschland.
- Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2011): Resolution RDC nr. 37 Dispõe sobre o Guia para isenção e substituição de estudos de biodisponibilidade relativa/bioequivalência e dá outras providências
- Astra Zeneca (2014): Fachinformation Xylocain®. Online verfügbar unter https://www.google.de/search?q=+astra+zeneca+fachinformation+xylocain&ie=utf-8&oe=utf-8&client=firefox-b&gfe_rd=cr&dcr=0&ei=CQM5WtqGFYiV8Qe996rQBw, zuletzt geprüft am 04.01.2018.
- Au, W. L.; Skinner, M. F.; Benfeldt, E.; Verbeeck, R. K.; Kanfer, I. (2012): Application of dermal microdialysis for the determination of bioavailability of clobetasol propionate applied to the skin of human subjects. In: *Skin pharmacology and physiology* 25 (1), S. 17–24.
- Baynes, R.; Riviere, J.; Franz, T.; Monteiro-Riviere, N.; Lehman, P.; Peyrou, M.; Toutain, P-L (2012): Challenges obtaining a biowaiver for topical veterinary dosage forms. In: *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics* 35 Suppl 1, S. 103–114.
- Benfeldt, E.; Hansen, Steen H.; Vølund, A.; Menné, T.; Shah, V. P. (2007): Bioequivalence of topical formulations in humans. Evaluation by dermal microdialysis sampling and the dermatopharmacokinetic method. In: *The Journal of investigative dermatology* 127 (1), S. 170–178.
- Borsadia, S.; Ghanem, A. H.; Seta, Y.; Higuchi, W. I.; Flynn, G. L.; Behl, C. R.; Shah, V. P. (1992): Factors to be considered in the evaluation of bioavailability and bioequivalence of topical formulations. In: *Skin pharmacology : the official journal of the Skin Pharmacology Society* 5 (3), S. 129–145.
- Braddy, A. C.; Davit, B. M.; Stier, E. M.; Conner, D. P. (2015): Survey of international regulatory bioequivalence recommendations for approval of generic topical dermatological drug products. In: *The AAPS journal* 17 (1), S. 121–133.
- Bundesamt für Sicherheit im Gesundheitswesen, 2017: Zulassung der Arzneyspezialität Lidocain Walter Ritter 100 mg/ml Spray zur Anwendung auf der Haut, Lösung (nicht veröffentlicht).
- Chang, R.-K.; Raw, A.; Lionberger, R.; Yu, L. (2015): Erratum to. Generic Development of Topical Dermatologic Products: Formulation Development, Process Development, and Testing of Topical Dermatologic Products. In: *The AAPS journal* 17 (6), S. 1522.
- Chu, S. S.; Rah, K. H.; Brannan, M. D.; Cohen, J. L. (1975): Plasma concentration of lidocaine after endotracheal spray. In: *Anesthesia and analgesia* 54 (4), S. 438–441.
- Cross, S. E.; Wu, Z.; Roberts, M. S. (1994): Effect of perfusion flow rate on the tissue uptake of solutes after dermal application using the rat isolated perfused hindlimb preparation. In: *The Journal of pharmacy and pharmacology* 46 (10), S. 844–850.
- Dary, C. C.; Blancato, J. N.; Saleh, M. A. (2001): Chemomorphic analysis of malathion in skin layers of the rat. Implications for the use of dermatopharmacokinetic tape stripping in exposure assessment to pesticides. In: *Regulatory toxicology and pharmacology : RTP* 34 (3), S. 234–248.
- Draize, J. H.; Woodard, G.; Calvery, H. O. (1944): Methods for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes. In: *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* (82), S. 377–390.

