

# Oleogele auf 12-Hydroxystearinsäurebasis als injizierbare Implantate zur kontrollierten Proteinfreisetzung

Dissertation

zur Erlangung des  
Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

der  
Naturwissenschaftlichen Fakultät I – Biowissenschaften –

der  
Martin-Luther-Universität  
Halle-Wittenberg

vorgelegt von  
Herrn Dipl.-Pharm. Johannes Kutza

geboren am 13.11.1984 in Eisenach

Gutachter/in

1. Prof. Dr. rer. nat. habil. Karsten Mäder
2. Prof. Dr. rer. nat. habil. Dr. h. c. Reinhard Neubert
3. Prof. Dr. rer. nat. habil. Werner Weitschies

Datum der Verteidigung: 18.06.2014

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1. Proteine . . . . .	1
1.2. Parenterale Depots . . . . .	3
1.2.1. Vorgeformte Implantate . . . . .	5
1.2.2. Mikropartikel . . . . .	6
1.2.3. Injizierbare Implantate . . . . .	8
1.2.3.1. <i>In-situ</i> -Präzipitation . . . . .	8
1.2.3.2. Thermoplastische Pasten . . . . .	10
1.2.3.3. Quervernetzende Systeme . . . . .	11
1.2.3.4. Organogele . . . . .	13
1.3. Zielstellung . . . . .	15
<b>2. Ergebnisse und Diskussion</b>	<b>17</b>
2.1. Entwicklung . . . . .	17
2.1.1. Auswahl der lipophilen Phase . . . . .	17
2.1.2. Physikalisch stabilisierte Emulsionsgele . . . . .	20
2.1.3. Auswahl des Emulgators . . . . .	22
2.1.4. Beladungskapazität . . . . .	24
2.2. Bestimmung der Tröpfchengröße . . . . .	26
2.2.1. Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie . . . . .	26
2.2.2. Phasenkontrastmikroskopie . . . . .	29
2.3. Gelstabilität . . . . .	29
2.3.1. Zentrifugation . . . . .	29
2.3.2. Lagerung . . . . .	29
2.3.3. Aktives Trennen der Emulsion . . . . .	33
2.4. pH-Wert-Messung . . . . .	35
2.5. Proteinstabilität . . . . .	40
2.5.1. Asymmetrische Fluss-Feldflussfraktionierung . . . . .	40
2.5.2. Elektronenspinresonanzspektroskopie . . . . .	42
2.6. Rheologie . . . . .	51
2.7. Messung der Injektionskraft . . . . .	56
2.8. Bestimmen der Gelbildungstemperatur . . . . .	59
2.8.1. Differenzialkalorimetrie . . . . .	59

---

2.8.2. Kernspinresonanzrelaxometrie . . . . .	61
2.9. <i>In-vitro</i> -Freisetzungsuntersuchungen . . . . .	63
2.9.1. Magnetresonanztomographie . . . . .	63
2.9.2. Entwicklung eines <i>In-vitro</i> -Freisetzungsmodells . . . . .	65
2.9.3. <i>In-vitro</i> -Freisetzungsuntersuchung mittels des entwickelten Modells	70
2.10. <i>In-vivo</i> -Freisetzungsuntersuchung . . . . .	73
<b>3. Zusammenfassung und Ausblick</b>	<b>77</b>
<b>4. Materialien und Methoden</b>	<b>80</b>
4.1. Materialien . . . . .	80
4.1.1. Lösungsmittel . . . . .	80
4.1.1.1. Wasser . . . . .	80
4.1.1.2. Organische Lösungsmittel . . . . .	80
4.1.2. Öle . . . . .	80
4.1.3. Emulgatoren . . . . .	80
4.1.4. Proteine . . . . .	81
4.1.5. Sonstiges . . . . .	81
4.2. Methoden . . . . .	82
4.2.1. Herstellung der Gele . . . . .	82
4.2.2. Mikroskopie . . . . .	82
4.2.2.1. Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie . . . . .	82
4.2.2.2. Phasenkontrastmikroskopie . . . . .	85
4.2.3. Gelstabilität . . . . .	85
4.2.3.1. Zentrifugation . . . . .	85
4.2.3.2. Lagerung . . . . .	86
4.2.3.3. Aktives Trennen der Emulsion . . . . .	86
4.2.4. Asymmetrische Fluss-Feldflussfraktionierung . . . . .	86
4.2.5. Rheologie . . . . .	87
4.2.6. Messung der Injektionskraft . . . . .	90
4.2.7. Differenzialkalorimetrie . . . . .	91
4.2.8. Kernspinresonanz . . . . .	91
4.2.8.1. Relaxometrie . . . . .	91
4.2.8.2. Magnetresonanztomographie . . . . .	91
4.2.9. Elektronenspinresonanzspektroskopie . . . . .	92
4.2.9.1. Spinmarkierung von Rinderserumalbumin . . . . .	92
4.2.9.2. Mobilitätsmessung . . . . .	92

---

4.2.9.3. pH-Wert-Messung . . . . .	92
4.2.10. Multispektrale Fluoreszenzbildgebung . . . . .	94
4.2.10.1. Theoretische Grundlagen . . . . .	94
4.2.10.2. <i>In-vitro</i> -Freisetzungsuntersuchungen . . . . .	95
4.2.10.3. <i>In-vivo</i> -Freisetzungsuntersuchungen . . . . .	95
<b>A. Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>i</b>
<b>B. Literaturverzeichnis</b>	<b>iii</b>
<b>C. Publikationsliste</b>	<b>xii</b>
<b>D. Danksagung</b>	<b>xiv</b>
<b>E. Lebenslauf</b>	<b>xv</b>
<b>F. Erklärung</b>	<b>xvi</b>

# 1. Einleitung

Im Jahre 2008 entwickelten Professor Dr. Rainer Rudolph und Professor Dr. Frank Bordusa die Pläne für das Protein-Kompetenznetzwerk-Halle: „tools, targets & therapeutics“ (ProNet-T<sup>3</sup>) [1]. Seit dem 01.11.2009 wird dieses durch das Bundesministerium für Bildung und Forschung der Bundesrepublik Deutschland im Rahmen des Programms „Spitzenforschung und Innovation in den Neuen Ländern“ gefördert (Förderkennzeichen: 03IS2211A). Der Inhalt sollte sich in drei Kernbereiche gliedern. Die „Entwicklung und Anwendung von proteinwissenschaftlich relevanten Technologien (Tools)“ [2], die „Identifikation und biologisch/medizinische Charakterisierung von Zielproteinen (Targets)“ [2] und die „Generierung von Proteinwirkstoffen und perspektivisch deren Überführung in die Anwendung, die Formulierung von Proteinwirkstoffen, die Identifikation und Testung von chemischen und proteinösen Wirkstoffen zur Adressierung von Zielproteinen einschließlich der Entwicklung funktioneller Proteinmaterialien für technische Applikationen (Therapeutics)“ [2]. Im Bereich „Therapeutics“ ist das Teilprojekt Th-03 mit dem Titel „Neue Freigabesysteme für die kontrollierte Freisetzung von Proteinen“ [1] angesiedelt. Diese Dissertation ist das Ergebnis der ersten drei Jahre dieses Teilprojektes. Die Vorgaben durch das Projekt sind für diesen Zeitraum die Entwicklung eines Systems zur kontrollierten Freisetzung von Proteinen sowie dessen Charakterisierung *in vitro*. Außerdem war die Durchführung erster *In-vivo*-Untersuchungen vorgesehen. Im Idealfall sollte eine Patentierung angestrebt werden [1].

## 1.1. Proteine

Die DNA trägt die Erbinformation einer jeden Zelle, vom einfachen Bakterium bis hin zum menschlichen Organismus. Über Triplets an Basenpaaren (Codons) verschlüsseln diese Makromoleküle Abfolgen von Aminosäuren. Durch Transkription in RNA und anschließende Translation zu Polypeptiden werden die Informationen zu aktiv agierenden Substanzen umgesetzt, die gegebenenfalls noch posttranslational modifiziert werden. An dieser Stelle sind unter anderem die spezifische Faltung durch Chaperone und Glykosilierung zu nennen, wodurch diese Makromoleküle in ihre aktive Form überführt werden [3].

Proteine unterscheiden sich von Peptiden – abgesehen von der Molmasse – durch ihren Aufbau, welcher sich aus vier sich überlagernden Strukturen zusammensetzt. Die einfachste Struktur ist die durch die DNA vorgegebene Aminosäuresequenz auch Primärstruktur genannt. Die Sekundärstruktur beschreibt die Faltung der Aminosäurekette durch Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Carbonylgruppe und Amidwasserstoff

zum Beispiel in Form der  $\alpha$ -Helix oder des  $\beta$ -Faltblattes. Die höhere räumliche Anordnung der Peptidkette beschreibt die Tertiärstruktur. Durch diese bilden sich wichtige Bereiche wie katalytische Zentren von Enzymen oder Bindungstaschen von Rezeptoren heraus. Durch die Zusammenlagerung von zwei oder mehreren identischen oder auch unterschiedlichen Peptidketten mit ihrer jeweiligen Tertiärstruktur kann sich schließlich eine Quartärstruktur ausbilden [3].

Proteine übernehmen zahlreiche Funktionen in der einzelnen Zelle und im Organismus. Sie katalysieren als Enzyme wichtige Stoffwechselreaktionen wie die Zellatmung, aber auch den Aufbau neuer und den Abbau alter oder fehlgefalteter Proteine. Sie bilden Rezeptoren oder Ionenkanäle und dienen als Botenstoffe, welche die verschiedensten Körperfunktionen induzieren oder hemmen können. Aus diesem Grund sind Proteine für Medizin und Pharmakotherapie von so großer Bedeutung, insbesondere seit über biotechnologische Verfahren die verschiedensten Proteine in ausreichenden Mengen zu relativ günstigen Preisen hergestellt werden können [4]. Durch die Gabe von Enzymen kann ein Mangel dieser oder auch eine durch einen Gendefekt verursachte Fehlfunktion ausgeglichen werden. Noch interessanter sind die als Botenstoffdienlichen Proteine. Durch zugeführtes Erythropoietin kann die Menge an roten Blutkörperchen z.B. bei Anämie erhöht werden. Hämophiliepatienten sind auf die Gabe von Gerinnungsfaktoren angewiesen. Auch bei Wachstumsfaktoren handelt es sich um Proteine. So befinden sich verschiedene Präparate mit Somatropin zur Behandlung des Kleinwuchses auf dem Markt. Die Gruppe der knochenmorphogenetischen Proteine (BMP) kann zur Behandlung von Knochendefekten oberhalb der kritischen Größe verwendet werden [5, 6]. Zum Abschluss seien noch die inzwischen zahlreichen monoklonalen Antikörper genannt, welche nahezu für jede Zielstruktur entwickelt werden können und viele neue Therapiemöglichkeiten eröffneten.

Trotz ihrer vielfältigen Möglichkeiten sind Proteine alles andere als das perfekte Therapeutikum. Aufgrund ihrer relativ großen molaren Masse können sie vom Immunsystem erkannt werden und als Antigen Immunantworten hervorrufen. Insbesondere Proteine nicht menschlicher Herkunft können hier teils schwere Reaktionen auslösen [7]. Neben diesem Risiko ist die Applikation ein kritischer Punkt. Auf peroralem Weg sind Proteine nicht verfügbar, da diese im Gastrointestinaltrakt denaturiert oder einfach verdaut werden. Neben der pulmonalen Anwendung [8, 9] und einigen Versuchen der bukkalen und nasalen Applikation ist die parenterale Gabe die verbreitetste Methode. Da Proteine jedoch das natürliche Substrat von Proteasen sind, die ubiquitär im menschlichen Körper vorkommen, stellt der schnelle Abbau ein erhebliches Problem dar. Dies resultiert entweder in einer hohen Applikationsfrequenz auf dem vom Patienten ungeliebten Weg der Injektion und eventuellen Complianceproblemen oder in der Gabe von sehr hohen Mengen, was der Pharmakoökonomie zuwider läuft. Das

Ziel muss es also sein, die Proteine so zu formulieren, dass diese selten appliziert werden müssen, aber gleichzeitig während der Verweildauer im Körper ausreichend vor abbauenden Enzymen geschützt sind [3].

Nicht nur nach der Applikation weisen Proteine problematische Eigenschaften auf. Bei der galenischen Formulierung müssen sowohl Tertiär- als auch Quartärstruktur erhalten bleiben. So können teilweise bereits Temperaturen geringfügig oberhalb der physiologischen Temperatur von 37 °C irreversible Veränderungen bewirken. Auch hohe Scherbelastungen in Lösung, ungünstige pH-Werte und die Anwesenheit verschiedener Substanzen wie organischer Lösungsmittel oder Harnstoff können eine Denaturierung auslösen [3]. Außerdem kann durch diese Einflüsse auch eine Aggregation zu Di-, Tri- und Oligomeren stattfinden, bei der die Faltung zwar erhalten bleibt, die Löslichkeit und Funktionalität aber vermindert oder verschwunden sein können. Darüber hinaus können Aggregate auch eine stärkere Immunogenität besitzen [10, 11].

Tabelle 1 auf Seite 4 zeigt eine Übersicht über aktuell in Deutschland auf dem Markt befindliche Proteinformulierungen. Auffällig ist, dass der bislang häufigste Mechanismus zur Verlängerung der Wirkdauer die subkutane Applikation ist. Jedoch bildet keines dieser Präparate ein Depot. Lediglich die verzögerte Resorption aus dem Unterhautfettgewebe verursacht eine Art Retardierung. Die einzige Ausnahme bilden die Peginterferone und Mircera. Durch die PEGylierung wird zwar ebenfalls keine Retardierung der Freisetzung erreicht, jedoch behindert die Modifizierung den Angriff von Immunsystem und Proteasen, wodurch die Verweilzeit im Körper erhöht und die Applikationsfrequenz erniedrigt ist. Präparate, welche die Wirkdauer über eine Depotbildung verlängern, sind für Proteine derzeit nicht auf dem Markt verfügbar [12].

## 1.2. Parenterale Depots

Als vermutlich erste parenterale Depotformulierung kann das Protamin-Zink-Insulin angesehen werden, das von Scott und Fisher bereits 1936 untersucht wurde [14], nachdem sie sich bereits zuvor auf Basis der Forschungen von Abel [15] und Harington [16] der Kristallisation von Insulin sowie den Einflüssen von Zink auf dessen Pharmakokinetik gewidmet hatten [17–19]. Es wurde festgestellt, dass sich die Insulinaktivität durch die Zinkionen auf 40% reduzierte. Jedoch war der Blutzuckerspiegel auch nach 10 h noch gesenkt. Die gesamte blutzuckersenkende Wirkung war dadurch identisch zu Standardinsulin. Die Ursache hierfür ist die Bildung von Hexameren durch Komplexierung des Zinks und die daraus resultierende verzögerte Resorption nach subkutaner Injektion [20, 21]. Durch diese verlangsamte Aufnahme konnte die Anzahl der Applikationen sowie die Häufigkeit der Hypoglykämie deutlich gesenkt werden [14].

**Tabelle 1:** Übersicht über aktuell in Deutschland auf dem Markt befindliche Proteinformulierungen. Zustand beschreibt die Art der Formulierung ( $f$  = Feststoff zur Herstellung einer Injektions- oder Infusionslösung,  $l$  = Injektions- oder Infusionslösung,  $k$  = Konzentrat zur Herstellung einer Injektions- oder Infusionslösung) [12, 13].

<i>Protein</i>	<i>Handelsname</i>	<i>Hersteller</i>	<i>Zustand</i>	<i>Applikation</i>
Somatropin	Genotropin <sup>®</sup>	Pfizer	f	s.c.
Menotropin	Menogon <sup>®</sup>	Ferring	f	i.m. / s.c.
Corifollitropin alfa	Elonca <sup>®</sup>	MSD	f	s.c.
Follitropin alfa	Gonal-f <sup>®</sup>	Merck Serono	f	s.c.
Gerinnungsfaktoren	Beriplex <sup>®</sup>	CSL Behring, Takeda	f	i.v.
	Octaplex <sup>®</sup>	Octapharma	f	i.v.
	Wilate <sup>®</sup>	Octapharma	f	i.v.
	Prothomplex <sup>®</sup>	Baxter	f	i.v.
Adalimumab	Humira <sup>®</sup>	AbbVie	l	s.c.
Catumaxomab	Removab <sup>®</sup>	Fresenius Biotech	k	i.p.
Cetuximab	Erbitux <sup>®</sup>	Merck Serono	l	i.v.
Denosumab	Prolia <sup>®</sup>	Amgen	l	s.c.
Eculizumab	Soliris <sup>®</sup>	Alexion	k	i.v.
Infliximab	Remicade <sup>®</sup>	MSD	f	i.v.
Natalizumab	Tysabri <sup>®</sup>	Biogen Idec	k	i.v.
Omalizumab	Xolair <sup>®</sup>	Novartis	l	s.c.
Palivizumab	Synagis <sup>®</sup>	AbbVie	f	i.m.
Ranibizumab	Lucentis <sup>®</sup>	Novartis	l	intravitreal
Trastuzumab	Herceptin <sup>®</sup>	Roche	f	i.v.
Interferon alfa-2a	Roferon <sup>®</sup>	Roche	l	s.c.
Interferon alfa-2b	IntronA <sup>®</sup>	MSD	l	s.c.
Interferon beta-1a	Rebif <sup>®</sup>	Merck Serono	l	s.c.
Interferon beta-1b	Betaferon <sup>®</sup>	Bayer Vital	l	s.c.
Interferon gamma-1b	Imukin <sup>®</sup>	Boehringer Ingelheim	l	s.c.
Peginterferon alfa-2a	Pegasys <sup>®</sup>	Roche	l	s.c.
Peginterferon alfa-2b	PegIntron <sup>®</sup>	MSD	l	s.c.
Epoetin beta	NeoRecormon <sup>®</sup>	Roche	l	s.c./i.v.
Methoxy-PEG-Epoetin beta	Mircera <sup>®</sup>	Roche	l	s.c./i.v.

Dieser Ansatz ist jedoch sehr spezifisch für Insulin und muss für jeden Arzneistoff individuell neu entwickelt werden. Moderne parenterale Depotformulierungen sind dagegen von solchen stoffspezifischen Eigenschaften wie Komplexbildung unabhängig. Im Folgenden seien diese Systeme kurz vorgestellt. Dabei wird sich auf Systeme beschränkt, welche ohne Operation appliziert werden können und nach erfolgter Wirkstofffreigabe vollständig abgebaut werden und demzufolge nicht wieder entfernt werden müssen.

### 1.2.1. Vorgeformte Implantate

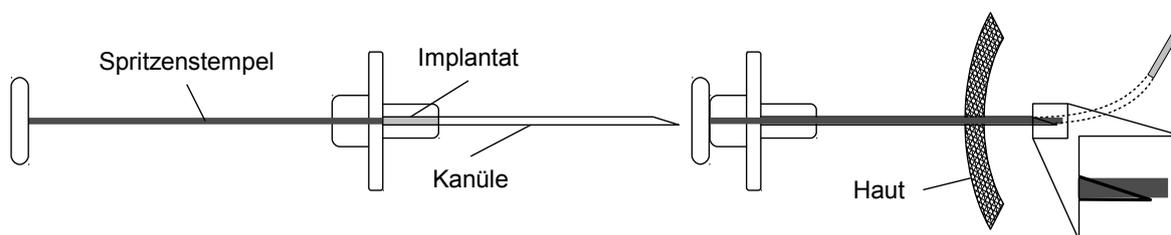
Vorgeformte Implantate werden durch Schmelzextrusion oder Kompression hergestellt. Durch die Anwendung von hohem Druck und Wärme wird der Arzneistoff zusammen mit einem bioabbaubaren Hilfsstoff zu dünnen Stäbchen geformt. Je nach gewünschter Kinetik kommen bei aktuellen Produkten derzeit Polymilchsäure (PLA) und Poly(milchsäure-co-glykolsäure) (PLGA) in verschiedenen Monomerenverhältnissen zum Einsatz. Diese werden zwar vollständig im Körper abgebaut, jedoch können die dabei entstehenden Monomere Glykol- und Milchsäure den pH-Wert stark absenken. Diese Implantate sind, wie in Abbildung 1 am Beispiel von Profact<sup>®</sup> Depot, Sanofi, dargestellt, beim Fertigarzneimittel bereits in der Kanüle platziert. Durch den dünnen Kanülenstempel wird das Implantat durch die Kanüle geschoben. Zur Kontrolle ist der Stempel am Ende der Kanüle nach der Applikation sichtbar.