- Dubin, A. E.; Patapoutian, A. (2010): Nociceptors. The sensors of the pain pathway. In: *The Journal of clinical investigation* 120 (11), S. 3760–3772.
- Europäische Kommission (2016): Bericht der Kommission an das Europäische Parlament und den Rat, 19.09.2016. Online verfügbar unter <https://ec.europa.eu/transparency/regdoc/rep/1/2016/DE/1-2016-599-DE-F1-1.PDF>, zuletzt geprüft am 04.01.2018.
- European Medicines Agency (1996): Note for guidance on the clinical requirements for locally applied, locally acting products containing known constituents. CPMP/EWP/239/95.
- European Medicines Agency (2010): Guideline for the Investigation of Bioequivalence. CPMP/EWP/QWP/1401/98 Rev. 1/ Corr **.
- European Medicines Agency (2011): Guideline on bioanalytical method validation. EMEA/CHMP/EWP/192217/2009 Rev. 1 Corr. 2**.
- European Medicines Agency (2014): Concept paper on the development of a guideline on quality and equivalence of topical products. CHMP/QWP/558185/2014.
- European Medicines Agency (2015): Guideline on similar biological medicinal products. CPMP/437/04 Rev 1.
- European Medicines Agency (2017a): Guideline on equivalence studies for the demonstration of therapeutic equivalence for products that are locally applied, locally acting in the gastrointestinal tract as addendum to the guideline on the clinical requirements for locally applied, locally acting products containing known constituents. CPMP/EWP/239/95 Rev. 1.
- European Medicines Agency (2017b): Questions & Answers Generic Applications. CMDh/272/2012 Rev. 3.
- Fáncsi, T.; Fehér, G. (1979): Ultrastructural studies of chicken embryo chorioallantoic membrane during incubation. In: *Anatomia, histologia, embryologia* 8 (2), S. 151–159.
- Food and Drug Administration (2002, inzwischen ungültig): Guidance for industry: Topical Dermatological Drug Product NDAs and ANDAs – In Vivo Bioavailability, Bioequivalence, In Vitro Release, and Associated Studies - Draft Guidance.
- Food and Drug Administration (1995): Guidance for industry: Topical dermatologic corticosteroids: In vivo bioequivalence.
- Food and Drug Administration (2014): Guidance for industry: Bioavailability and Bioequivalence Studies submitted in NDAs or INDs – General Considerations.
- Food and Drug Administration (2017): Product-Specific Guidances for Generic Drug Development. Online verfügbar unter <https://www.fda.gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm075207.htm>, zuletzt geprüft am 04.01.2018.
- Franz, T. J. (1975): Percutaneous absorption on the relevance of in vitro data. In: *The Journal of investigative dermatology* 64 (3), S. 190–195.
- Ganzberg, S.; Kramer, K. J. (2010): The use of local anesthetic agents in medicine. In: *Dental clinics of North America* 54 (4), S. 601–610.
- García Ortiz, P.; Hansen, S. H.; Shah, V. P.; Sonne, J.; Benfeldt, E. (2011): Are marketed topical metronidazole creams bioequivalent? Evaluation by in vivo microdialysis sampling and tape stripping methodology. In: *Skin pharmacology and physiology* 24 (1), S. 44–53.
- GD Gesellschaft für Dermopharmazie e.V. (2006): Vergleichbarkeit wirkstoffidenter Topika. Online verfügbar unter <http://www.gd-online.de/german/veranstalt/images2006/GD->

Stellungnahme_Vergleichbarkeit_wirkstoffidentischer_Topika_2006. pdf, zuletzt geprüft am 04.01.2018.

Goerig, M.; Bacon, D.; van Zundert, A. (2012): Carl Koller, cocaine, and local anesthesia. Some less known and forgotten facts. In: *Regional anesthesia and pain medicine* 37 (3), S. 318–324.

Groeben, H.; Grosswendt, T.; Silvanus, M.; Beste, M.; Peters, J. (2000): Lidocaine inhalation for local anaesthesia and attenuation of bronchial hyper-reactivity with least airway irritation. Effect of three different dose regimens. In: *European journal of anaesthesiology* 17 (11), S. 672–679.

Grosse-Siestrup, C.; Wiemer, P. M.; Fischer, T. C.; Fehrenberg, Claudia; Unger, Volker; Fischer, Axel; Groneberg, David A. (2002): Isolated hemoperfused porcine skin as a valid model to assess percutaneous absorption. In: *The Journal of investigative dermatology* 119 (1), S. 197–199.

Health Canada (1990): Submissions for Generic Topical Drugs. Online verfügbar unter <https://www.canada.ca/en/health-canada/services/drugs-health-products/drug-products/applications-submissions/policies/submissions-general-topical-drugs.html>, zuletzt geprüft am 04.01.2018.

Health Canada (2004): Draft Guidance for Industry: Preparation of Comparative Bioavailability Information for Drug Submissions in the CTD Format.

Herkenne, C.; Alberti, I.; Naik, A.; Kalia, Y. N.; Mathy, François-Xavier; Prémat, Véronique; Guy, Richard H. (2008): In vivo methods for the assessment of topical drug bioavailability. In: *Pharmaceutical research* 25 (1), S. 87–103.

Hiernickel, H. (1985): An improved method for in vitro perfusion of human skin. In: *The British journal of dermatology* 112 (3), S. 299–305.

Holden, C. (1988): Much work but slow going on alternatives to Draize test. In: *Science (New York, N.Y.)* 242 (4876), S. 185–186.

Holmdahl, M. H. (1998): Xylocain (lidocaine, lignocaine), its discovery and Gordh's contribution to its clinical use. In: *Acta anaesthesiologica Scandinavica. Supplementum* 113, S. 8–12.

Incecayir, T.; Agabeyoglu, I.; Derici, U.; Sindel, S. (2011): Assessment of topical bioequivalence using dermal microdialysis and tape stripping methods. In: *Pharmaceutical research* 28 (9), S. 2165–2175.

IMS PADDs Dataview 7.4.2 2012 (v.7.4.2), IQVIA, Durham, USA.

Jain, Y. (2014): Bioequivalence of Topical Dosage Forms. In: *J Pharmacovigilance* 02 (02).

Jocher, A.; Kessler, S.; Hornstein, S.; Schulte Mönning, J.; Schempp, C. M. (2005): The UV erythema test as a model to investigate the anti-inflammatory potency of topical preparations--reevaluation and optimization of the method. In: *Skin pharmacology and physiology* 18 (5), S. 234–240.

Jünger, M. (2005): Klinische, Phase I, randomisierte, doppelblinde Studie mit topischen, antimikrobiellen Präparaten (Teilbericht zu Furacin® Sol) (nicht veröffentlicht).

Kasha, P. C.; Banga, A. K.: Bioequivalence of Topical Dermatological Drug Products. Online verfügbar unter <https://pdfs.semanticscholar.org/5ba9/e472ec78666ecfb15c895118562897658195.pdf>, zuletzt aktualisiert am 04.01.2018.

Kietzmann, M.; Löscher, W. (1993): Die Verwendung von Schlachttierorganen zur Prüfung von Arzneimitteln. Eignung des Rindereuters zur Untersuchung von

hautwirksamen Stoffen. In: *DTW. Deutsche tierärztliche Wochenschrift* 100 (2), S. 54–57.

Kietzmann, M.; Löscher, W.; Arens, D.; Maass, P.; Lubach, D. (1993): 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. In: *Journal of pharmacological and toxicological methods* 30 (2), S. 75–84.

Kjaersgaard, A. R. (1954): Perfusion of isolated dog skin. In: *The Journal of investigative dermatology* 22 (2), S. 135–141.

Lademann, J.; Jacobi, U.; Surber, C.; Weigmann, H-J; Fluhr, J. W. (2009): The tape stripping procedure--evaluation of some critical parameters. In: *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V* 72 (2), S. 317–323.

Lange, J. de; van Eck, P.; Elliott, G. R.; Kort, W. L. de; Wolthuis, O. L. (1992): The isolated blood-perfused pig ear. An inexpensive and animal-saving model for skin penetration studies. In: *Journal of pharmacological and toxicological methods* 27 (2), S. 71–77.

Lehman, P. A.; Franz, T. J. (2014): Assessing topical bioavailability and bioequivalence. A comparison of the in vitro permeation test and the vasoconstrictor assay. In: *Pharmaceutical research* 31 (12), S. 3529–3537.