Neben den Implantaten auf Polymerbasis gibt es auch Versuche zu Systemen auf Lipidbasis [22, 23]. Als biologische Produkte können diese durch spezifische Enzyme – die Lipasen – im Körper abgebaut werden. Die festen Implantate werden dabei langsam genug abgebaut, um eine Freisetzung über mehrere Monate teilweise sogar Jahre zu ermöglichen [23]. Dabei ist es jedoch fraglich, ob solche extrem langen Intervalle sinnvoll sind, denn nach erfolgter Applikation ist jede weitere Einflussnahme auf die Therapie bis zur abgeschlossenen Freisetzung mit großem Aufwand verbunden. Darüber hinaus ist eine Toxizität aufgrund der Herkunft zwar nicht zu erwarten, zuverlässige Daten dazu fehlen jedoch bislang [24]. Aufgrund der Gewinnung aus biologischem Material sind auch die Reinheit sowie die gleichbleibende Zusammensetzung zu klärende Fragen.

Vorteilhaft an dieser Arzneiform ist die durch die Vorformung definierte Oberfläche und Gestalt. Dies ermöglicht eine reproduzierbare Freisetzungskinetik. Mit den aktuellen Marktpräparaten (Tabelle 2 auf Seite 6) sind so eine bis zu drei Monate anhaltende Freisetzung möglich. Nachteilig ist dagegen der große Kanüldurchmesser (Profact<sup>®</sup> Depot 1,7 mm Außendurchmesser) der nötig ist, um das Implantat fassen zu können. Deshalb wird in der Fachinformation zu Profact<sup>®</sup> Depot sogar die Gabe eines Lokalanästhetikums empfohlen. Für Proteine sind zusätzlich die hohen Belastungen während der Herstellung problematisch.

**Tabelle 2:** Aktuelle Marktpräparate mit vorgeformten Implantaten in Deutschland [12, 13]

Wirkstoff	Wirkstoffklasse	Handelsname	Matrix	Hersteller
Buserelin	Peptid	Profact®	Poly(milchsäure-co-glykolsäure)	Sanofi
Goserelin	Peptid	Zoladex®	Poly(milchsäure-co-glykolsäure)	AstraZeneca
Leuprorelin	Peptid	Leuprorelin® 1 Monat	Poly(milchsäure-co-glykolsäure)	Hexal
		Leuprorelin® 3 Monate	Polymilchsäure	Hexal

**Abbildung 1:** Schematische Darstellung des Aufbaus (links) und der Anwendung (rechts) von Profact® Depot, Sanofi, modifiziert nach Referenz [25]. Der Spritzenstempel ragt nach der Applikation aus dem offenen Ende der Kanüle heraus.

### 1.2.2. Mikropartikel

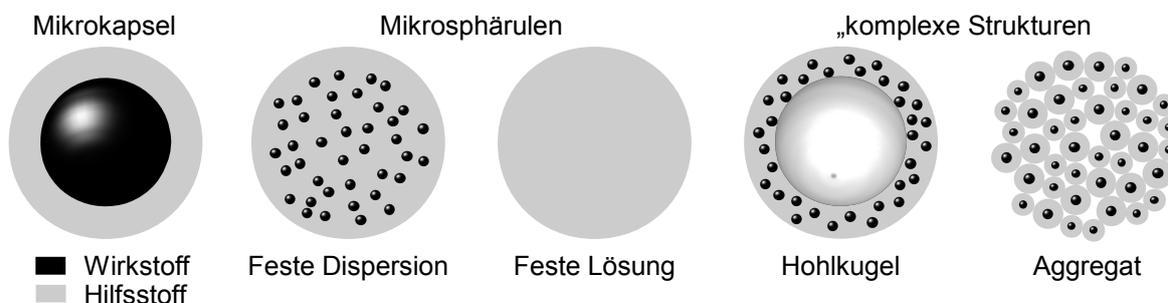
Ursprünglich bezeichnete der Begriff Mikropartikel alle Partikelgrößen im Bereich von 1–1000  $\mu\text{m}$  [26]. Als Arzneiform liegt die gebräuchliche Größe bei 1–100  $\mu\text{m}$  [27]. Dabei werden die drei Grundtypen Mikrokapsel, Mikrosphärule und Mikropartikel mit komplexen Strukturen unterschieden. In den Sphärulen kann der Wirkstoff dabei suspendiert oder gelöst vorliegen. Komplexe Strukturen sind Hohlkugeln und Aggregate (siehe Abbildung 2). Die Matrix besteht wie bei den vorgeformten Implantaten aus einem bioabbaubaren Hilfsstoff, in der Regel Polymere (vergleiche Tabelle 3).

Die Herstellung lässt sich im Wesentlichen auf drei Verfahren reduzieren: Phasentrennverfahren zur Mikroverkapselung, die Emulsionsmethode sowie Sprühtrocknung. Beim Phasentrennverfahren (Koazervation) wird der zu verkapselnde Wirkstoff als Flüssigkeit oder Feststoff in einer Lösung des verkapselnden Hilfsstoffs dispergiert. Anschließend wird die Phasentrennung durch eine geeignete Maßnahme ausgelöst. Der Hilfsstoff beginnt unter verschiedenen Voraussetzungen sich auf der Oberfläche der dispersen Phase abzuschneiden und hüllt diese schließlich ein.

Bei der Emulsionsmethode wird der Hilfsstoff in einem organischen nicht mit Wasser mischbaren leicht flüchtigen Lösungsmittel solvatisiert und der Wirkstoff – z.B. das

**Tabelle 3:** Aktuelle Marktpräparate mit Mikropartikeln in Deutschland [12, 13].

Wirkstoff	Wirkstoffklasse	Handelsname	Matrix	Hersteller
Exenatid	Peptid	Bydureon	PLGA	Lilly
Triptorelin	Peptid	Decapeptyl	PLGA	Ferring
		Pamorelin	PLGA	Ipsen
		Salvacyl	PLGA	Pfleger
Leuprorelin	Peptid	Enantone	PLGA	Takeda
		Trenantone	PLA	Takeda
		Sixantone	PLA	Takeda
Octreotid	Peptid	Sandostatin	PLGA	Novartis

**Abbildung 2:** Schematische Darstellung der verschiedenen Typen von Mikropartikeln, modifiziert nach Referenz [28].

Protein – in Wasser gelöst. Anschließend wird die wässrige Phase im organischen Lösungsmittel emulgiert (W/O-Emulsion). Diese Primäremulsion wird nun wiederum als innere Phase in Wasser emulgiert. Es entsteht eine W/O/W-Emulsion. Unter der Voraussetzung, dass das Lösungsmittel trotz seiner Nichtmischbarkeit mit Wasser darin in kleinen Mengen löslich ist, wird dieses nun nach und nach in die äußere Wasserphase übergehen und kann dort z.B. durch Anlegen eines Vakuums entfernt werden. Dadurch präzipitiert der Hilfsstoff und bildet die Partikel. Anschließend werden diese getrocknet.

Bei der Sprühtrocknung wird der Wirkstoff in einer organischen Hilfsstofflösung dispergiert oder ebenfalls gelöst und diese Suspension bzw. Lösung sprühgetrocknet. Durch das schnelle Trocknen der fein versprühten Tröpfchen wird der Wirkstoff vom Hilfsstoff eingeschlossen [28–30].

Im Gegensatz zu den vorgeformten Implantaten können Mikropartikel – je nach hergestellter Größe – durch deutlich dünnere Kanülen appliziert werden. Für die von Mizushima et. al. 2006 hergestellten Partikel mit einer Größe von 5  $\mu\text{m}$  war z.B. eine 27 G Kanüle ausreichend [31]. Jedoch gibt es – auch in Hinblick auf die Formulierung

von Proteinen – einige Nachteile. Die Herstellung polymerhaltiger Mikropartikel, wie sie zur Depotbildung benötigt werden, ist mit der Verwendung von organischen Lösungsmitteln und zum Teil hohen Scherkräften verbunden. Beides kann sich negativ auf die Stabilität der Proteine auswirken. Außerdem beschränkt der sinkende pH-Wert durch die Zunahme von Milchsäure- und/oder Glykolsäuremonomeren die Anwendung auf säureunempfindliche Arzneistoffe. Dies schließt jedoch nicht alle Proteine aus. So gelang es Lochmann et. al. 2010 rhBMP-2 als PLGA-Mikropartikel zu formulieren [5]. Darüber hinaus gibt es bei Mikropartikeln ein generelles Problem. Die einzelnen Partikel verbleiben nicht ohne weitere Maßnahmen am Injektionsort [32]. Für die systemische Applikation ist dies zwar unerheblich. Bei lokalen Therapien jedoch muss sich das System während der gesamten Freisetzungsdauer am Ort der Wirkung befinden, wodurch weitere Maßnahmen erforderlich werden.

### 1.2.3. Injizierbare Implantate

Sich *in situ* ausbildende feste oder halbfeste Implantate werden als Gel mit Fließgrenze oder als Flüssigkeit injiziert und bilden anschließend durch Ruhe oder andere Faktoren ein entsprechendes Depot. Der Vorteil dieses Prinzips: die Injektion ist durch eine relativ dünne Kanüle möglich. Obwohl es jedoch bereits vor über 20 Jahren das erste Patent dazu gab, ist bis heute nur ein einziges Präparat in Deutschland auf dem Markt [33]. Im Folgenden sei eine Auswahl verschiedener Möglichkeiten zur *In-situ*-Implantatbildung vorgestellt.

#### 1.2.3.1. *In-situ*-Präzipitation

*In-situ*-präzipitierende Implantate bestehen aus Polymeren, welche vor der Applikation gelöst vorliegen. Der Wirkstoff kann ebenfalls gelöst vorliegen, aber auch eine Suspendierung ist möglich. Nach der Injektion wird das Polymer durch einen endogenen Einfluss desolvatisiert. Es präzipitiert und formt das Implantat. Ein solcher Einfluss kann ein Lösungsmittelaustausch, die Angleichung an den physiologischen pH-Wert oder aber auch das Erwärmen auf Körpertemperatur sein [34].

#### Präzipitation durch Lösungsmittelaustausch

Wird ein in Wasser unlösliches Polymer in einem mit Wasser mischbaren organischen Lösungsmittel gelöst und diese Lösung injiziert, erfolgt ein Lösungsmittelaustausch zwischen dem Implantat und der hydrophilen Umgebung. Das Lösungsmittel diffundiert in die umliegenden Gewebe und Wasser umgekehrt in das Implantat. Dadurch verschlechtert sich die Löslichkeit des Polymers und es beginnt zu präzipitieren. Dabei wird darin gelöster oder suspendierter Arzneistoff vom ausfallenden Polymer eingeschlossen und erst durch die langsame Erosion des Implantates oder Diffusion freigegeben.

Mit ELIGARD® (Astellas Pharma) hat es bislang ein Präparat, welches diese Technik ausnutzt, auf den deutschen Markt geschafft. Dieses Fertigarzneimittel verwendet das Polymer Poly(milchsäure-co-glykolsäure) und N-Methylpyrrolidon als Lösungsmittel. Aufgrund mangelnder Stabilität des Arzneistoffes (Leuprorelinacetat) im Lösungsmittel liegt dieser durch ein Zweispritzensystem getrennt davon vor. Unmittelbar vor der Applikation muss der Wirkstoff im N-Methylpyrrolidon gelöst werden.

Da N-Methylpyrrolidon für den Organismus nur begrenzt verträglich ist, gibt es auch Versuche mit anderen, verträglicheren Lösungsmitteln zu arbeiten. So haben Kempe et. al 2010 Untersuchungen zur Substitution des N-Methylpyrrolidon durch Polyethylenglykol veröffentlicht und zeigten viele Vorteile des neuen Lösungsmittels auf [35, 36].

Neben PLGA können auch andere Polyester von Hydroxysäuren, sowie Polyanhydride und Polyorthoester verwendet werden, wobei PLGA, PLA und Poly- $\epsilon$ -caprolacton (PCL) aufgrund ihrer Zulassung durch die US-amerikanische *Food and Drug Administration (FDA)* am gebräuchlichsten sind [34]. Alle diese Polymere haben jedoch eine Gemeinsamkeit. Bei ihrem Abbau – Esterhydrolyse oder Spaltung des Säureanhydrids – entstehen wie schon zuvor erwähnt Carboxylgruppen, wodurch die Problematik des absinkenden pH-Wertes bleibt. Dennoch gibt es auch hier schon länger Versuche Proteine auf diese Weise zu formulieren [37, 38].

### **pH-induzierte Gelbildung**

Wird eine Lösung mit einem nicht physiologischen pH-Wert injiziert, gleicht sich dieser nach einer gewissen Zeit dem der Umgebung an. Dabei kann sich die Löslichkeit von Polymeren mit pH-abhängigen funktionellen Gruppen wie Amino- und Carboxylgruppen ändern. Chitosan ist ein Amino-Polysaccharid [39], welches durch Protonierung bei sauren pH-Werten wasserlöslich ist. Durch eine Anhebung auf physiologische pH-Werte präzipitiert es und bildet ein Gel. Dieses zeigt jedoch eine recht schnelle Freisetzungskinetik und eine geringe mechanische Stabilität [34, 40, 41]. Da größere Abweichungen vom physiologischen pH-Wert bei der Ausgangslösung leicht zu Reizungen führen können, ist diese Methode nur begrenzt einsetzbar.

### **Thermisch induzierte Gelbildung**

Das Ausnutzen der Körperwärme stellt einen weitaus verträglicheren Ansatz zur Gelierung dar als pH-Unterschiede. Durch Überschreiten einer unteren kritischen Gelbildungstemperatur wird ein Polymer zum Präzipitieren gebracht. Die Ursache hierfür ist das Gleichgewicht aus hydrophilen und hydrophoben Anteilen [42]. Die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Wasser und Polymer verlieren an Stärke, wodurch die Polymer-Polymer-Wechselwirkungen in den Vordergrund treten und sich ein Netzwerk oder Aggregate ausbilden [34]. Ein solches Verhalten zeigen zum Beispiel Lösungen von Poloxameren, einem ABA-Blockpolymer von Polyethylenglykol (A) und Polypro-

pylenglykol (B) [34]. Poloxamer 188 geliert ab Konzentrationen von 20 % bei 32 °C, unter Zusatz von Salzen und Tensiden bei bis zu 37 °C [34]. Der genaue Gelbildungsmechanismus wurde sehr ausgiebig untersucht [43–45] und begründet sich auf einer Mizellbildung als Folge der Dehydratisierung des Polypropylenbereichs des Poloxamers oberhalb der kritischen Mizellbildungstemperatur [42], welche sich ab einer gewissen Konzentration berühren und sich durch die dichte Packung ein festes Gel ausbildet [46]. Oberhalb einer zweiten kritischen Temperatur löst sich das Gel wieder und es bildet sich eine trübe Lösung [47]. Das Polymer kann zwar nicht vom Körper abgebaut werden, jedoch liegt es mit einer Molmasse von ca.  $8400 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$  unter der Nierenschwelle. Aufgrund der hohen Konzentration, welche für eine Gelbildung benötigt wird, steigt allerdings die Osmolarität, was wiederum Einfluss auf die Verträglichkeit hat. Deshalb werden diese Systeme bislang nicht parenteral angewendet. Mit Ligosan<sup>®</sup> Slow Release von Heraeus Kulzer ist derzeit ein Präparat zur periodontalen Applikation (in die Zahnfleischtasche) von Doxycyclin auf dem Markt [13].

Ähnlich der Poloxamere verhalten sich ABA Triblockpolymere aus Polyethylenglykol(A) und Poly(milchsäure-co-glykolsäure). Diese zeigen eine konzentrationsabhängige Gelierung im Bereich von 30 und 40 °C ab ca. 20 % wobei die Gelierungstemperatur mit steigender Konzentration sinkt. Ebenfalls wie bei den Poloxameren zeigt sich auch hier eine zweite kritische Temperatur, oberhalb welcher sich wieder ein Sol ausbildet [48]. Für diese Systeme konnte eine Abhängigkeit der Freisetzungskinetik von der Lipophilie gezeigt werden, welche für das lipophile Spironolacton 2 Monate und für das hydrophile Ketoprofen 2 Wochen andauerte [49]. Ein Protein würde aufgrund seiner Hydrophilie demzufolge recht schnell freigesetzt werden.

Chenite et. al. veröffentlichten 2000 eine weitere Möglichkeit ein System mit thermisch induzierter Gelbildung herzustellen [50]. Dies erfolgte auf Basis von Chitosan. Durch Zugabe von Polyolsalzen wie z.B.  $\beta$ -Glycerolphosphat erfolgte die Umwandlung der pH-gesteuerten Gelbildung in eine temperaturabhängige. Dabei zeigten sich folgende Vorteile. Chitosan ist biokompatibel und bioabbaubar [51, 52]. Außerdem besitzt die fertige Injektionslösung einen pH-Wert von 7,15 [50]. Dieses System ist inzwischen weitreichend als Freisetzungssystem untersucht worden. So wurde Insulin über einen Zeitraum von zwei Wochen freigesetzt [53]. Außerdem wurde das System als Träger für rhBMP-2 haltige Mikropartikel verwendet [32], wobei jedoch die Kontrolle über die Freisetzung nicht allein durch das Gel erfolgte, sondern zum einem bedeutenden Teil von den Mikropartikeln übernommen wurde.

### 1.2.3.2. Thermoplastische Pasten

Die thermoplastischen Pasten sind teilweise mit den *in situ* präzipitierenden Implantaten vergleichbar. Beide Systeme können in flüssigem Zustand appliziert werden und

verfestigen sich danach. Im Gegensatz zu den zuvor diskutierten Implantaten tritt bei den thermoplastischen Pasten keine Phasentrennung auf. Sie besitzen eine Glasübergangstemperatur oder einen Schmelzpunkt oberhalb der Körpertemperatur und können so im erwärmten flüssigen Zustand injiziert werden. Die Aushärtung erfolgt durch Abkühlung. Zum Einsatz kommen Polymere wie Polyanhydride, Poly- $\epsilon$ -caprolacton, Polymilchsäure sowie PLA-PEG-PLA-Triblockcopolymere. Teilweise liegen hierbei die Glasübergangstemperaturen so hoch, dass Temperaturen von 60 °C und darüber benötigt werden [34], was starke Schmerzen und nekrotischen Gewebeuntergang mit anschließendem Einschluss in Narbengewebe zur Folge hat [54]. Erst durch die Entwicklung von Polyorthoestern durch Heller et. al. [55, 56] standen durch Glasübergangstemperaturen von 35–45 °C biokompatible und bioabbaubare Systeme zur Verfügung [57].

### 1.2.3.3. Quervernetzende Systeme

Neben der Präzipitation und dem Ausnutzen von Glasübergängen ist die *In-situ*-Quervernetzung eine weitere Möglichkeit zum Erzeugen von Gelimplantaten. Diese kann durch drei unterschiedliche Einflüsse ausgelöst werden. Durch Lichteinwirkung durch die Haut hindurch kann eine radikalische Polymerisation gestartet werden. Über chemische Zusätze kann unter anderem ebenfalls eine solche ausgelöst werden, aber auch andere chemische Reaktionen sind möglich. Darüber hinaus können durch elektrostatische Wechselwirkungen oder Wasserstoffbrückenbindungen Vernetzungen erfolgen, die sich unter der Belastung der Injektion lösen und anschließend wieder formieren.

#### Polymerisation durch Lichteinwirkung

Durch energiereiches Licht können labile Doppelbindungen zu einer Einfachbindung und zwei Radikalen aufgebrochen werden. Bei diesen reaktiven Spezies besteht nun die Möglichkeit mit einer weiteren Doppelbindung zu reagieren, wodurch erneut zwei Radikale entstehen. Somit kommt es zu einer Kettenreaktion. Das wohl bekannteste Beispiel für radikalische Polymerisation ist Acrylsäure und deren Derivate. Der Nachteil dieser Polymere ist deren nicht vorhandene Bioabbaubarkeit. Abhilfe schaffen hier mit Acrylsäurederivaten modifizierte andere Polymere. So modifizierten Leach et. al. Hyaluronan mit Glucidylmethacrylat. Anschließend wurden Lösungen des Polymers mit Konzentrationen von 0,5–2 % in Puffer gelöst und ultraviolettem Licht ( $\lambda = 365 \text{ nm}$ ) ausgesetzt. Dies startete die radikalische Reaktion und die Methacrylatseitengruppen vernetzten. Die Freisetzungsgeschwindigkeit von Rinderserumalbumin aus diesen Gelen war jedoch äußerst schnell. Durch die Verwendung von PLGA-Mikropartikeln konnte diese verzögert werden [58], jedoch lag die Kontrolle dabei nicht mehr beim Hydrogel. Ein weiteres Problem ist die geringe Eindringtiefe von ultraviolettem und kurzwelligem sichtbarem Licht, wodurch die Gelierung von der Injektionstiefe abhängt [59]. So

beträgt die Transmission durch 3 mm dicke Schweinehaut für Licht mit einer Wellenlänge von 360 nm nur ca. 0,02 % während sie für Licht mit 550 nm 10 % beträgt [60]. Der optimale Wellenlängenbereich liegt zwischen 650 und 900 nm [61] also im tiefroten bis nahen infraroten Bereich. Jedoch mangelt es bislang an mit diesen energiearmen Wellenlängen anregbaren Photoinitiatoren [62].