Lionberger, R. (2015): GDUFA Regulatory Science Update. Online verfügbar unter <https://www.fda.gov/downloads/Drugs/DevelopmentApprovalProcess/SmallBusinessAssistance/UCM445618.pdf>, zuletzt aktualisiert am 04.01.2018.

Lu, M.; Xing, H.; Chen, X.; Xian, L.; Jiang, J.; Yang, T.; Ding, P. (2016): Advance in bioequivalence assessment of topical dermatological products. In: *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences* 11 (6), S. 700–707.

Luepke, N. P. (1985): Hen's egg chorioallantoic membrane test for irritation potential. In: *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* 23 (2), S. 287–291.

Macfarlane, M.; Jones, P.; Goebel, C.; Dufour, E.; Rowland, J.; Araki, D. et al. (2009): A tiered approach to the use of alternatives to animal testing for the safety assessment of cosmetics. Skin irritation. In: *Regulatory toxicology and pharmacology : RTP* 54 (2), S. 188–196.

Metz, M. (2012): Randomisierte, Placebo-kontrollierte, doppelblinde Studie zur Überprüfung der Effekte von Polidocanol auf experimentell induzierten Juckreiz. DRKS Nr. DRKS00004279.

Narkar, Y. (2010): Bioequivalence for topical products--an update. In: *Pharmaceutical research* 27 (12), S. 2590–2601.

National Institute of Health Service (2003): Guideline for bioequivalence studies of generic products for topical use.

N'Dri-Stempffer, B.; Navidi, W. C.; Guy, R. H.; Bunge, A. L. (2009): Improved bioequivalence assessment of topical dermatological drug products using dermatopharmacokinetics. In: *Pharmaceutical research* 26 (2), S. 316–328.

Organisation for Economic Co-operation and Development (2004a): Guideline for the testing of chemicals. Skin absorption: in vitro method. (427).

Organisation for Economic Co-operation and Development (2004b): OECD series on testing and assessment Number 28 Guidance document for the conduct of skin absorption studies.