### **Chemische Quervernetzung**

Für die chemische Quervernetzung ist ein entsprechender „Crosslinker“ notwendig, welcher die Querverbindung zwischen zwei Polymerketten herstellt. Häufig werden dafür homobifunktionale Substanzen, also solche, welche an beiden Enden die gleiche reaktive Gruppe tragen, verwendet. Für Chitosan sind Reaktionen mit Dialdehyden wie Glyoxal oder Glutaraldehyd in der Literatur beschrieben [40]. Die Aldehyde reagieren dabei mit den Aminogruppen des Chitosans zu einer kovalenten Iminbindung, wobei aber auch Reaktionen z.B. mit Hydroxylgruppen stattfinden können. Jedoch sind Dialdehyde in der Regel toxisch. Auch für andere gebräuchliche Substanzen zur Quervernetzung wie Diethylquadratrat und Oxalsäure wurde eine gewissen Toxizität nachgewiesen oder sie sind nicht ausreichend untersucht [63, 64]. Genipin ist dagegen eine relativ vielversprechende Alternative zu den zuvor genannten Substanzen. Sowohl *in vitro* [65] als auch in Ratten [66] wurde eine Biokompatibilität nachgewiesen. Eine Quervernetzung konnte damit z.B. für Gelatine erreicht werden [67].

Eine weitere Variante ist die Oxidation von Thiolgruppen zu Disulfiden und die daraus resultierende Verbindung zwischen zwei Polymeren. Die Polymere müssen dafür jedoch zunächst mit einer Thiolgruppe versehen werden (Thiomere). Dies wurde bislang z.B. mit Gellan [68], Chitosan [69, 70] und Hyaluronan [71, 72] in der Literatur beschrieben. Auch ein thiolgruppentragendes PEG-Copolymer wird genannt, woraus Rinderserumalbumin und Erythropoietin über mehrere Wochen freigesetzt werden konnten [73]. Da diese Reaktion unter Sauerstoff von allein abläuft, müssen keine weiteren unter Umständen toxischen Reagenzien zugesetzt werden. Jedoch kann bei subkutaner Applikation der geringere Sauerstoffpartialdruck der Umgebung die Reaktion behindern. Darüber hinaus ist nicht ausgeschlossen, dass die Disulfidbrücken sich auch zu Proteinen ausbilden und diese damit an der Freisetzung gehindert oder gar deren interne Disulfidbrücken gespalten werden.

### **Physikalische Quervernetzung**

Physikalisch quervernetzte Gele sind in ihrer Stabilität häufig den chemisch vernetzten Varianten unterlegen. Da deren Bindungen jedoch nicht kovalent sondern reversibler Art sind – z.B. Wasserstoffbrückenbindungen oder elektrostatische Wechselwirkungen – können diese sich nach einer Auftrennung wieder ausbilden. Während der Injektion tritt eine relativ hohe Scherbelastung auf. Wird dadurch eine Scherverflüssigung verursacht,

so ist diese bei physikalisch quervernetzten Systemen größtenteils reversibel. Während der Ruhe nach der Applikation bilden sich die Bindungen wieder aus und das Gel verfestigt sich wieder. Chemisch quervernetzte Systeme verhalten sich dagegen eher rheodestruktiv. Sind die Verbindungen einmal zerstört, ist dieser Zustand von Dauer.

Ein Beispiel für ein scherverflüssigendes System ist das Gel des nativen Hyaluronan, welches in der Vergangenheit schon als Träger von Arzneistoffen, Proteinen und Peptiden untersucht wurde [74, 75]. Im Falle dieses Systems stehen zur Quervernetzung ausschließlich Wasserstoffbrückenbindungen zur Verfügung. Bei Alginatgelen wird zusätzlich die vernetzende Wirkung von divalenten Kationen z.B. Calcium ausgenutzt. Eines dieser Ionen bindet gleichzeitig an die freien Carboxylgruppen von zwei Alginat-Polysaccharidketten und vernetzt diese so. Jedoch reichen nur die Calciumkonzentrationen im Auge aus, eine ausreichende Gelierung auszulösen [76, 77]. Bindungen über gegensätzlich geladene Ionen sind zwischen zwei verschiedenen Polymeren auch ohne Ionen möglich, sofern eines davon einen Überschuss an negativen das andere einen Überschuss an positiven Ladungen trägt. Die auf diese Weise entstehenden Systeme werden Polyelektrolytkomplexe genannt [40, 41]. So bilden Chitosan mit seiner positiven und Hyaluronan [78] mit seiner negativen Ladung einen solchen Komplex, aber auch Alginat und Gelatine sind mögliche Komplexpartner [79]. Da die Ladungen in Form von Amino- und Carboxylgruppen vorliegen und erst durch Protonierung bzw. Deprotonierung entstehen, sind diese – und damit auch die Komplexe – vom pH-Wert abhängig.

#### 1.2.3.4. Organogele

Alle bisher diskutierten injizierbaren Implantate basieren auf Polymeren und teilweise Wasser. Neben diesen gibt es jedoch wie schon bei den vorgeformten Implantaten auch Systeme welche auf Lipiden basieren. Die Vor- und Nachteile dieser Stoffklasse wurden bereits in Kapitel 1.2.1 diskutiert. Die Gelierung von flüssigen Lipiden erfolgt durch meist niedermolekulare Gelatoren, welche sich zu einer Matrix anordnen und so die zusammenhängende Lipidphase binden [34]. Die Herstellung ähnelt sich bei den verschiedenen Systemen stark. Der Gelator wird in einem flüssigen Lipid unter Erhitzen gelöst. Beim Abkühlen nimmt dessen Löslichkeit wieder ab und er beginnt zu aggregieren. Dabei werden faserartige Strukturen ausgebildet. Gebräuchliche Organogelatoren sind L-Alanin-Fettsäure-Derivate wie z.B. *N*-Stearoyl-L-Alaninmethylester und *N*-Stearoyl-L-Alaninethylester [80] und Glycerolfettsäureester wie Glycerolmonooleat, -monopalmitostearat (Precirol®) und -monolinoleat [34]. Außerdem werden Ethylcellulose- und 12-Hydroxystearinsäure-Gele beschrieben [81].

L-Alanin-Fettsäure-Derivate bilden über Van-der-Waals-Kräfte und Wasserstoffbrückenbindungen z.B. mit Färberdistelöl ein hochviskoses Gel [34]. Um dessen Spritz-

barkeit zu verbessern kann 10 % *N*-Methylpyrrolidon zugesetzt werden, welches nach der Applikation aus dem System herausdiffundiert. Daraus konnte Leuprorelin für 14–25 Tage freigesetzt werden. Eine chemische Kastration durch Inhibierung der Testosteronesekretion gelang für bis zu 50 Tage [82]. Die Rivastigminfreigabe wurde über 11 Tage verzögert. Hierbei ist die geringe initiale Freisetzung von unter 15 % hervorzuheben [83]. Dabei wurde außerdem eine gute Biokompatibilität festgestellt [82].

Die in Wasser unlöslichen monosubstituierten Glycerole bilden lyotrope Flüssigkristalle und ab einem Wassergehalt von 35 % kubische Phasen mit gelartigem Charakter [34]. Die Freisetzungskinetik aus diesen hochviskosen Systemen ist von der Wasserlöslichkeit des Arzneistoffs abhängig. So wurde Insulin aus Glycerolmonooleat innerhalb von 4 Tagen freigesetzt während bei Somatostatin nur 6 h möglich waren. Durch die Zugabe von pflanzlichem Öl konnte die Spritzbarkeit und die Freisetzungsdauer verbessert werden [34]. Ein System aus dem polyglykolysierten Aprikosenkernöl Precirol® [84] konnte mit Levonorgestrel und Ethinylestradiol beladen in Ratten den Sexualzyklus für 40 Tage blockieren [85]. Die Wirkdauer entsprach dabei der Zeit, die für den Abbau von Glycerolmonooleat durch Lipasen benötigt wird. Deshalb wurde ein erosionskontrollierter Freisetzungsmechanismus angenommen. Die trotz aller Maßnahmen immer noch recht hohe Viskosität und damit schlechte Spritzbarkeit führte zur Entwicklung niedrigviskoser Systeme, welche erst durch Kontakt mit Wasser *in situ* kubische Phasen ausbilden. Diese entstehen bei der Mischung von geschmolzenen Monoglyceriden, Cosolventien wie Ethanol, Polyethylenglykol, 2-Pyrrolidon und Dimethylsulfoxid und anschließender Arzneistoffzugabe in wässriger Lösung [86]. Diese Systeme konnten außerdem ohne signifikante Änderungen im Phasenverhalten durch Gammastrahlen und Autoklavieren sterilisiert oder einer keimmindernden Filtration unterzogen werden.

Organogele auf Basis von Ethylcellulose werden erst seit ein paar Jahren intensiver untersucht. Hergestellt werden diese wie die Systeme zuvor durch gemeinsames Erhitzen von flüssigem Lipid und Gelator, in diesem Fall oberhalb der Glasübergangstemperatur der Ethylcellulose. Gravelle et. al. wählten 140 °C als Zieltemperatur [87]. Nach dem Abkühlen bildete sich das Gel. Bislang wurde dieser Typ vornehmlich hinsichtlich lebensmitteltechnologischer Einsatzgebiete untersucht, z.B. als Ersatz für feste gesättigte Fette [81], da Ethylcellulose als 1,4- $\beta$ -glykosidisch verknüpftes Polysaccharid nicht vom menschlichen Körper abgebaut werden kann. Ein alternatives bioabbaubares Polymer würde diesen Systemen jedoch ein weites Feld eröffnen.

12-Hydroxystearinsäure ist in der Kosmetik seit geraumer Zeit verbreitet. Die Verträglichkeit wurde Jahre lang untersucht. In der Literatur der letzten 10 Jahre wird sie durchweg als biokompatibel bezeichnet und die guten Gelbildungseigenschaften bei vielen verschiedenen organischen Lösungsmitteln und Ölen sowie die kommerzielle Verfügbarkeit gelobt [81, 88–92]. Der Gelbildungsmechanismus, der Einfluss der Chiralität und

die physikochemischen Eigenschaften der Gele aus verschiedenen Ölen und organischen Lösungsmitteln wurden ausgiebig untersucht [91]. Die Herstellung läuft erneut nach dem gleichen Schema wie bei den anderen Organogelen ab. 12-Hydroxystearinsäure wird zusammen mit dem Öl oder dem organischen Lösungsmittel auf 70 °C erwärmt und damit unterhalb des Schmelzpunktes. Beim Abkühlen bildet sich bei einer bestimmten Temperatur, welche von der Art des Öls und der 12-Hydroxystearinsäurekonzentration abhängig ist, das Gel [88]. Auch die rheologischen Eigenschaften sind von diesen beiden Faktoren abhängig [90]. Neben der Verwendung in der Kosmetik werden zahlreiche weitere Einsatzgebiete erforscht. Ähnlich wie Ethylcellulose ist ein Einsatz des Gels als Austauschstoff für gesättigte Lipide möglich [81]. Auch als Arzneistoffträger wird es untersucht. So entwickelten Han et. al. Nanocontainer für Proteine auf dieser Basis [89]. Der Einsatz als System zur kontrollierten Freisetzung ist jedoch noch unerforscht. Dabei erfüllt dieses System viele Voraussetzungen. Alle Bestandteile sind als Produkte biologischer Herkunft bioabbaubar. Insbesondere für die Formulierung von Proteinen ist von Bedeutung, dass keine organischen Lösungsmittel zum Einsatz kommen. Weitere für Proteine kritische Punkte sind bislang nicht untersucht. So z.B. ob diese Gele auch nach dem Erhitzen noch beladen werden können und welche Scherbelastung ein Protein dabei überstehen muss.

### 1.3. Zielstellung

Auf Grundlage der aktuellen Forschungssituation wurden die 12-Hydroxystearinsäuregele als besonders untersuchenswert erachtet. Aufgrund der bisher in der Literatur beschriebenen Ergebnisse scheinen diese ein geeigneter Ansatz zu sein. Das Ziel dieser Arbeit ist es, solche Gelsysteme zu entwickeln, welche bei ihrer Herstellung die kritischen Faktoren der Proteinformulierung, wie Wärme, Scherbelastung und Lösungsmiteleinfluss, berücksichtigen sowie diese *in vitro* und *in vivo* hinsichtlich ihrer pharmakokinetischen und physikochemischen Eigenschaften zu charakterisieren. Zunächst müssen geeignete Systeme aus den vielen möglichen 12-Hydroxystearinsäuregelen ausgewählt werden. Insbesondere die Auswahl der lipophilen Flüssigkeit ist von Bedeutung, da diese einen Großteil zur Biokompatibilität beiträgt. Außerdem muss 12-Hydroxystearinsäure damit Gele ausreichender Festigkeit bilden. Die dafür notwendige Konzentration ist zu ermitteln. Sind Systeme ausreichender mechanischer Festigkeit gefunden muss eine Möglichkeit gefunden werden, diese mit Proteinen zu beladen. Ab diesem Schritt müssen die für Proteine kritischen Faktoren wie Wärme, Scherbelastung oder organische Lösungsmittel vermieden oder die Einflusdauer und Intensität gering gehalten werden, um eine Denaturierung oder Aggregation zu verhindern. Ist die Herstellung solcher Systeme, welche diese Anforderungen erfüllen, gelungen, gilt es diese zu cha-

rakterisieren. Um eine Vorstellung über die morphologischen Eigenschaften zu erhalten, werden diese mittels mikroskopischer Verfahren untersucht werden. Die Stabilität der Gele wird unter verschiedenen Belastungen bestimmt werden. Für die physikochemische Charakterisierung werden Kernspinresonanzrelaxometrie (Bt-NMR) und oszillierende Rheologie verwendet werden. Damit sollen die Grundlagen für eine spätere *In-vitro/In-vivo*-Korrelation gelegt werden. Da der pH-Wert und dessen Konstanz für die Stabilität vieler Proteine von Bedeutung ist, soll dieser mittels Elektronenspinresonanzspektroskopie (ESR) untersucht werden. Die Überwachung der Stabilität des Proteins hinsichtlich auftretender Aggregation soll ebenfalls mittels Elektronenspinresonanzspektroskopie und zusätzlich mit Asymmetrischer Fluss-Feldflussfraktionierung (A4F) erfolgen, um die Eignung des entwickelten Herstellungsverfahrens zu belegen. Neben diesen Punkten muss das System jedoch immer noch injizierbar bleiben. Aus diesem Grund wird die dazu notwendige Kraft mittels TextureAnalyzer bestimmt werden. Die Freisetzungseigenschaften schließlich werden *in vitro* mit Magnetresonanztomographie (MRT) und multispektraler Fluoreszenzbildgebung und *in vivo* ebenfalls mittels Fluoreszenzbildgebung untersucht werden, um die Fähigkeit der entwickelten Systeme zur kontrollierten Freisetzung von Proteinen zu beweisen.

## 2. Ergebnisse und Diskussion

### 2.1. Entwicklung

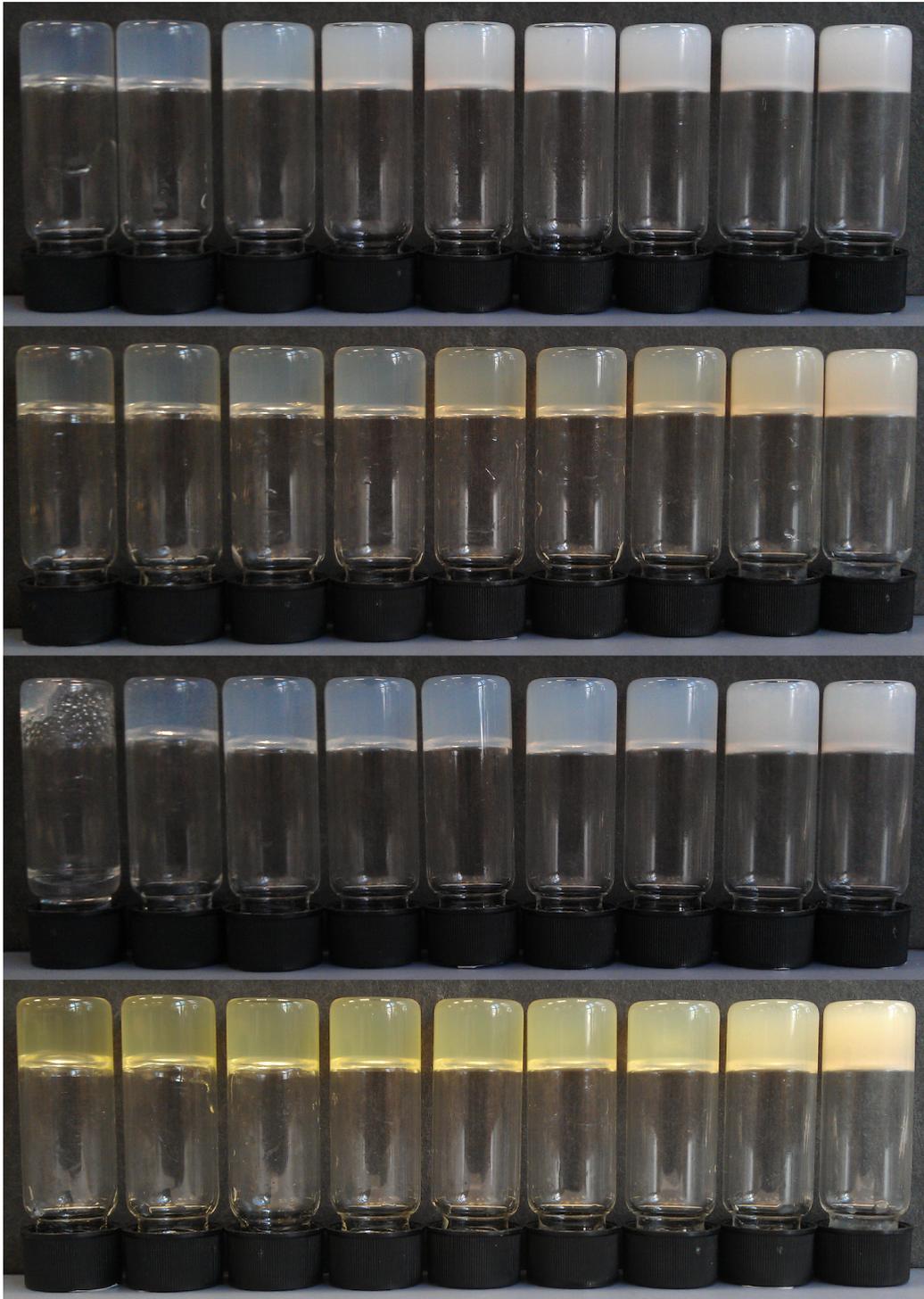
#### 2.1.1. Auswahl der lipophilen Phase

Die Abhängigkeit des Gelierungsvermögens von 12-Hydroxystearinsäure von der Art der zu gelierenden lipophilen Flüssigkeit ist bereits in der Literatur beschrieben [90]. Da die dort untersuchten Flüssigkeiten sich nur teilweise für parenterale Zwecke verwenden lassen, wurde zu Beginn der Entwicklung eine eigene Übersicht über das Gelbildungsverhalten von 12-Hydroxystearinsäure in verschiedenen relevanten und interessanten Ölen und flüssigen Wachsen erstellt. Untersucht wurden je zwei Öle und flüssige Wachse jeweils mit einmal stärkerer und einmal schwächerer Lipophilie. Die Öle waren das lipophile Erdnussöl und die weniger lipophilen mittelkettigen Triglyceride. Bei den Wachsen wurden das relativ hydrophile Isopropylmyristat und das sehr lipophile Jojobaöl verwendet.

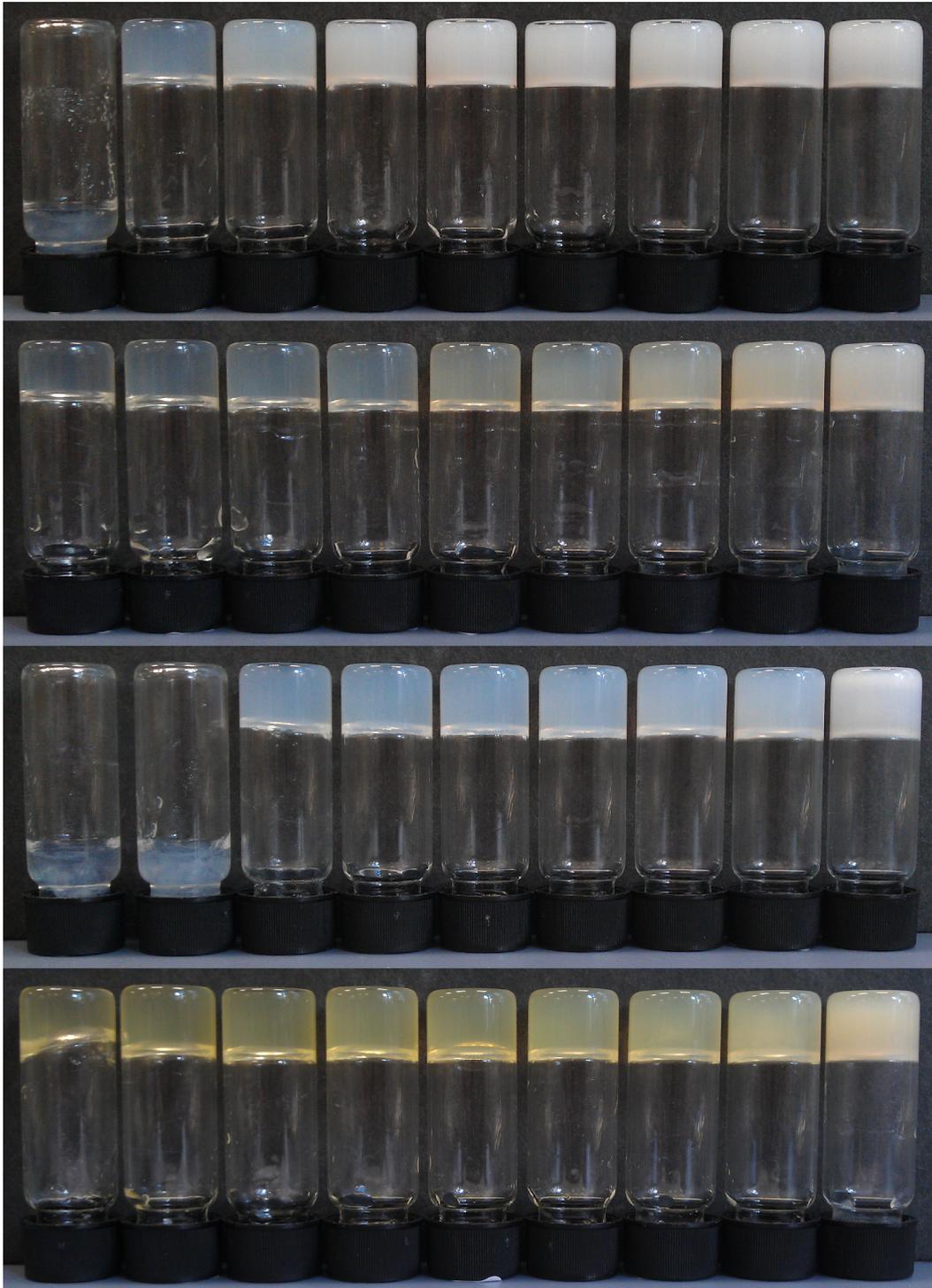
Hergestellt wurde jeweils eine Konzentrationsreihe von 1 % bis 6 %. Dazu wurde jeweils 1 g Gel wie auf Seite 82 beschrieben in einem 4 ml Glasgefäß hergestellt und auf Raumtemperatur abgekühlt. Anschließend wurden die Gläschen 180° um die horizontale Achse gedreht („Vial-Inversion-Methode“) um die Fließfähigkeit zu untersuchen. Abbildung 3 auf Seite 18 zeigt, dass die hergestellten Zusammensetzungen eine Gelbildung in unterschiedlichem Ausmaß aufwiesen. Bei den Proben mit 1 % 12-Hydroxystearinsäure reichte die Gelbildung bei Raumtemperatur von leichter Flockenbildung in Verbindung mit teilweise vorhandener Fließfähigkeit bei Isopropylmyristat bis zur Bildung eines schon relativ festen Gels bei den restlichen Ölen und Wachsen, insbesondere bei Erdnuss- und Jojobaöl.

Durch erneutes Erhitzen auf 37 °C wurde die Stabilität der Gele bei *In-vivo*-Bedingungen getestet. Dazu wurden die Gläschen im Orbitalschüttler ohne Schüttelbewegung erwärmt und anschließend der Metallblock inklusive der Gefäße 180° um die horizontale Achse gedreht. In dieser Position kühlten sowohl Metallblock als auch die Proben langsam aus. Wie Abbildung 4 auf Seite 19 zeigt, waren bei 37 °C die auf MCT basierenden Gele ab 1,5 % 12-Hydroxystearinsäure stabil, auf Isopropylmyristatbasis waren mindestens 2 % erforderlich, bei Erdnuss- und Jojobaöl waren alle untersuchten Konzentrationen bei 37 °C noch gelartig, wobei die 1 % Probe des Jojobaöls sich unter der eigenen Gewichtskraft bereits leicht verformte, jedoch nicht floss.

Mit dem Ziel insbesondere Unterschiede zwischen Erdnuss- und Jojobaöl aber auch zwischen den anderen Grundlagen aufzuzeigen wurde der Versuch bei 50 °C wieder-



**Abbildung 3:** Gele mit verschiedenen Ölen und 12-Hydroxystearinsäurekonzentrationen bei Raumtemperatur nach 180°-Drehung. Von oben nach unten: Mittelkettige Triglyceride, Erdnussöl, Isopropylmyristat, Jojobaöl. Von links nach rechts: 1 %, 1,5 %, 2 %, 2,5 %, 3 %, 3,5 %, 4 %, 5 %, 6 %.



**Abbildung 4:** Gele mit verschiedenen Ölen und 12-Hydroxystearinsäurekonzentrationen nach 180°-Drehung bei 37°C. Von oben nach unten: Mittelkettige Triglyceride, Erdnussöl, Isopropylmyristat, Jojobaöl. Von links nach rechts: 1%, 1,5%, 2%, 2,5%, 3%, 3,5%, 4%, 5%, 6%.

holt. Das Ergebnis ist in Abbildung 5 auf Seite 21 zu sehen. Die Gele auf Grundlage von Isopropylmyristat zeigten erst ab einer 12-Hydroxystearinsäure-Konzentration von 6 % keine Fließfähigkeit mehr, bei mittelkettigen Triglyceriden waren mindestens 3,5 % nötig. Unter diesen Bedingungen war es auch möglich einen Unterschied zwischen Erdnuss- und Jojobaöl festzustellen. Während bei Erdnussöl 1,5 % 12-Hydroxystearinsäure ausreichten, wurden bei Jojobaöl mindestens 2 % benötigt um bei 50 °C ein Gel zu formen.

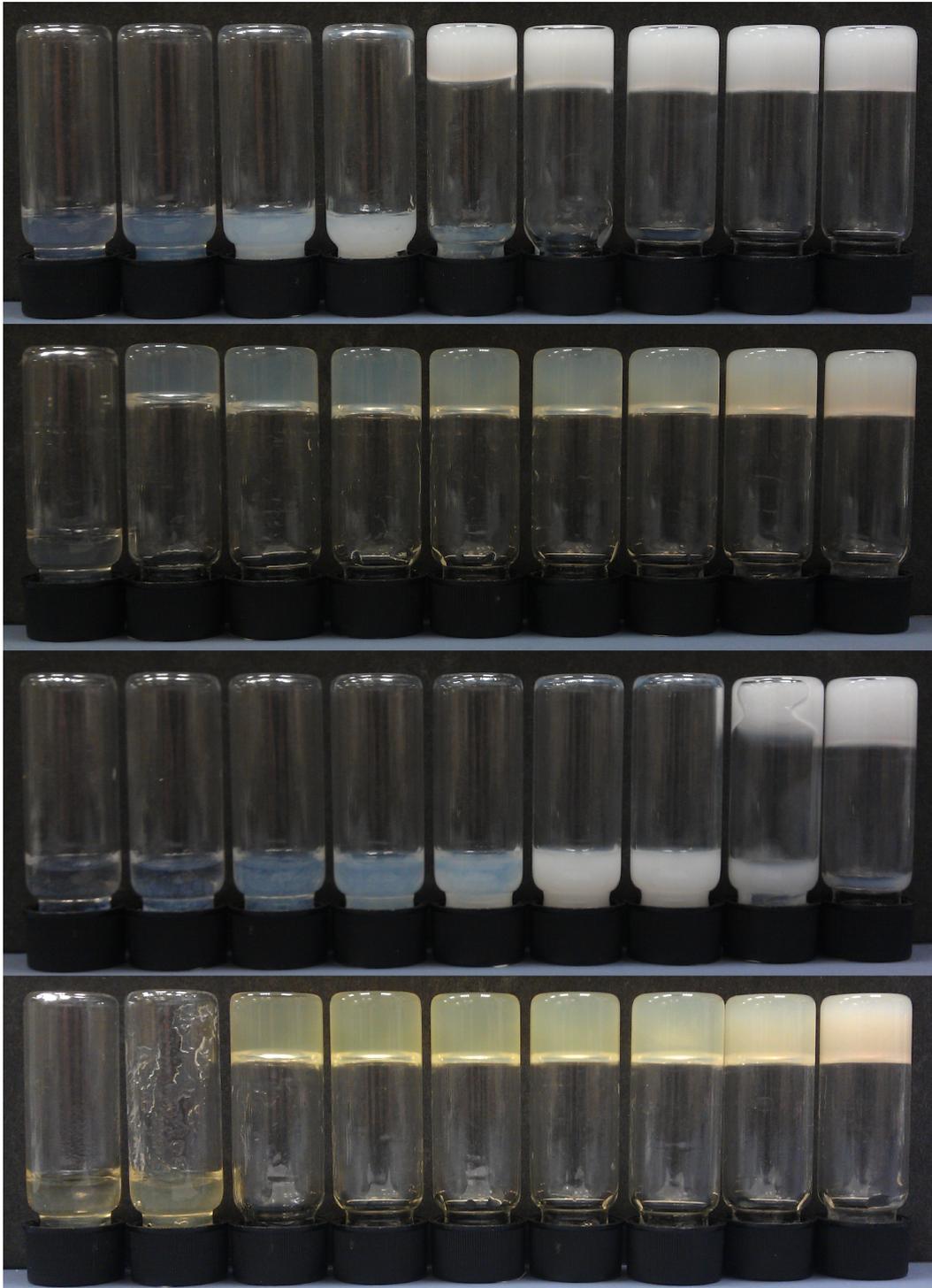
Das Gelbildungsvermögen von 12-Hydroxystearinsäure nimmt von Isopropylmyristat über mittelkettige Triglyceride bis hin zu Jojoba- und schließlich Erdnussöl zu. In Anbetracht der Eigenschaften der lipophilen Flüssigkeiten scheint es einen Zusammenhang zwischen dem Gelbildungsverhalten und der Lipophilie der Flüssigkeit zu geben. Jojoba- und Erdnussöl mit ihrem stark ausgeprägten lipophilen Charakter zeigen eine stärkere Gelbildung als die weniger lipophilen Substanzen Isopropylmyristat und mittelkettige Triglyceride. Ursache dafür könnte die aufgrund der Hydroxygruppe im Vergleich z.B. zur Stearinsäure schwächer ausgeprägte Lipophilie der 12-Hydroxystearinsäure sein. Dadurch ist zu erwarten, dass diese stärker mit Isopropylmyristat und mittelkettigen Triglyceriden interagiert als mit Jojoba- und Erdnussöl. Damit ist es wahrscheinlich, dass die ersten beiden 12-Hydroxystearinsäure verstärkt solubilisieren, während letztere eher ermöglichen eine Gelmatrix aufzubauen. Ein Einfluss der Stoffklasse – Wachs oder fettes Öl – ist in diesen Versuchen nicht zu erkennen.

Aufgrund der dargestellten Versuche scheint Erdnussöl die geeignetste Grundlage zu sein, während Isopropylmyristat von vornherein ausscheidet. Da keine *in vivo* Daten zu Jojobaöl vorliegen und kein Vorteil gegenüber Erdnussöl zu erwarten ist, wurde auf eine weitere Untersuchung dieser Gele verzichtet. Als alternative Rezeptur wurden deshalb die auf mittelkettigen Triglyceriden basierenden Gele verwendet, da dieses Öl bereits parenteral Verwendung findet. Aus Sicht der Gelbildung scheint 3 % 12-Hydroxystearinsäure als einheitliche Konzentration für beide Grundlagen geeignet zu sein.

### 2.1.2. Physikalisch stabilisierte Emulsionsgele

Im nächsten Schritt wurde versucht, die Gele mit einer wässrigen Phase zu beladen und so W/O-Emulsionsgele zu erzeugen. Da Emulgatoren auf physiologische Gewebe grundsätzlich eine reizende Wirkung haben können, wurde zunächst versucht darauf zu verzichten. Dies erfolgte in Anlehnung an die Kühlsalbe DAB [93], die ebenfalls ohne echten Emulgator auskommt und somit als besonders reizarm gilt.

Da die Stabilisierung der Emulsion physikalisch durch das Gel selbst erfolgen sollte und dessen Festigkeit von der Konzentration an 12-Hydroxystearinsäure abhängt, wurde für diese Untersuchung mit den beiden ausgewählten Ölen, MCT und Erdnussöl, erneut eine Konzentrationsreihe – in diesem Fall von 2 % bis 6 % 12-Hydroxystearinsäure



**Abbildung 5:** Gele mit verschiedenen Ölen und 12-Hydroxystearinsäurekonzentrationen nach 180°-Drehung bei 50°C. Von oben nach unten: Mittelkettige Triglyceride, Erdnussöl, Isopropylmyristat, Jojobaöl. Von links nach rechts: 1%, 1,5%, 2%, 2,5%, 3%, 3,5%, 4%, 5%, 6%.



**Abbildung 6:** *Emulsionsgele mit MCT und Erdnussöl und verschiedenen 12-Hydroxystearinsäurekonzentrationen. Oben: Mittelkettige Triglyceride, unten: Erdnussöl. Von links nach rechts: 2 %, 2,5 %, 3 %, 3,5 %, 4 %, 5 %, 6 % 12-Hydroxystearinsäure.*

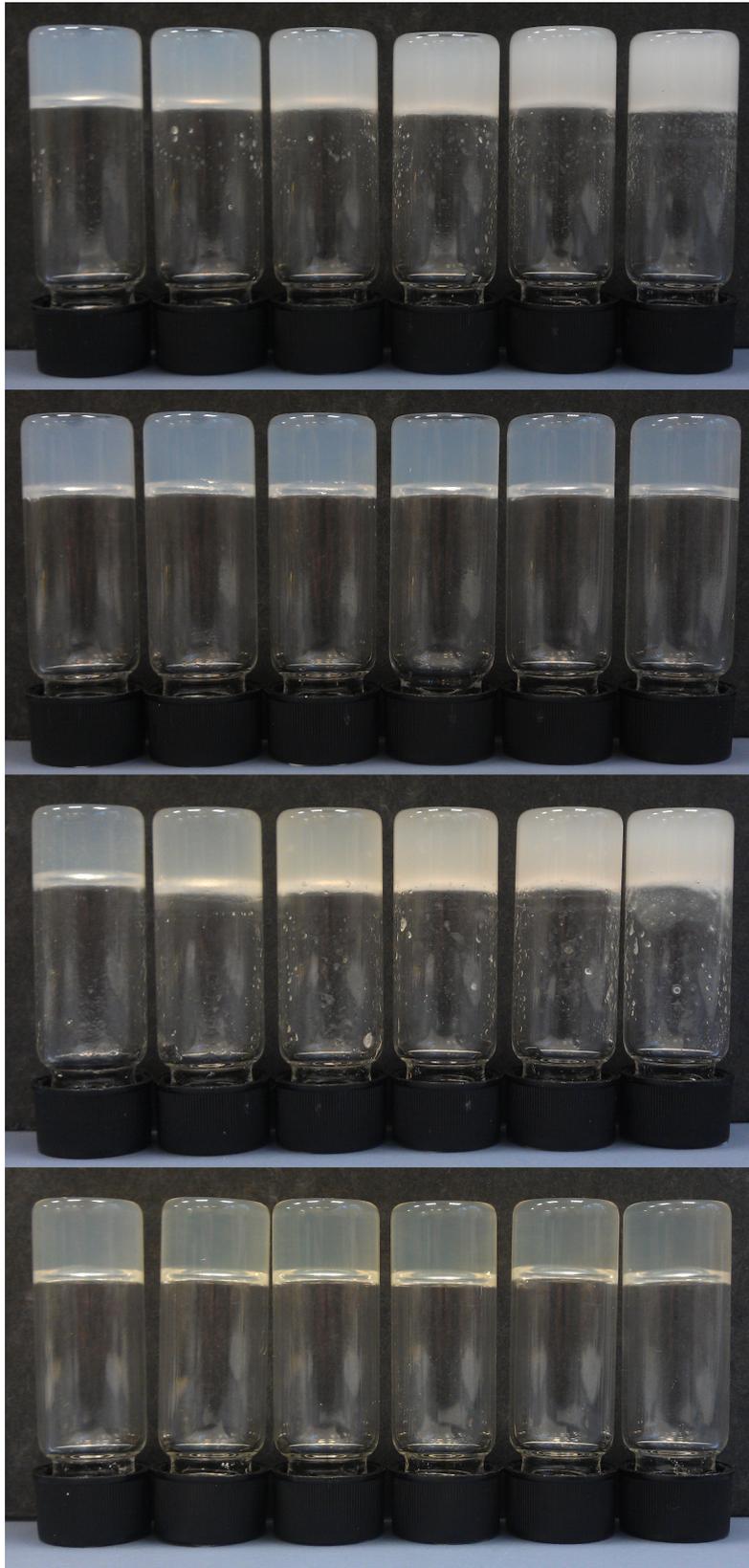
berechnet auf die Masse der lipophilen Phase – im Umfang von jeweils 1 g pro Probe erstellt. Die Homogenisierung erfolgte im SpeedMixer<sup>TM</sup> DAC 150 SP bei  $3500 \text{ min}^{-1}$ , da dies ein effektives und für Proteine schonendes Verfahren ist [94].

Nach 5 min Vormischzeit wurden  $100 \mu\text{l}$  einer Dextranblaulösung auf das bereits gebildete aber noch weiche Gel gegeben und 60 s homogenisiert. Abbildung 6 zeigt die entstandenen „Emulsionsgele“.

Teilweise wurde die innere Phase zwar aufgenommen, jedoch in keinem Versuch vollständig und stets mit Tröpfchen im deutlich sichtbaren Größenbereich. Der Ansatz, die Emulsionsgele auf rein physikalischem Wege zu stabilisieren, wurde damit verworfen und mit der Suche nach geeigneten Emulgatoren begonnen.

### 2.1.3. Auswahl des Emulgators

Um die Emulsion zu stabilisieren, wurden zwei verschiedene W/O Emulgatoren getestet (Abbildung 7 auf Seite 23). Dies waren Span<sup>TM</sup> 60, welches weit verbreitet und als Pulver leicht zu verarbeiten ist, und Cithrol<sup>TM</sup> DPHS (Macrogol-30-Dipolyhydroxystearat), ein neuer, besonders leistungsfähiger Emulgator [95]. Letzterer scheint aufgrund seiner strukturellen Ähnlichkeit zu 12-Hydroxystearinsäure besonders gut geeignet zu sein.



**Abbildung 7:** Tensidhaltige Gele mit 3% 12-Hydroxystearinsäure auf Basis von MCT (oben) und Erdnussöl (unten). Die jeweils erste Reihe enthält Span<sup>™</sup> 60 die zweite Cithrol<sup>™</sup> DPFS. Von links nach rechts 1-6% an Emulgator.