- Pittermann, W.; Jackwerth, B.; Schmitt, M. (1997): The isolated perfused Bovine Udder Skin Model. A new in vitro model for the assessment of skin penetration and irritation. In: *In Vitro Toxicology* (10), S. 17–21.
- Pittermann, W.; Kietzmann, M.; Jackwerth, B. (1995): Das isoliert perfundierte Rindereuter (Bovine Udder Skin-BUS Modell). Ein integriertes in vitro Modell zur Untersuchung von Hautpenetration und -irritation. In: *ALTEX* 12 (4), S. 196–200.
- Pittermann, W. F.; Kietzmann, M. (2006): Bovine Udder Skin (BUS). Prüfung von Hautverträglichkeit und Hautschutz. In: *ALTEX* 23 (2), S. 65–71.
- Raut, S. (2014): Novel approaches to increase transdermal absorption. In: *International Journal of Biopharmaceutics* (5(2)), S. 129–136.
- Rischbieter, W. (1913): Das isolierte Kaninchenohr als überlebendes Gefäßpräparat (nach Krawkow-Bissemski), zur Prüfung von Gefäßmitteln, speziell Adrenalin und Hypophysin. In: *Zeitschrift für die gesamte experimentelle Medizin* (1), S. 355–368.
- Riviere, J. E.; Bowman, K. F.; Monteiro-Riviere, N. A.; Dix, L. P.; Carver, M. P. (1986): The isolated perfused porcine skin flap (IPPSF). I. A novel in vitro model for percutaneous absorption and cutaneous toxicology studies. In: *Fundamental and applied toxicology : official journal of the Society of Toxicology* 7 (3), S. 444–453.
- Ruetsch, Y. A.; Böni, T.; Borgeat, A. (2001): From cocaine to ropivacaine. The history of local anesthetic drugs. In: *Current topics in medicinal chemistry* 1 (3), S. 175–182.
- Rzany, B. (2004): Randomisierte, doppelblinde, teilweise offene klinisch kontrollierte Studie zur Wirksamkeit und Verträglichkeit von Dioxopromethazinhydrochlorid (Prothanon Gel), Campher (Vapoin N Kühlgel) und Aloe Vera (Aloe Vera 97,5% Gel) in topischer Anwendung im Vergleich zu Placebo und / oder Nichtbehandlung bei Probanden mit provozierten Insektenstichen (*Aedes aegyptii*) (nicht veröffentlicht).
- Schempp, C. (2004): Untersuchung zur Förderung der Hautdurchblutung durch Externa, eine monozentrische, randomisierte Doppelblindstudie (nicht veröffentlicht).
- Schwarb, F. P.; Smith, E. W.; Haigh, J. M.; Surber, C. (1998): Bioequivalence testing on topical dermatological formulations, the gap between science and legislation. Proc. 2nd World Meeting APGI/APV, Paris, 25/28 May 1998.
- Scott, L.; Eskes, C.; Hoffmann, S.; Adriaens, E.; Alepée, N.; Bufo, M. et al. (2010): A proposed eye irritation testing strategy to reduce and replace in vivo studies using Bottom-Up and Top-Down approaches. In: *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA* 24 (1), S. 1–9.
- Shah, V. P.; Yacobi, A.; Rădulescu, F. Ş.; Miron, D. S.; Lane, M. E. (2015): A science based approach to topical drug classification system (TCS). In: *International journal of pharmaceutics* 491 (1-2), S. 21–25.
- Sivaraman, A.; Banga, A. (2015): Quality by design approaches for topical dermatological dosage forms. In: *RRTD*, S. 9.
- Soares, K. C. C.; Santos, G. M. L.; Gelfuso, G. M.; Gratieri, T. (2015): An Update of the Brazilian Regulatory Bioequivalence Recommendations for Approval of Generic Topical Dermatological Drug Products. In: *The AAPS journal* 17 (6), S. 1517–1518.
- Tetty-Amlalo, R. N. O.; Kanfer, I.; Skinner, M. F.; Benfeldt, E.; Verbeeck, R. K. (2009): Application of dermal microdialysis for the evaluation of bioequivalence of a ketoprofen topical gel. In: *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences* 36 (2-3), S. 219–225.
- Trommer, H.; Neubert, R. H. H. (2006): Overcoming the stratum corneum. The modulation of skin penetration. A review. In: *Skin pharmacology and physiology* 19 (2), S. 106–121.

- Verma, R. P.; Matthews, E. J. (2015): An in silico expert system for the identification of eye irritants. In: *SAR and QSAR in environmental research* 26 (5), S. 383–395.
- Vinardell, M. P.; Mitjans, M. (2008): Alternative methods for eye and skin irritation tests. An overview. In: *Journal of pharmaceutical sciences* 97 (1), S. 46–59.
- Wohlrab, J. (2010b): Bestimmung der Sicherheit der Anwendung von Hylase® Dessau 150 IU (bovine testikuläre Hyaluronidase) vs. Placebo als Adjuvans zur Lokalanästhesie bei der Wundheilung mittels Suction Blister Modell an gesunden Freiwilligen. DRKS Nr. DRKS 00000356.
- Wohlrab, J. (2010a): Doppelblinde, Block-randomisierte, plazebo-kontrollierte prospektive Studie mit intraindividuellem Vergleich zur Bestimmung von Wirksamkeit und Sicherheit von Hyaluronidase (Hylase® Dessau) versus Placebo als Adjuvans zur Lokalanästhesie. DRKS Nr. DRKS00000361.
- Wohlrab, J.; Klauck, D.; Savtcheva, E. (2014): Regulatorische Besonderheiten für Topika. In: *Der Hautarzt; Zeitschrift für Dermatologie, Venerologie, und verwandte Gebiete* 65 (3), S. 175–179.
- Wohlrab, J.; Sommer, E. (2015): Abschlussbericht: Untersuchung des ex vivo Penetrationsverhaltens von Lidocain an gestrippter Humanhaut Vergleich zwischen Prüfpräparat und Referenzpräparat.
- XLSTAT V2014.5.02 Add-on für MS Excel für MAC 2011 (V14.6.3), Addisonsoft, New York, USA.
- Yacobi, A.; Shah, V. P.; Bashaw, E. D.; Benfeldt, E.; Davit, B.; Ganes, D. et al. (2014): Current challenges in bioequivalence, quality, and novel assessment technologies for topical products. In: *Pharmaceutical research* 31 (4), S. 837–846.
- Zhai, H.; Zheng, Y.; Matravers, P.; Hicks, D. A.; Wiener, S.; Maibach, H. I. (2013): Bioequivalence in keratolytic activity of formulations vs its vehicle and comparator formulation. Randomized, double-blind clinical trial. In: *Skinmed* 11 (1), S. 21–25.
- Ziv, G.; Sulman, F. G. (1975): Absorption of Antibiotics by the Bovine Udder. In: *Journal of Dairy Science* 58 (11), S. 1637–1644.

Thesen der Dissertation

1. Für die Bewertung der Bioäquivalenz zweier topischer Präparate sind Wirkung und Nebenwirkung bedeutsam, zu deren Beurteilung für ersteres vor allem die lokale Bioverfügbarkeit, für zweiteres die Toxizität vergleichend untersucht werden müssen.
2. Präklinische Studien können ein ausreichendes Surrogat für klinische Studien zum Beleg der Bioäquivalenz von Topika hinsichtlich lokaler Bioverfügbarkeit und Toxizität sein.
3. In der vorliegenden Arbeit wurden zwei konzentrationsgleiche Lidocain-haltige Topika in einem präklinischen Validierungskonzept vergleichend untersucht.
4. Der Nachweis der pharmakokinetischen Äquivalenz wurde im Franz-Kammer-Modell an gesunder und standardisiert geschädigter Humanhaut erbracht.
5. Zur Validierung der lokalen Verträglichkeit wurden die Prüfpräparate vergleichend im HET-CAM-Verfahren untersucht und ein äquivalentes Verhalten nachgewiesen.
6. Bei gleicher Galenik (pharmazeutische Äquivalenz), gleichem Wirkstoffgehalt und gleicher qualitativer Zusammensetzung von Lidocain-haltigen Topika sind beide Verfahren in Kombination ausreichend, um die Bioäquivalenz zweier topischer Lidocain-haltiger Präparate zu bewerten.
7. Dadurch können klinische Studien zum Beleg der therapeutischen Äquivalenz in generischen Zulassungsverfahren für Lidocain-haltige Topika ersetzt werden.
8. In Anbetracht der internationalen Tendenz, die Zulassungsanforderungen für topische Generika substanzspezifisch zu beurteilen, stellen die Ergebnisse dieser Arbeit einen Beitrag für eine sichere und effiziente Verfahrensweise bei der generischen Zulassung von Lidocain-haltigen Topika dar.

Tabellarischer Lebenslauf

Der Lebenslauf wurde aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt.

Selbstständigkeitserklärung

Ich, Bianca Juha, erkläre ehrenwörtlich, dass ich die der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel „Präklinische Untersuchungen zur kutanen Bioäquivalenz topischer Präparate am Beispiel Lidocain-haltiger Sprays“ unter der Leitung von Prof. Dr. med. habil. Johannes Wohlrab selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertationsschrift aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Erklärung über frühere Promotionsversuche

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Universität ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertationsschrift vorgelegt.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem akademischen Lehrer, Herrn Professor Johannes Wohlrab, der mir durch die Überlassung des Themas diese Dissertation überhaupt ermöglicht hat. Ganz besonders danke ich Ihm für seine Hilfestellung, seinen Rat, für die langjährige Verbundenheit, seinen Zuspruch und nicht zuletzt für seine Geduld.

Danken möchte ich auch meiner Familie, vor allem meinem Mann und meiner Mutter, für all die Geduld, Unterstützung, das Verständnis und die Liebe während der Zeit der Verfassung dieser Arbeit.

Zu Dank verpflichtet bin ich auch den Mitarbeitern des Instituts für Dermatopharmazie, die mir bei Fragen stets mit Rat und Tat zur Seite standen.