**Abbildung 8:** Emulsionsgel bestehend aus 50 % Dextranblaulösung und 50 % Lipogel auf Basis von MCT mit 4 % Cithrol<sup>TM</sup> DPHS und 3 % 12-Hydroxystearinsäure.

Hergestellt wurden die Grundgele wie auf Seite 82 beschrieben mit Konzentrationen von 1 % bis 6 % Emulgator bezogen auf die Gesamtendmasse in einer Menge von 1 g pro Probe. Nach dem Abkühlen wurden die Gele optisch bewertet. Da die Stabilisierung in diesem Fall durch den Emulgator erfolgte, wurde die in Kapitel 2.1.1 ermittelte 12-Hydroxystearinsäure-Konzentration von 3 % verwendet.

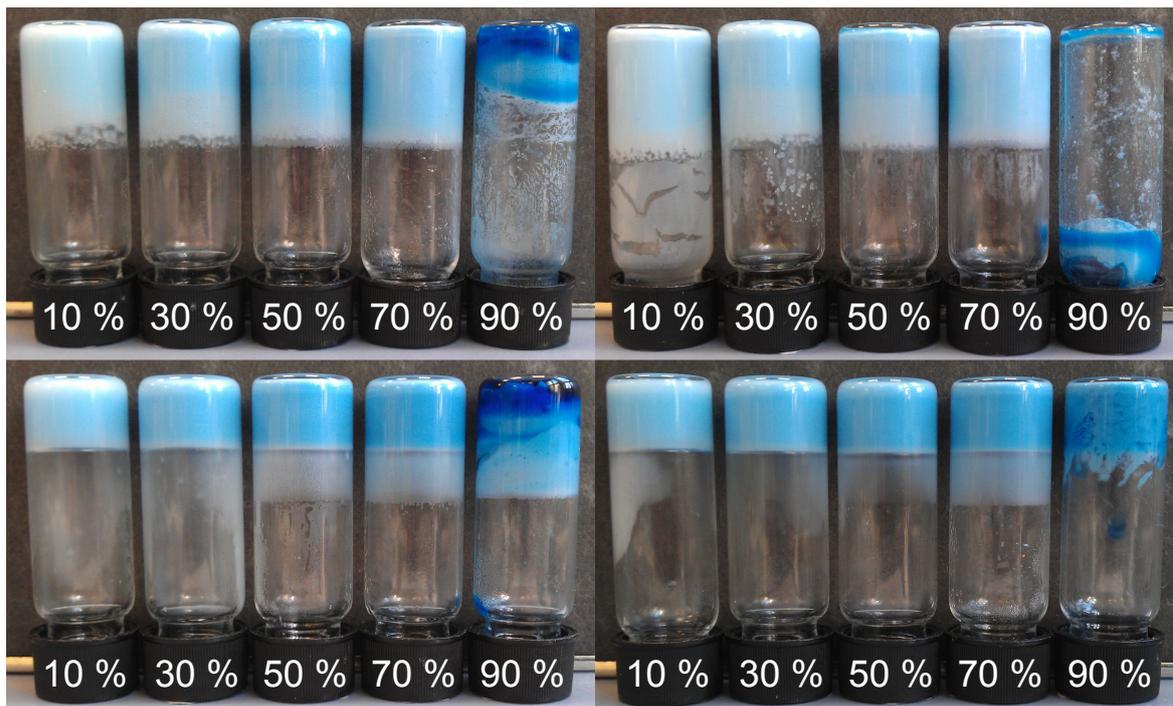
Wie in Abbildung 7 zu sehen, schien Span<sup>TM</sup> 60 mit der 12-Hydroxystearinsäure zu interagieren. Mit steigender Konzentration des Emulgators kam es zu einer zunehmenden Flockenbildung. Bei Cithrol<sup>TM</sup> DPHS trat dieser Effekt nicht auf. Bis hin zur höchsten getesteten Konzentration von 6 % blieben die Proben klar und waren optisch nicht von einander zu unterscheiden. Auf dieser Basis wurde sich für Cithrol<sup>TM</sup> DPHS als Emulgator entschieden.

#### 2.1.4. Beladungskapazität

Um die Aufnahmekapazität der Gele für eine wässrige Phase zu bestimmen, wurde eine Reihe von 10 % bis 90 % innerer Phase, berechnet auf die Endmasse, wie auf Seite 82 beschrieben, hergestellt. Dafür wurden für jedes Öl jeweils zwei Gele mit je 3 % 12-Hydroxystearinsäure und 2 % bzw. 4 % Cithrol<sup>TM</sup> DPHS verwendet. Aus diesen wurden anschließend mit der Dextranblaulösung die Emulsionsgele hergestellt. Dabei wurde eine Vormischzeit von 45 s für die erdnussöl- und 150 s für die MCT-basierten Gele verwendet, da aufgrund des unterschiedlichen Gelbildungsverhaltens auf diese Weise für beide Systeme die optimale Festigkeit für die Zugabe der Lösung erreicht wurde.

Wie Abbildung 8 auf Seite 24 zeigt, war bei einem Anteil von 50 % innerer Phase die Gelstabilität bereits nicht mehr gegeben. Von der schwächeren Gelbildung ist insbesondere das gezeigte Gel auf MCT-Basis betroffen. Ursachen dafür sind eine unvollständige Rückbildung der Gelstruktur nach Scherung unterhalb der Gelbildungstemperatur.

Durch erneutes Erwärmen des Geles im auf 50 °C temperierten Orbitalschüttler (ohne Schüttelbewegung) für 5 min wurde versucht die Struktur sich neu bilden zu lassen. Durch anschließendes Mischen im SpeedMixer<sup>TM</sup> DAC 150 SP für 5 s bei 3500 min<sup>-1</sup> wurde einer möglichen Entmischung vorgebeugt. Dies hatte zusätzlich den positiven Ne-



**Abbildung 9:** *Emulsionsgele mit verschiedenen Anteilen an Dextranblaulösung (10–90 %). Dargestellt sind Gele mit 3% 12-Hydroxystearinsäure auf Basis von Erdnussöl (oben) und MCT (unten) mit 2% (links) und 4% (rechts) Cithrol™ DPHS im Ausgangsgel.*

benefekt, dass ein eventuell unzureichendes Mischergebnis des ersten Durchgangs vervollständigt wurde. Die Abkühlung erfolgte anschließend in absoluter Ruhe bei Raumtemperatur. Auf die Proteinstabilität hat ein solch kurzes Erwärmen kaum Einfluss. Besonders thermolabile Proteine könnten durch Zusatz von z.B. Trehalose stabilisiert werden [96].

Abbildung 9 auf Seite 25 zeigt, dass alle getesteten Gele in der Lage waren mindestens 70 % innere Phase aufzunehmen. Das MCT-Gel mit 4% Cithrol™ DPHS nahm sogar 90 % fast vollständig auf. Insgesamt lief der Aufnahmeprozess bei den MCT-Gele einfacher ab. Bis 70 % innere Phase reichte der einfache in Kapitel 4.2.1 beschriebene Herstellungszyklus aus, um ein homogenes Gel zu erhalten. Bei den Gelen auf Erdnussölbasis funktionierte dies nur bis 50 %. Bei den 70 %-Proben wurde das einminütige Mischen fünf mal wiederholt, anschließend das Gel erneut auf 70 °C erwärmt und nochmals eine Minute homogenisiert. Dieser Ablauf war experimenteller Natur und ist für dieses System in seiner Funktion als Proteinformulierung ungeeignet. Ein Unterschied zwischen den verschiedenen Konzentrationen an Cithrol™ DPHS war an dieser Stelle nicht festzustellen.

Da die Erdnussölgel eine höhere Gelbildungstemperatur besitzen, war das zusätzliche Verfestigen durch Erwärmen auf 50 °C von weit geringerem Effekt als bei MCT.

Dies war jedoch für die weitere Verwendung unproblematisch, da diese Gele bereits nach der einfachen Herstellung eine weit höhere Festigkeit besaßen.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurden vier verschiedene Zusammensetzungen, welche in Tabelle 9 auf Seite 83 aufgeführt sind, ausgewählt. Dabei wurde sich für die höhere Konzentration an Cithrol<sup>TM</sup> DPHS entschieden, da die geringere sich insbesondere bei „Gel D“ als unzuverlässig erwies und gelegentlich zusätzliche Homogenisationsschritte erforderte.

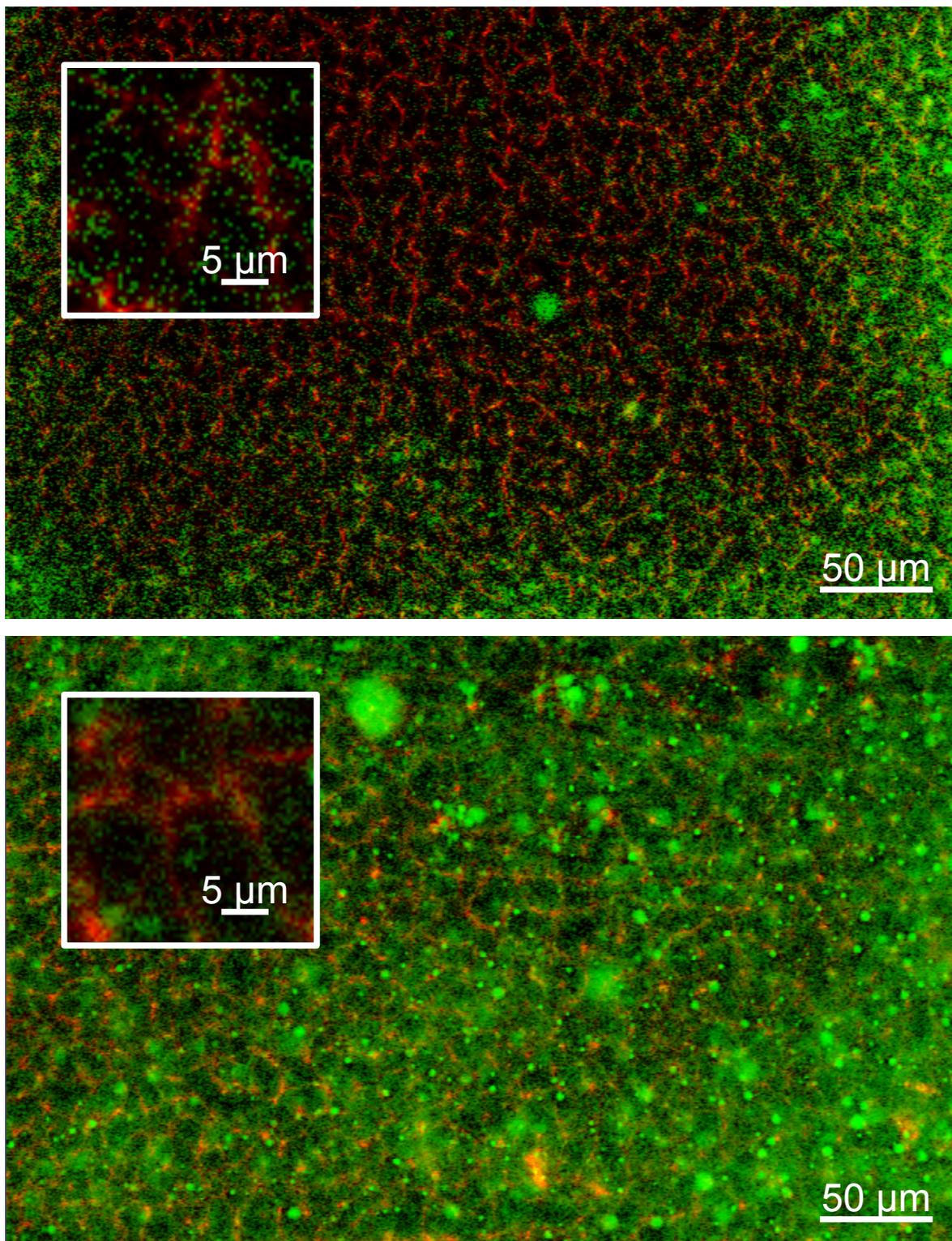
Um eine bessere Vergleichbarkeit zwischen den Gelen zu erreichen wurde bei dem in Kapitel 4.2.1 beschriebenen finalen Herstellungsprozess grundsätzlich das abschließende Verfestigen eingefügt, unabhängig ob ein Gel auf MCT- oder Erdnussölbasis hergestellt wurde. Für thermisch hochlabile Proteine bestünde auch die Möglichkeit auf diesen Schritt zu verzichten. Die weitere Charakterisierung ist jedoch vollständig für die Herstellung mit einer anschließender Verfestigung durchgeführt worden.

## 2.2. Bestimmung der Tröpfchengröße

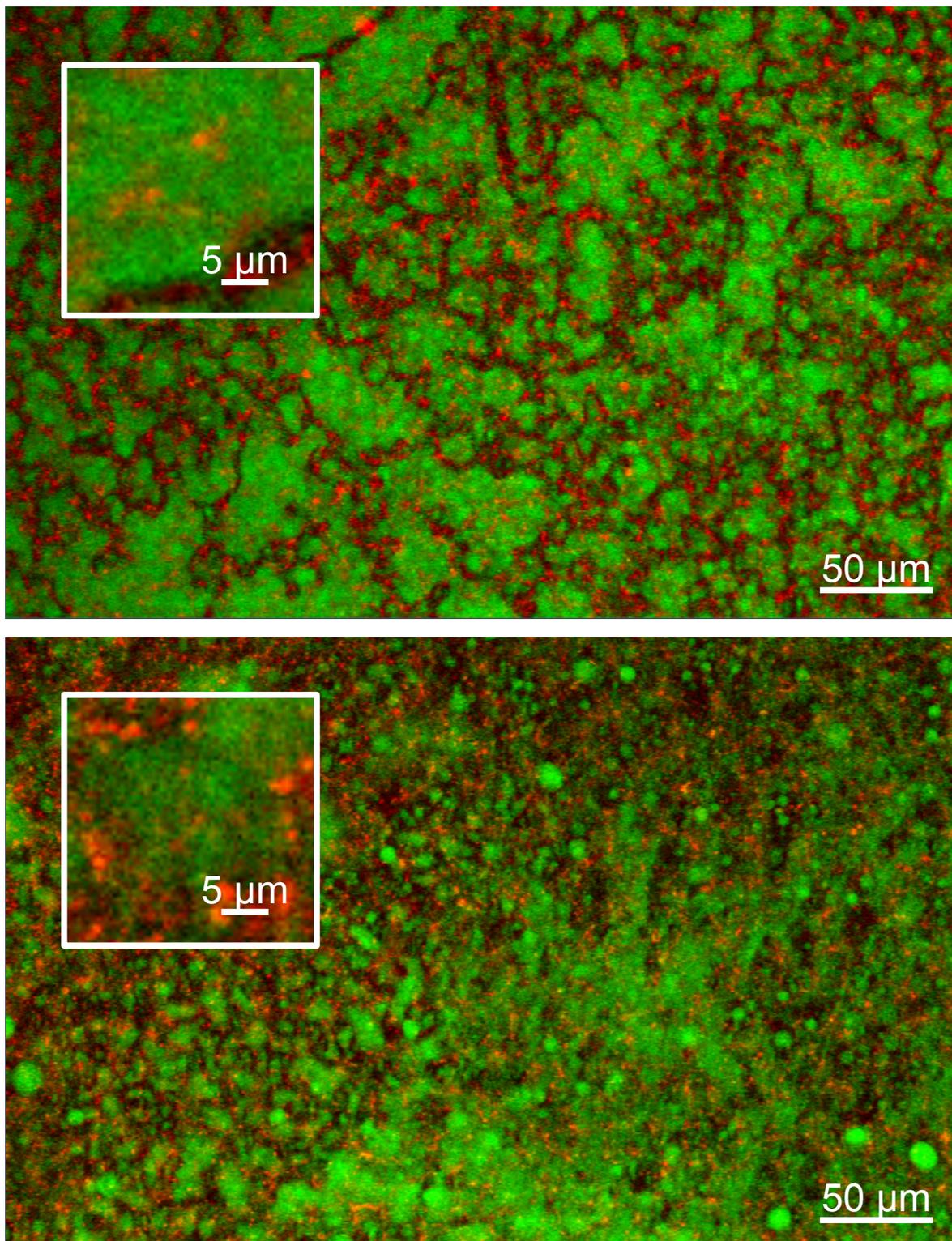
Ein entscheidendes morphologisches Merkmal der Emulsionsgele ist die Tröpfchengröße der inneren Phase. Vor allem die Stabilität der Emulsion wird dadurch entscheidend mitbestimmt. Diese wiederum ist die Voraussetzung für eine zuverlässige und reproduzierbare Freisetzung.

### 2.2.1. Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie

Mittels der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie wurden die Systeme wie auf Seite 82 beschrieben präpariert und untersucht. Die Aufnahmen sind in den Abbildungen 10 und 11 auf den Seiten 27 und 28 zu sehen. Rhodamin 110 (wässrige Phase) ist grün dargestellt, DiI (ölige Phase) rot. Es fällt auf, dass keine klar abgegrenzten Tröpfchen erkennbar sind. Vielmehr ist von einigen wenigen größeren Tröpfchen abgesehen mehr eine Art grüner „Nebel“ zu sehen. Dafür gibt es zwei mögliche Erklärungen. Zum einen könnte ein zu großer Anteil des Rhodamin 110 ins Öl diffundiert sein. Eine andere Möglichkeit ist, dass sich die Tröpfchen in der gleichen Größenordnung wie die Auflösung, also bei ca. 1  $\mu\text{m}$ , oder darunter befanden, da bei fluoreszenzmikroskopischen Methoden, wozu konfokale Laser-Scanning Mikroskopie zählt, auch das emittierte Licht von Strukturen unterhalb der Auflösungsgrenze detektiert, jedoch nicht räumlich aufgelöst werden kann. Um dies eindeutig zu klären, kam ein zweites mikroskopisches Verfahren, welches ohne markierende Farbstoffe auskommt, zum Einsatz, die Phasenkontrastmikroskopie.



**Abbildung 10:** *Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie von Gel A (oben) und B (unten). Grün: Rhodamin 110 (wässrige Phase) Rot: DiI (ölige Phase).*



**Abbildung 11:** Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie von Gel C (oben) und D (unten). Grün: Rhodamin 110 (wässrige Phase) Rot: DiI (ölige Phase).

### 2.2.2. Phasenkontrastmikroskopie

Wie die Abbildungen 12 und 13 auf den Seiten 30 und 31 zeigen, lagen bei allen vier Gelen die meisten Tröpfchen im Größenbereich unter und um  $1\ \mu\text{m}$ . Damit wurde das Ergebnis der konfokalen Laser-Scanning Mikroskopie bestätigt und die Diffusion von Rhodamin 110 ins Öl als nicht für den grünen „Nebel“ verantwortlich nachgewiesen. Der Größenunterschied zwischen den Gelen mit 10 % und denen mit 50 % innerer Phase war dabei unerwartet gering. Die Größenverteilung schien dabei jedoch generell recht inhomogen zu sein, da auch zahlreiche Tröpfchen mit einer Größe von bis zu  $5\ \mu\text{m}$  vorhanden waren. Dabei ist jedoch nicht auszuschließen, dass diese erst durch Koaleszenz an der Glasoberfläche der Objektträger während des Präparierens entstanden. Ein Abgleich mit nichtmikroskopischen Größenmessmethoden war nicht möglich, da einfache Laserdiffraktometrie mit öligen Systemen nicht möglich ist und für Photonenkorrelationspektroskopie zu wenig über die äußere Phase bekannt ist (z.B. Brechungsindex und Viskosität oberhalb der Gelbildungstemperatur). Gefrierbruch, welcher die innere Struktur nur minimal beeinflussen sollte, mit anschließender Transmissionselektronenmikroskopie lieferte keine verwertbaren Ergebnisse.

## 2.3. Gelstabilität

### 2.3.1. Zentrifugation

Zum Einschätzen der Stabilität der Gele wurden diese wie auf Seite 85 beschrieben durch Zentrifugieren einer erhöhten Belastung ausgesetzt. Abbildung 14 auf Seite 32 zeigt die Gele A–D im Anschluss an die Prozedur. Bei allen Gelen war eine dünne Schicht klares Öl ausgetreten. Nach wenigen Minuten war diese, vermutlich durch Diffusion von 12-Hydroxystearinsäure aus dem Gel, wieder geliert. Die wässrige innere Phase hatte sich dagegen nicht verändert. Diese wäre im Falle des Brechens der Emulsion als kräftige blaue Schicht am Boden des Gefäßes zu sehen gewesen. Die Emulsion war somit stabil.

### 2.3.2. Lagerung

Die Veränderungen der Gele im Verlauf von 28 Tagen sind in Abbildung 15 auf Seite 32 dargestellt. Zu Beginn der Untersuchung lag in jedem Fall ein homogenes Gel vor. Besonders auffällig waren die Veränderungen während der Lagerung bei  $37\ ^\circ\text{C}$ . Bereits nach 7 Tage war bei allen vier Systemen der hellblaue Bereich abgesunken. Innerhalb von weiteren 7 Tagen schritt dieser Prozess weiter fort und stagnierte danach. Dieses Verhalten war bei den Gelen mit nur 10 % innerer Phase deutlich stärker ausgeprägt

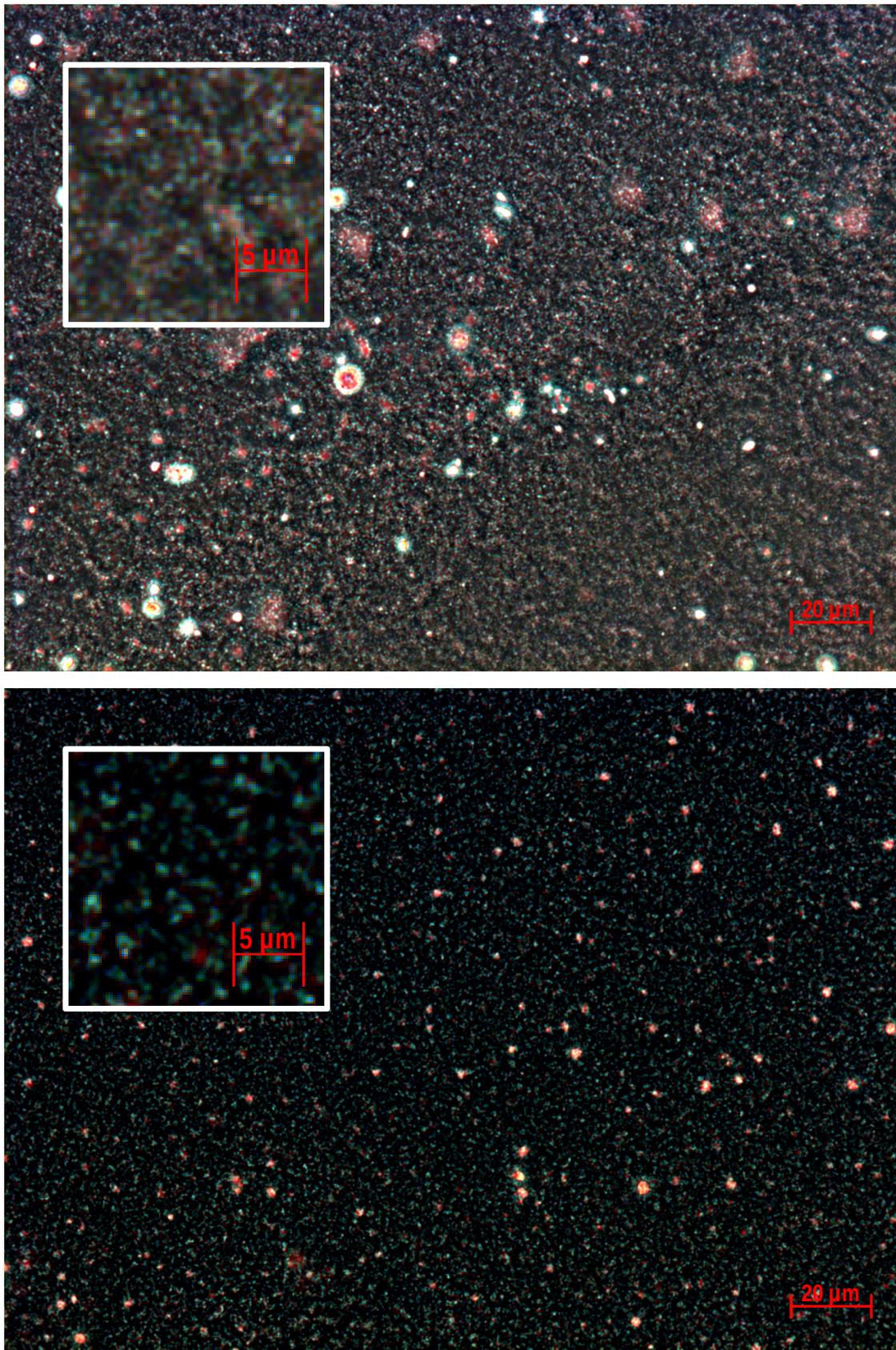


Abbildung 12: Phasenkontrastmikroskopie von Gel A (oben) und B (unten).

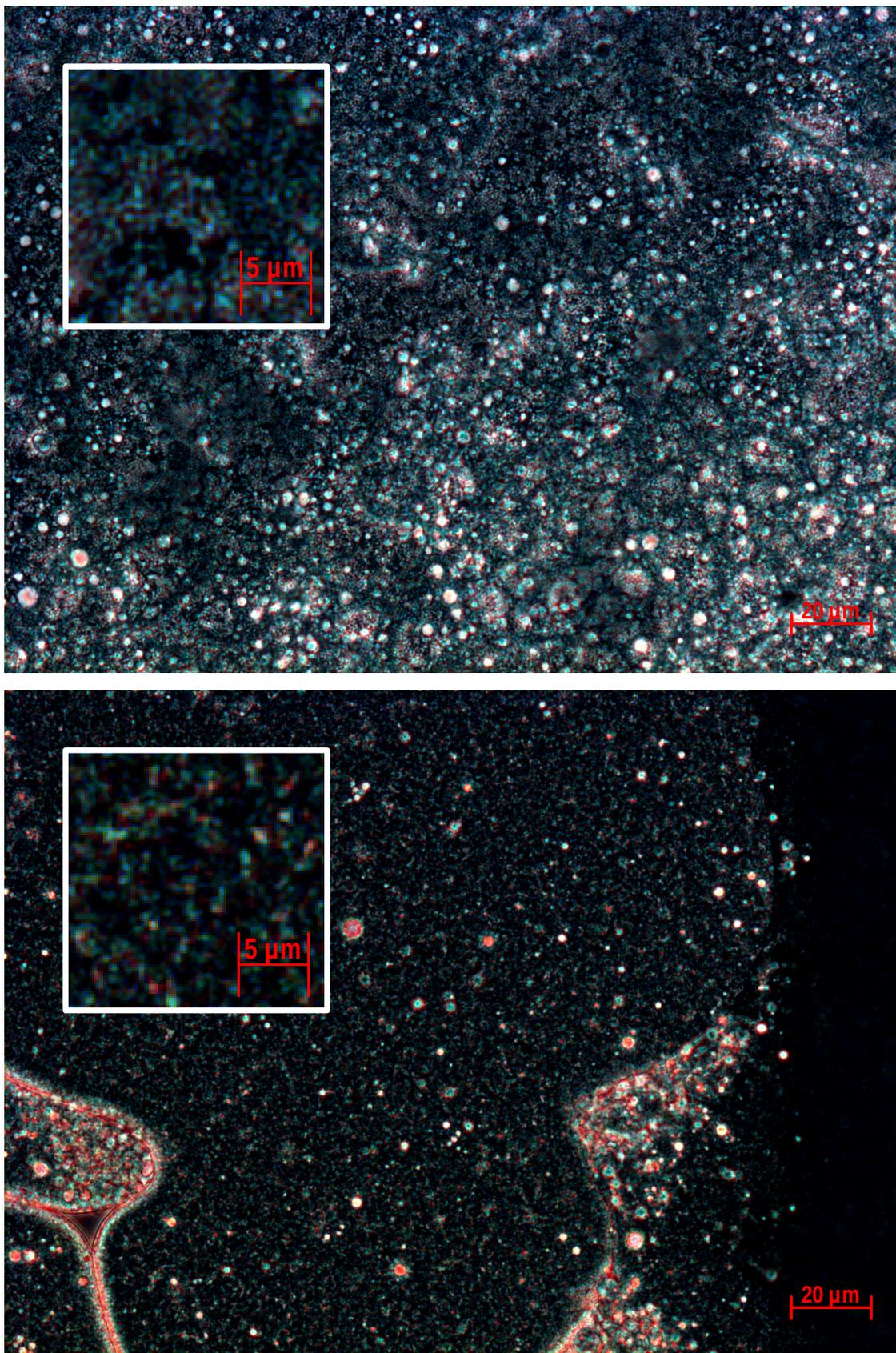
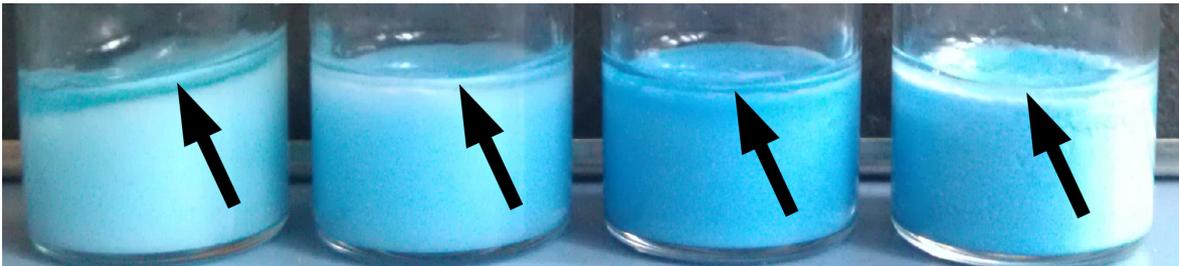
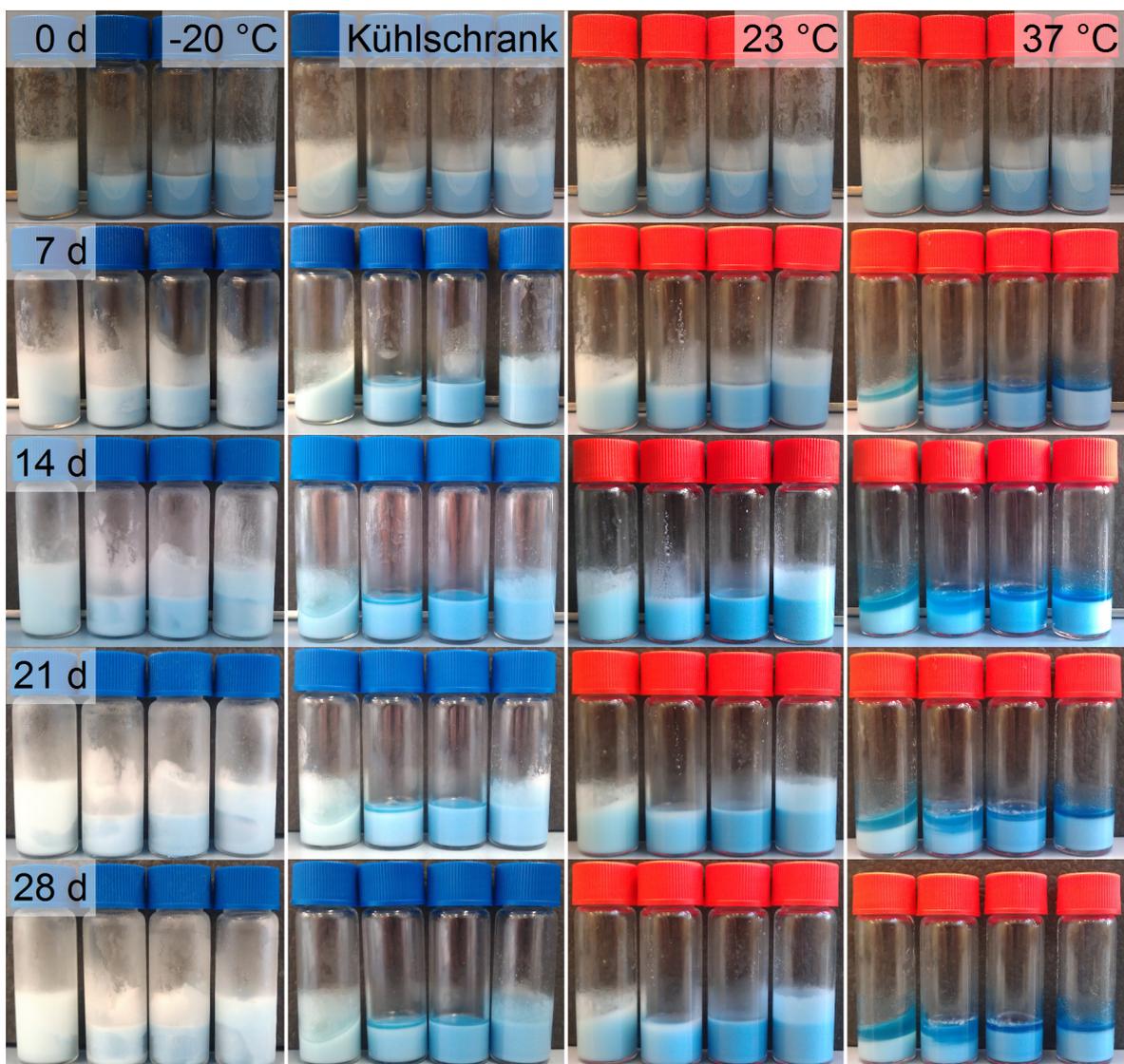


Abbildung 13: *Phasenkontrastmikroskopie von Gel C (oben) und D (unten).*



**Abbildung 14:** Die Gele A–D (von links nach rechts) nach dem Zentrifugieren. Bei allen Systemen hatte sich eine dünne klare Schicht Öl abgesetzt. Wässrige innere Phase war jedoch nicht ausgetreten.



**Abbildung 15:** Übersicht über die Gele A–D (jeweils von links nach rechts im Einzelbild) nach Lagerung bei  $-20\text{ °C}$ , im Kühlschrank ( $4\text{--}8\text{ °C}$ ), im Klimaschrank bei  $23\text{ °C}$  und  $37\text{ °C}$  (von links nach rechts) für 0, 7, 14, 21 und 28 Tage (von oben nach unten).

als bei 50 % Anteil. Außerdem trat es bei den MCT-Systemen etwas stärker auf als bei erdnussölbasierten. Bei den anderen Lagertemperaturen trat dieser Effekt nicht (Gele A und D) oder nur geringfügig (Gele B und C im Kühlschrank) auf. Das Auftreten bei Lagerung im Kühlschrank ist vermutlich mit den Temperaturwechseln während der fotografischen Aufnahmen zu begründen, da bei 23 °C alle vier Systeme stabil waren.

Bei dieser Veränderung handelte es sich vermutlich um eine Sedimentation der Wassertröpfchen im bei höheren Temperaturen entsprechend mobileren Gel. Die Großzahl der Tröpfchen sank im Gel nach unten und hinterließ im oberen Bereich ein klares Gel, in welchem nur jene Tröpfchen verblieben, welche zu klein zum Sedimentieren waren. Diese trübten entsprechend diesen Gelbereich kaum, wodurch die Anfärbung stärker zur Geltung kam. Ein Austreten von flüssigem Öl wie bei der Zentrifugation (vergleiche Kapitel 2.3.1) und damit verbundenes Schrumpfen des Gels kann ausgeschlossen werden, da sich in diesem Fall die Geloberfläche von Gel A bei 37 °C begradigt hätte. Die Schräge blieb jedoch unverändert. Außerdem war das durch die Zentrifugation abgetrennte Öl frei von jeglicher Blaufärbung.

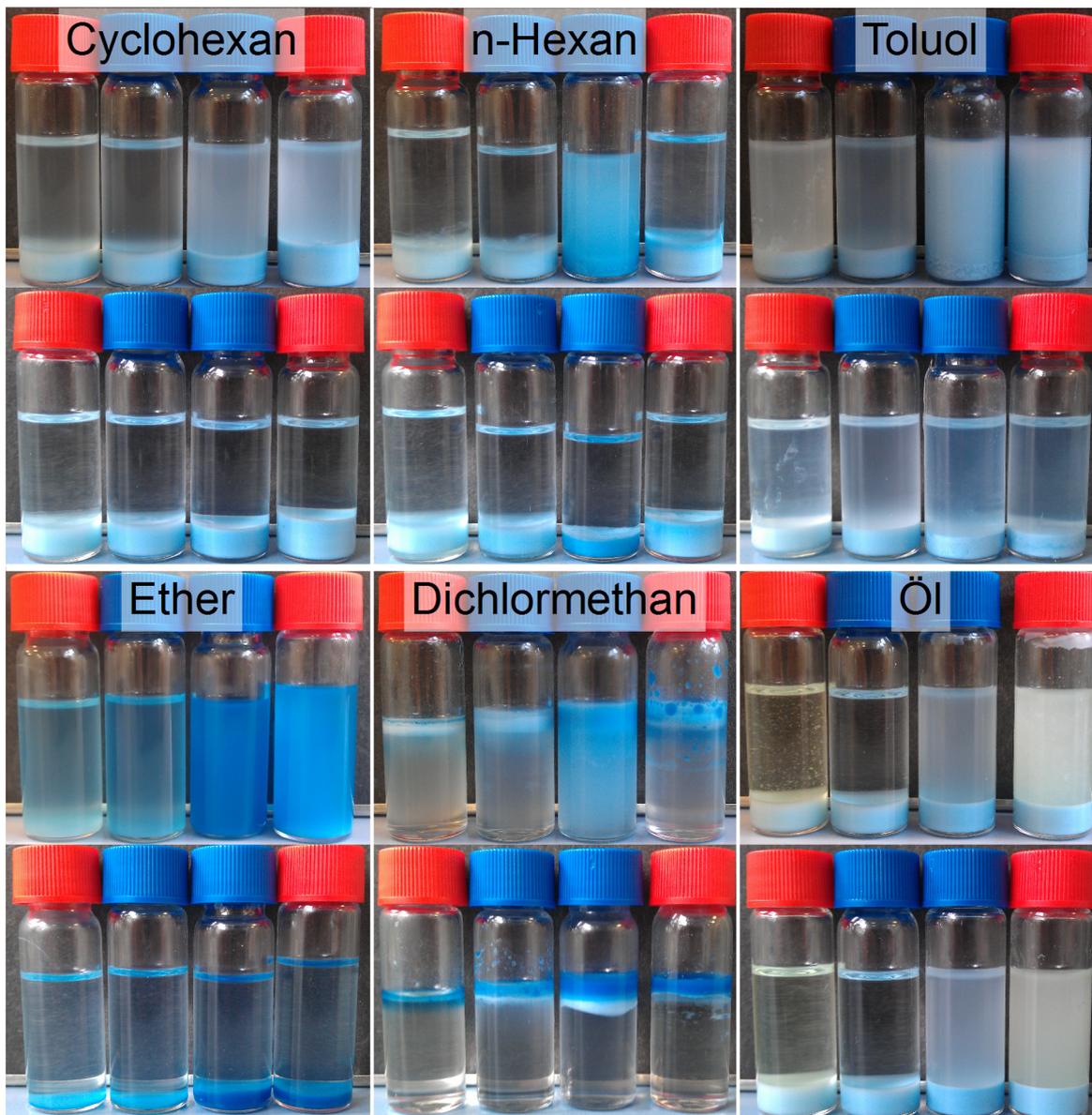
Die Unterschiede zwischen den beiden Ölen sind mit deren Gelbildungsverhalten zu erklären. Da MCT das schwächere Gel bildet und eine niedrigere Gelbildungstemperatur aufweist, wird den Tröpfchen ein geringerer Widerstand entgegen gesetzt. Die gleiche Auswirkung hat die generell bei MCT niedrigere Viskosität. Der Einfluss der Menge an innerer Phase begründet sich in der dichtesten „Tröpfchenpackung“, die entstehen kann. Wie bereits in Kapitel 2.2.2 gezeigt, unterscheiden sich die Gele nicht in der Größe der Tröpfchen sondern nur in deren Anzahl. Unter der Annahme, dass die Tröpfchen bis zu dieser dichtesten Packung zusammensinken, bilden die vielen Tröpfchen der Gele C und D eine entsprechend dickere Schicht, als die wenigen der Gele A und B. Damit erklärt sich auch die Stagnation der Sedimentation nach 14 Tagen. Zu diesem Punkt war die maximale Packungsdichte erreicht. Ein weiteres Absinken würde eine Koaleszenz oder ein vollständiges Brechen der Emulsion bedingen. Genau in dieser Hinsicht waren diese im untersuchten Zeitraum jedoch vollkommen stabil.

### 2.3.3. Aktives Trennen der Emulsion

Die Möglichkeit die innere Phase der Emulsion abzutrennen und zu isolieren ist für viele analytische Ansätze von Bedeutung. Insbesondere kann auf diesem Wege überprüft werden, ob das Protein den Herstellungsprozess unbeschadet überstanden hat.

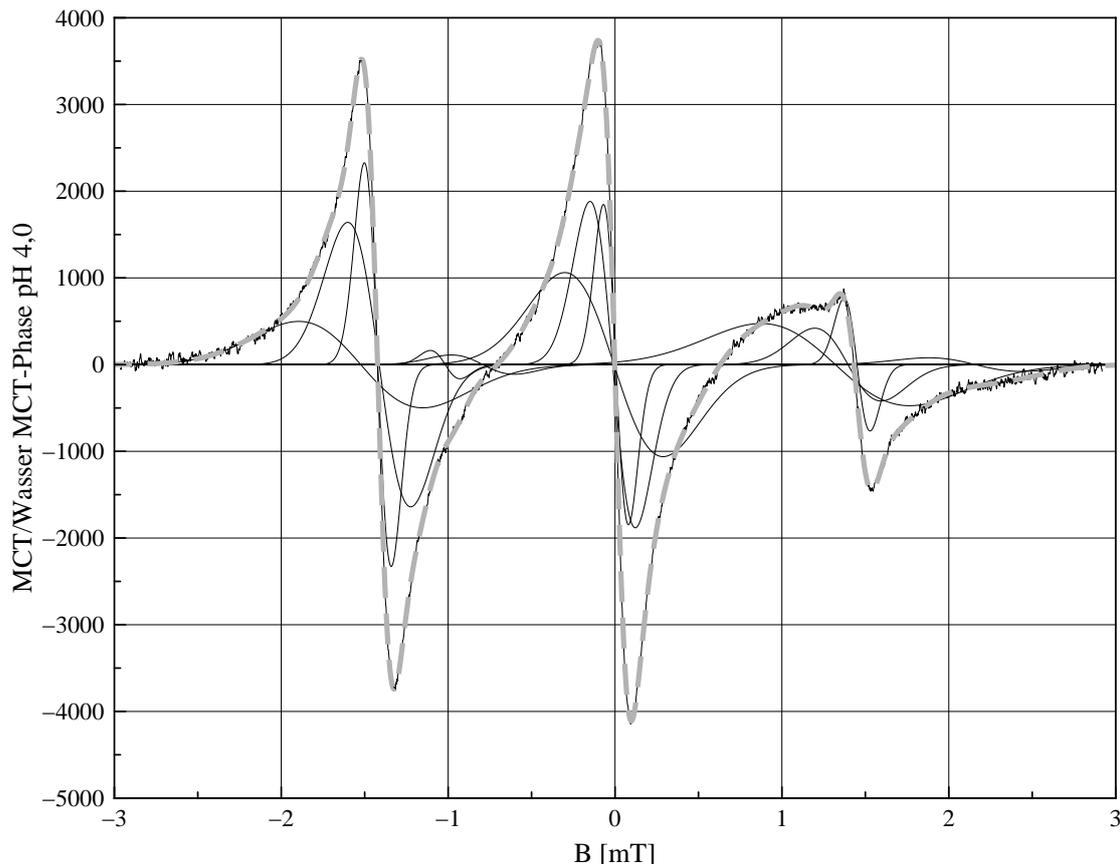
Die Versuche wurden wie auf Seite 86 beschrieben durchgeführt. Dabei zeigte sich jedoch, dass sich aus den Gelen selbst nach mehrstündigem Zentrifugieren nicht mehr als nur eine dünne Schicht Öl absetzte. Die innere Phase blieb vollkommen intakt.

Daraufhin wurde versucht, das Gel in organischen Lösungsmitteln zu lösen und auf diese Weise die innere Phase – gegebenenfalls unter Zuhilfenahme von Zentrifugation



**Abbildung 16:** Versuche die Gele A–D (jeweils von links nach rechts) in verschiedenen Lösungsmitteln bzw. dem entsprechenden Öl zu lösen. Dargestellt sind jeweils die Proben nach der Homogenisierung (oben) und nach fünfminütigem Zentrifugieren bei  $2500 \times g$  (unten).

– freizusetzen. Dafür wurde zunächst die Mischbarkeit verschiedener mit Wasser nicht mischbarer Lösungsmittel (vergleiche Kapitel 4.2.3.3) mit MCT und Erdnussöl überprüft und bestätigt. Es wurde versucht jedes der Gele A–D in diesen Lösungsmitteln zu lösen. Zusätzlich sollten die Gele mit dem jeweiligen Öl „verdünnt“ werden. Wie aus Abbildung 16 auf Seite 34 hervorgeht, waren nur Diethylether und Dichlormethan in der Lage die Gele in ausreichendem Ausmaß zu lösen. Diethylether hatte dabei den Nachteil, dass das Gel zwar gelöst wurde, es sich jedoch keine flüssige Phase separierte. Das blaue Sediment war fest und leicht redispergierbar. Dichlormethan schien dagegen



**Abbildung 17:** Beispielhafte Darstellung der ESR-Messdaten der MCT-Phase der MCT/PBS<sub>pH 4,0</sub>-Mischung durch die Summe von 12 ersten Ableitungen von Gauß-Funktionen in MagicPlot. Messdaten und Summenfunktion sind deckungsgleich.

direkt ein Brechen der Emulsion zu begünstigen. Allein die Zugabe mit anschließendem Homogenisieren verursachte ein Absetzen von wässriger Phase, was durch Zentrifugation noch verstärkt wurde. Eine Gewinnung der inneren Phase für analytische Zwecke ist zwar vorstellbar. Ein spontanes Brechen der Emulsion während der Lagerung oder auch der Verweildauer im Körper erscheint jedoch vollkommen ausgeschlossen.

## 2.4. pH-Wert-Messung

Die Verteilung der Spinsonde AT wurde wie in Kapitel 4.2.9.3 auf Seite 92 beschrieben untersucht. Abbildung 17 auf Seite 35 zeigt beispielhaft die Darstellung der Messdaten der MCT-Phase der MCT/PBS<sub>pH 4,0</sub>-Mischung durch die Summe von 12 ersten Ableitungen von Gauß-Funktionen in MagicPlot Student. Diese Anzahl war nötig um die Messdaten möglichst genau nachzubilden. Die grau gestrichelt dargestellte Summe der einzelnen Funktionen (dünne schwarze Linien) liegt exakt auf den Messdaten (schwarze Linie mit erkennbarem Rauschen). Die Summe der Flächen der einzelnen Gauß-Funktionen entspricht somit dem zweiten Integral der Messdaten und ist da-

**Tabelle 4:** *Parameter der einzelnen Gauß-Funktionen aus denen die Messdaten in Abbildung 17 auf Seite 35 dargestellt wurden sowie die daraus berechneten Einzelflächen und deren Summe (jeweils vor der Bereinigung um die Vorverstärkung und vor Berücksichtigung des Korrekturfaktors).*

<i>Amplitude</i>	<i>Linienbreite</i>	<i>Fläche</i>
309,09	0,0948	62,39
227,79	0,0881	42,71
98,23	0,0917	19,18
347,34	0,5233	386,99
420,69	0,1596	142,97
510,16	0,2221	241,24
34,53	0,2217	16,30
137,84	0,2345	68,82
36,16	0,3281	25,26
305,24	0,4376	284,36
23,89	0,1047	5,33
515,42	0,3468	380,49
Summe		1676,02

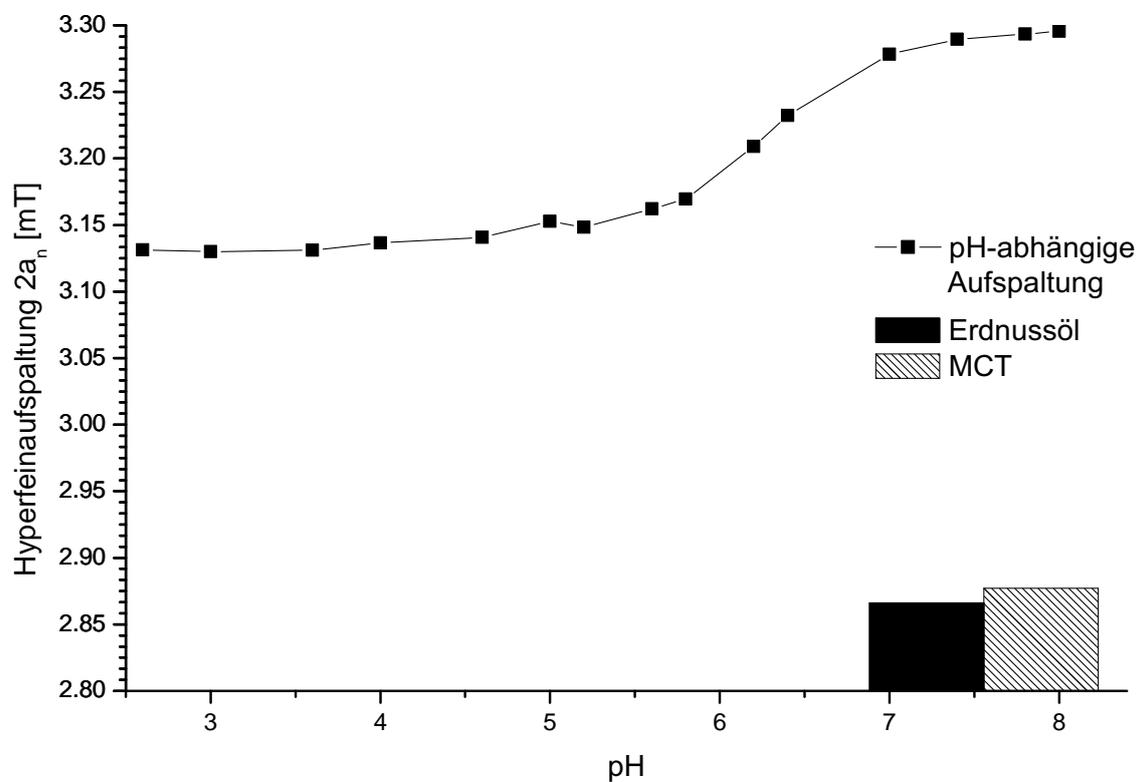
mit ein Maß für die Konzentration der Spinsonde. Die Signalintensität ist auf diese Weise bestimmt worden, da sowohl Integrieren, aufgrund einer teilweise nicht geraden Basislinie, als auch vollständiges Simulieren der Daten nicht möglich war. Da dieser Methode ausschließlich einzelne Gauß-Funktionen und keine vollständigen ESR-Spektren zugrunde liegen, ist dieses Verfahren ausschließlich zu Bestimmung der Gesamtintensität geeignet und stellt keine spektrale Analyse der Messdaten dar.

In Tabelle 4 auf Seite 36 sind die in Abbildung 17 ermittelten Amplituden und Breiten sowie die jeweils daraus berechneten Flächen und deren Summe dargestellt. Diese Prozedur wurde für alle vier Mischungen für jeweils jede der beiden Phasen durchgeführt und die Ergebnisse um die Vorverstärkung bereinigt. Außerdem wurde die unterschiedliche Mikrowellenabsorption durch einen Korrekturfaktor berücksichtigt, welcher für wässrige Systeme 1,00, für Erdnussöl 0,93 und für MCT 0,80 beträgt.

Tabelle 5 auf Seite 37 zeigt die zusammengefassten Ergebnisse aller Mischungen. Der Verteilungskoeffizient war demnach durch die Art des Öls beeinflusst. Zwischen den untersuchten pH-Werten schien jedoch in beiden Fällen kein messbarer Unterschied zu sein. Zusammenfassend ist festzustellen, dass ca. 2–2,5 % der gesamten Spinsonde in die Erdnussölphase diffundierten. Bei MCT waren es 8,5–9 %. Damit befand sich der mit

**Tabelle 5:** Zusammenfassung der Verteilungsdaten der Spinsonde AT zwischen PBS mit einem pH-Wert von 4,0 bzw. 6,1 und Erdnussöl bzw. MCT.

Öl	pH	Intensität <sub>PBS</sub>	Intensität <sub>Öl</sub>	Verteilungs- koeffizient $\frac{A_{\text{Öl}}}{A_{\text{PBS}}}$	Anteil im Öl $\frac{A_{\text{Öl}}}{A_{\text{PBS}} + A_{\text{Öl}}} \cdot 100\%$
Erdnussöl	4,0	153,42	3,62	0,024	2,31
	6,1	176,09	3,66	0,021	2,03
MCT	4,0	143,89	13,41	0,093	8,53
	6,1	163,93	15,79	0,096	8,79

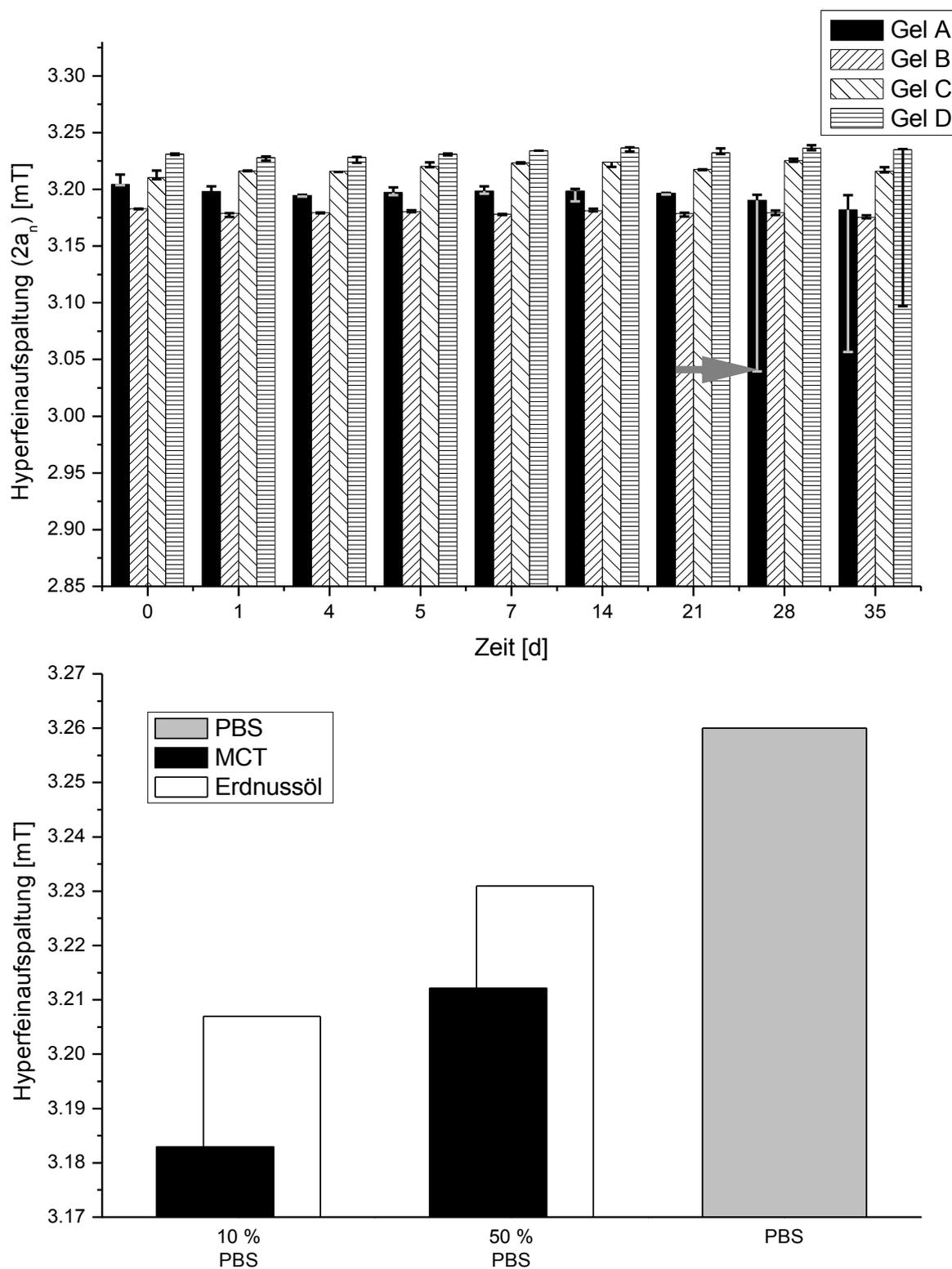


**Abbildung 18:** Darstellung der pH-Abhängigkeit der Hyperfeinaufspaltung ( $2a_n$ ) von AT. Zusätzlich ist die Aufspaltung in Erdnussöl und MCT zum Vergleich dargestellt.

Abstand größte Teil der Spinsonde in der für diese Untersuchung relevanten wässrigen Phase.

In Abbildung 18 auf Seite 37 ist die pH-Abhängigkeit der Hyperfeinaufspaltung von AT ( $2a_n$ ) dargestellt. In PBS schwankte diese zwischen ca. 3,13 mT bei sauren pH-Werten unter 4 und ca. 3,30 mT bei pH-Werten oberhalb von 8. Die Aufspaltung in Erdnussöl und MCT lag mit 2,87 mT bzw. 2,88 mT deutlich darunter.

Der zeitliche Verlauf der Hyperfeinaufspaltungen der Gele A–D wird in Abbildung 19 oben auf Seite 38 gezeigt. Die Säulen stellen dabei jeweils den Median aus drei Pro-



**Abbildung 19:** Oben: Darstellung der Veränderung der Hyperfeinaufspaltung. Diese änderte sich mit Ausnahme jeweils einer Probe der Gele A und D (Pfeil) nicht. Auffällig ist auch die stets gleiche Differenz zwischen den verschiedenen Systemen, welche deutlich größer als der Fehler ist. Unten: Übersicht über die Hyperfeinaufspaltungen in Abhängigkeit vom Wasseranteil (10, 50 und 100 %).

**Tabelle 6:** Über die Kalibrierung ermittelte pH-Werte für die an Tag 0 gemessenen Hyperfeinaufspaltungen.

<i>System</i>	<i>A</i>	<i>B</i>	<i>C</i>	<i>D</i>
2a <sub>n</sub>	3,2043	3,1829	3,2106	3,2311
pH-Wert	6,15	5,94	6,21	6,39

ben eines Systems dar. Die Fehlerbalken beschreiben den niedrigsten und den höchsten Wert. Von jeweils einer Probe der Gele A und D abgesehen waren keine Veränderungen über die Zeit zu erkennen. Auffällig war die stets gleiche Differenz zwischen den verschiedenen Systemen, welche deutlich größer als der Fehler war. Dabei ist es unwahrscheinlich, dass diese Unterschiede rein zufällig entstanden, da jeweils alle drei Proben eines Systems recht nahe beieinander lagen. Auch dürften real unterschiedliche pH-Werte nicht die Ursache gewesen sein. Bei einer unkritischen Übertragung der gemessenen Hyperfeinaufspaltungen auf die Kalibrierung, wie in Tabelle 6 am Beispiel der Werte für Tag 0 gezeigt, würden sich bereits um mehr als eine halbe Dekade abgefallene pH-Werte im Vergleich zum Ausgangswert von pH 6,8 ergeben. Viel wahrscheinlicher erschien dagegen, dass durch die Überlagerung von ESR-Signalen aus der wässrigen und der öligen Phase eine Hyperfeinaufspaltung entstand, welche je nach Anteilen der Phasen zwischen denen von AT in PBS mit einem pH-Wert von 6,8 und der in reinem Öl liegt. Auf der Basis dieser Theorie sind auch die Unterschiede zwischen den einzelnen Systemen plausibel erklärbar. Die größte Hyperfeinaufspaltung hatte Gel D. Es besitzt mit 50 % den höheren Anteil an wässriger Phase und enthält gleichzeitig mit Erdnussöl das Öl mit der geringeren Aufnahmefähigkeit für AT. Somit fiel das ESR-Signal aus öliger Umgebung hier am wenigsten ins Gewicht. Es resultierte der geringste Einfluss auf die Hyperfeinaufspaltung. Dieser Logik folgend besaß Gel C die zweitgrößte Aufspaltung, erneut aufgrund des höheren Wasseranteils bei jedoch höherem Anteil an Spinsonde im MCT. Gel A und schließlich B setzten die Reihe entsprechend fort. Durch die nur 10 % an innerer Phase (vergleiche Abbildung 19 unten) hatte das ESR-Signal des in Öl gelösten ATs einen deutlich größeren Einfluss, die Aufspaltung ist am geringsten. Dieser Ansatz wird auch durch die beiden „Ausreißer“ bei Gel A bzw. D bestärkt (siehe grauer Pfeil in Abbildung 19 oben), bei denen sich der pH-Wert plötzlich geändert zu haben schien. Die Aufspaltungen lagen hier nach 35 Tagen mit 3,0971 mT bei Gel D und sogar 3,0567 mT bei Gel A deutlich unterhalb der Kalibrierung. Dies ist ausschließlich durch die Überlagerung der wässrigen Signale mit der im Öl gelösten AT-Spezies möglich. Daraus resultiert jedoch dass eine eindeutige und absolute pH-Wert-Bestimmung in diesem Fall ausgeschlossen ist. Möglich ist dagegen relative Veränderungen des pH-Wertes zu beobachten. Eine Vergrößerung

oder Verkleinerung der Hyperfeinaufspaltung in der wässrigen Phase hat – in eventuell leicht abgeschwächter Form – den gleichen Einfluss auch auf die Hyperfeinaufspaltung des zusammengesetzten Signals.

Es war davon auszugehen, dass der pH-Wert unmittelbar nach der Herstellung sich immer noch bei 6,8 befand. Bei den meisten Proben war keine Veränderung im Verlaufe der Zeit zu beobachten. Der pH-Wert war demnach nach 35 Tagen immer noch bei 6,8. Die zwei Ausreißer zeigten dagegen eine deutliche Veränderung der Aufspaltung. Diese kann nur durch einen starken pH-Wert-Abfall auf einen Wert von unter 4 ausgelöst worden sein, da nicht davon auszugehen ist, dass sich die Verteilung von AT zwischen Erdnussöl und Puffer nach 21 Tagen bzw. 28 Tagen so schlagartig geändert hat.

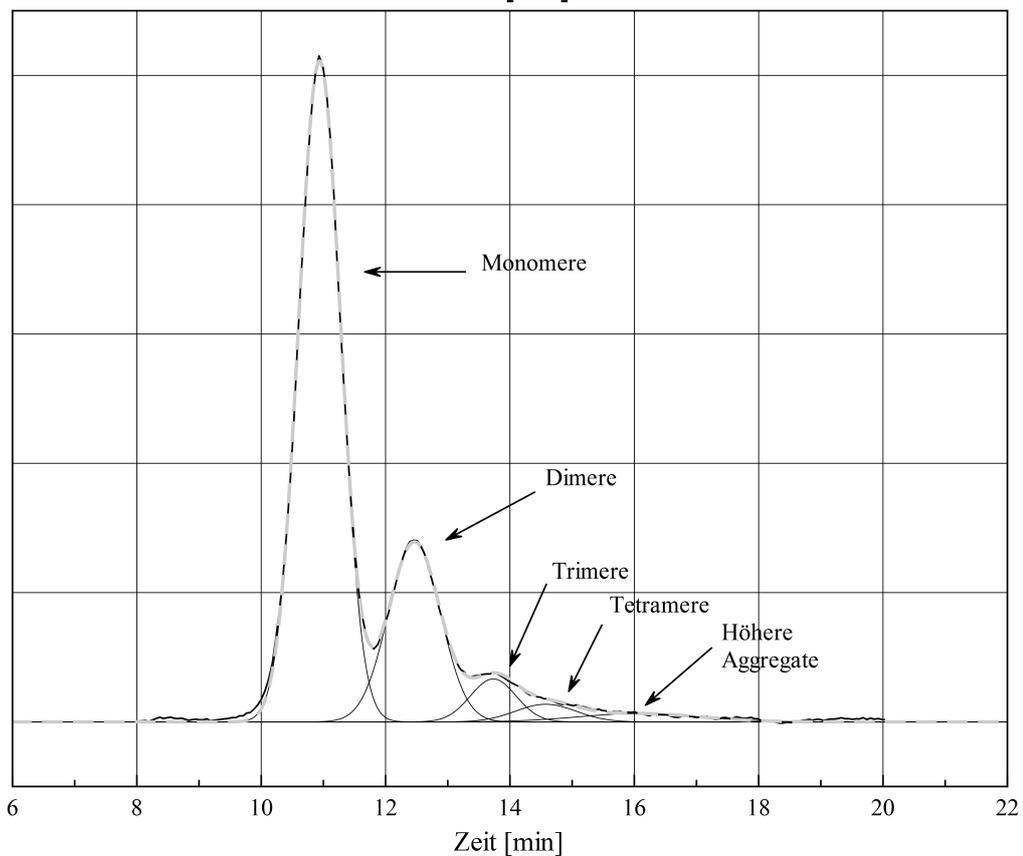
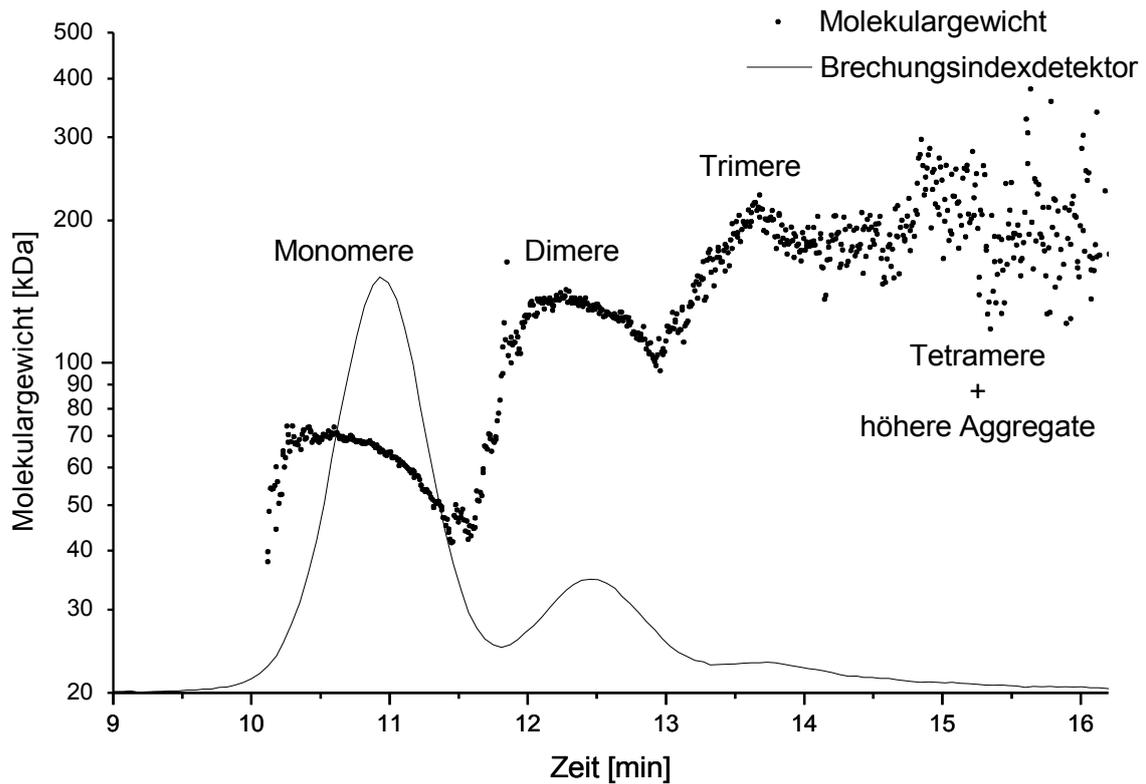
Eine mögliche Ursache für den vereinzelt Abfall des pH-Wertes könnte eine Besiedlung des Geles mit Bakterien sein. Die Proben konnten während der Inkubation nicht unter aseptischen Bedingungen gelagert werden. Nach einem möglichen Befall würde sich eine Bakterienkolonie zunächst langsam ausbreiten. Da die Systeme nicht hydrophil sind, fällt ein Bakterienwachstum zunächst schwer. Sobald jedoch Bakterien, welche auf diese Umgebung eingestellt sind, in ausreichender Zahl vorhanden sind und auch in die Tröpfchen der inneren Phase vordringen konnten, bauen diese die Triglyceride zu Glycerol, Mono- und Diglyceriden sowie Fettsäuren ab. Durch den resultierenden Zuwachs an freien Fettsäuren wird die Pufferkapazität überschritten und der pH-Wert verringert sich. Denkbar wäre auch eine Beeinflussung durch saure Stoffwechselprodukte anaerober Arten. Eine Autolipolyse ist in diesem Fall dagegen unwahrscheinlich. Der Verlauf ist demnach in einer *In-vivo*-Umgebung, in der eine Besiedlung mit Bakterien durch das Immunsystem behindert wird, nicht zu erwarten.

## 2.5. Proteinstabilität

### 2.5.1. Asymmetrische Fluss-Feldflussfraktionierung

Die Proben wurden wie in Kapitel 4.2.4 auf Seite 86 beschrieben hergestellt, vermessen und ausgewertet. Abbildung 20 oben auf Seite 41 zeigt die Überlagerung der Signale von Streulicht- und Brechungsindexdetektor. Mono-, Di- und Trimere waren eindeutig über die Molmasse identifizierbar. Für die Tetramere und höheren Aggregate war das Streusignal schlecht. Diese wurden über die jeweilige Retentionszeit zugeordnet, da höhere Molekulargewichte später eluiert werden.

Abbildung 20 unten zeigt am Beispiel von Gel A das Einpassen der Gauß-Funktionen an die Messdaten. Die fünf Einzelfunktionen (dünne schwarze Linien) sind in ihrer Summe (dicke grau gestrichelte Linie) deckungsgleich zu den zu den Originaldaten des Brechungsindexdetektors.



**Abbildung 20:** Oben: Bestimmung der Molmassen der einzelnen Signale des Brechungsindexdetektors. Mono-, Di- und Trimere sind eindeutig zuordenbar. Tetramere und höhere Aggregate liefern ein zu schlechtes Streusignal. Unten: Einpassen von fünf Gauß-Funktionen in das Chromatogramm des Brechungsindexdetektors.

**Tabelle 7:** Massenanteile der verschiedenen Aggregate (Mittelwert aus drei Messungen). Die Referenz stellt die ursprüngliche Rinderserumalbuminlösung, die Kontrolle die parallel mit Dichlormethan behandelte Lösung und Gel C 2 und D 2 die Proben ohne Emulgator dar.

Probe	Anteile in %			
	Monomer	Dimer	Trimer	Tetramer
Referenz	73,9	17,7	4,3	4,0
Gel A	67,7	22,7	4,9	4,6
Gel B	61,9	25,8	7,1	5,2
Gel C	65,6	22,9	6,7	4,8
Gel D	63,4	25,6	5,2	5,8
Kontrolle	57,4	27,9	6,2	8,5
Gel C 2	71,5	13,3	8,8	6,4
Gel D 2	71,1	13,4	8,9	6,6

Tabelle 7 auf Seite 42 zeigt die Massenverteilung der verschiedenen Aggregate. Die Referenz ist dabei die ursprüngliche Rinderserumalbuminlösung, die Kontrolle die parallel zu den anderen Proben mit Dichlormethan behandelte Lösung und Gel C 2 und D 2 die ohne Dichlormethan extrahierten Proben ohne Emulgator. Es zeigte sich, dass das Albumin von diesem Extraktionsverfahren keinesfalls unbeeinflusst blieb. Die Kontrolle wies mit 57,4% sogar den geringsten Gehalt an Monomeren auf. Selbst die eigentlichen Proben der Gele A–D liegen mit 61,9–67,7% Monomeren darüber. Ursache hierfür ist wahrscheinlich, dass das Protein erst nach und nach aus dem Gel extrahiert wurde und somit dem Dichlormethan über einen geringeren Zeitraum ausgesetzt war. Der Vergleich aus der Referenz und den Proben „Gel C 2“ und „Gel D 2“ ließ vermuten, dass durch den Herstellungsprozess der Gele selbst das Albumin nur wenig aggregiert war. Dies ist jedoch nur ein Indiz und kein Beweis, da durch den fehlenden Emulgator die chemische und physikalische Belastung des Proteins während der Herstellung durchaus unterschiedlich sein konnte. Die thermische Belastung während des Härtungsschrittes unterschied sich jedoch nicht. Dieser ist aufgrund der vorliegenden Daten – zumindest für Rinderserumalbumin – als unproblematisch zu betrachten.

### 2.5.2. Elektronenspinresonanzspektroskopie

Mittels Elektronenspinresonanzspektroskopie sollten Informationen über die Protein-stabilität anhand der Mobilität gewonnen werden. Zunächst wurde Rinderserumalbumin wie in Kapitel 4.2.9.1 auf Seite 92 markiert. Anschließend wurde eine Probe davon

mittels Asymmetrischer Fluss-Feldflussfraktionierung vermessen, um die bereits durch die Synthese verursachte Aggregation zu beurteilen. Darüber hinaus konnte damit die Erhöhung der Molmasse bestimmt werden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 21 auf Seite 44 dargestellt. Die Grafik im unteren Bereich zeigt das Einpassen von Gauß-Funktionen in die Signalkurve des Brechungsindexdetektors. Es ist deutlich erkennbar, dass nur noch wenige Moleküle als Monomere vorlagen. Tetramere und höhere Aggregate stellen den Hauptanteil dar. Die Zuordnung zwischen Molmasse und Brechungsindexdetektorsignal ist in der oberen Grafik dargestellt. Darüber konnte die Molmasse bestimmt werden. Dafür wurde das Signal der Dimere herangezogen, da die Molmassendaten dieser aufgrund der höheren Konzentration ein geringeres Rauschen aufwiesen. Es wurde ein Molekulargewicht von ca. 160 kDa und damit 80 kDa für die Monomere ermittelt. Über die Berechnung in Gleichung 1 ergab sich somit ein Markierungsgrad von ca. 87 mol PCU pro mol Albumin. Bei einer geschätzten Toleranz beim Ermitteln der Molmasse von  $\pm 2$  kDa war eine Spanne von  $\pm 6 \frac{\text{mol}}{\text{mol}}$  beim Markierungsgrad anzunehmen.

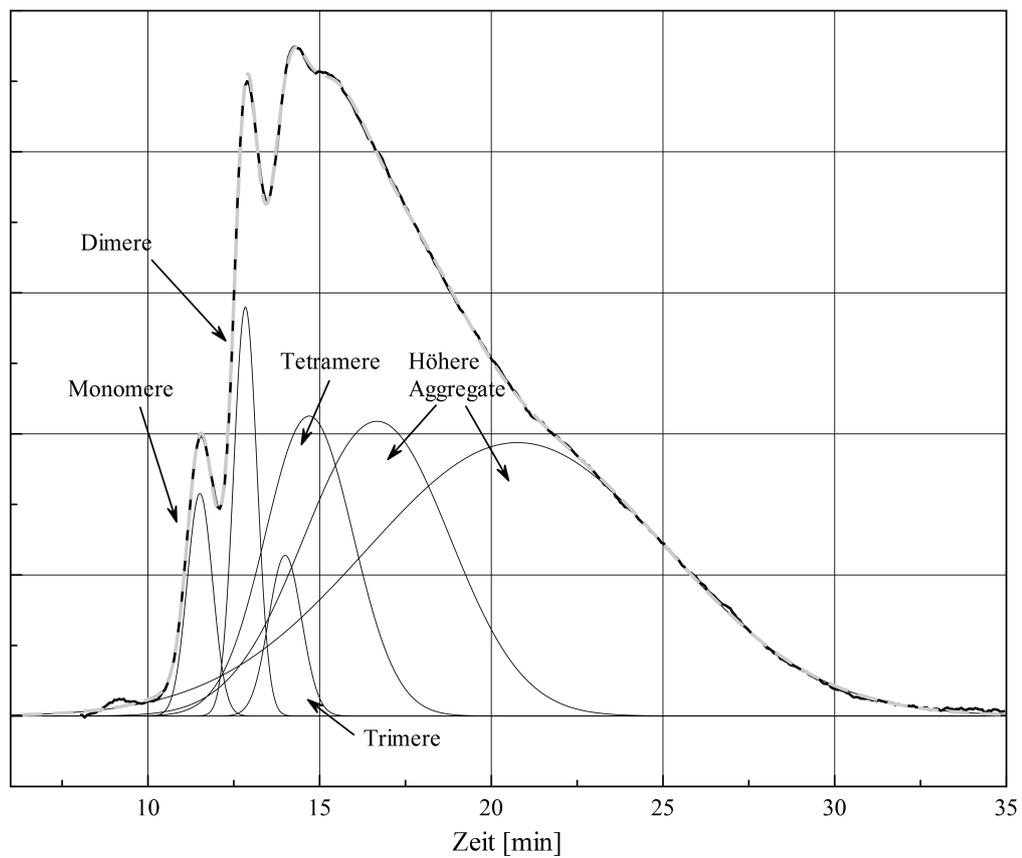
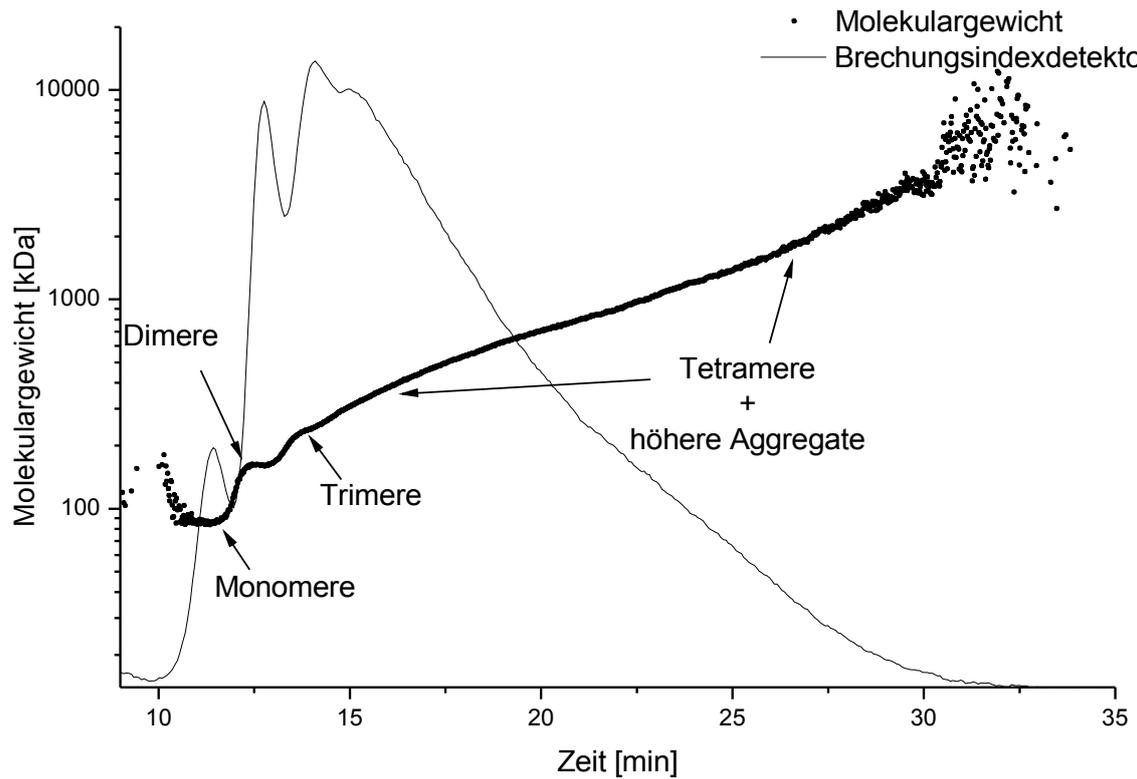
$$f = \frac{n_{\text{PCU}}}{n_{\text{PCU-BSA}}} = \frac{M_{\text{PCU-BSA}} - M_{\text{BSA}}}{M_{\text{PCU-Rest}}} = \frac{80 \text{ kDa} - 66 \text{ kDa}}{166 \text{ Da}} = 87 \quad (1)$$

Neben dem Auftreten von Aggregation und der molaren Masse wurde untersucht, ob die Spinsonde wirklich an das Protein gebunden war oder ob es nur als physikalische Mischung vorlag. Wie Abbildung 22 auf Seite 45 oben zeigt, war das Spektrum stark verformt. Dies ist auf eine starke Spin-Spin-Austauschverbreiterung aufgrund des hohen Markierungsgrades zurückzuführen. Mit Hilfe von Gleichung 2 wurde eine Spin-konzentration von  $10,9 \frac{\text{mmol}}{\text{l}}$  in der Lösung berechnet.

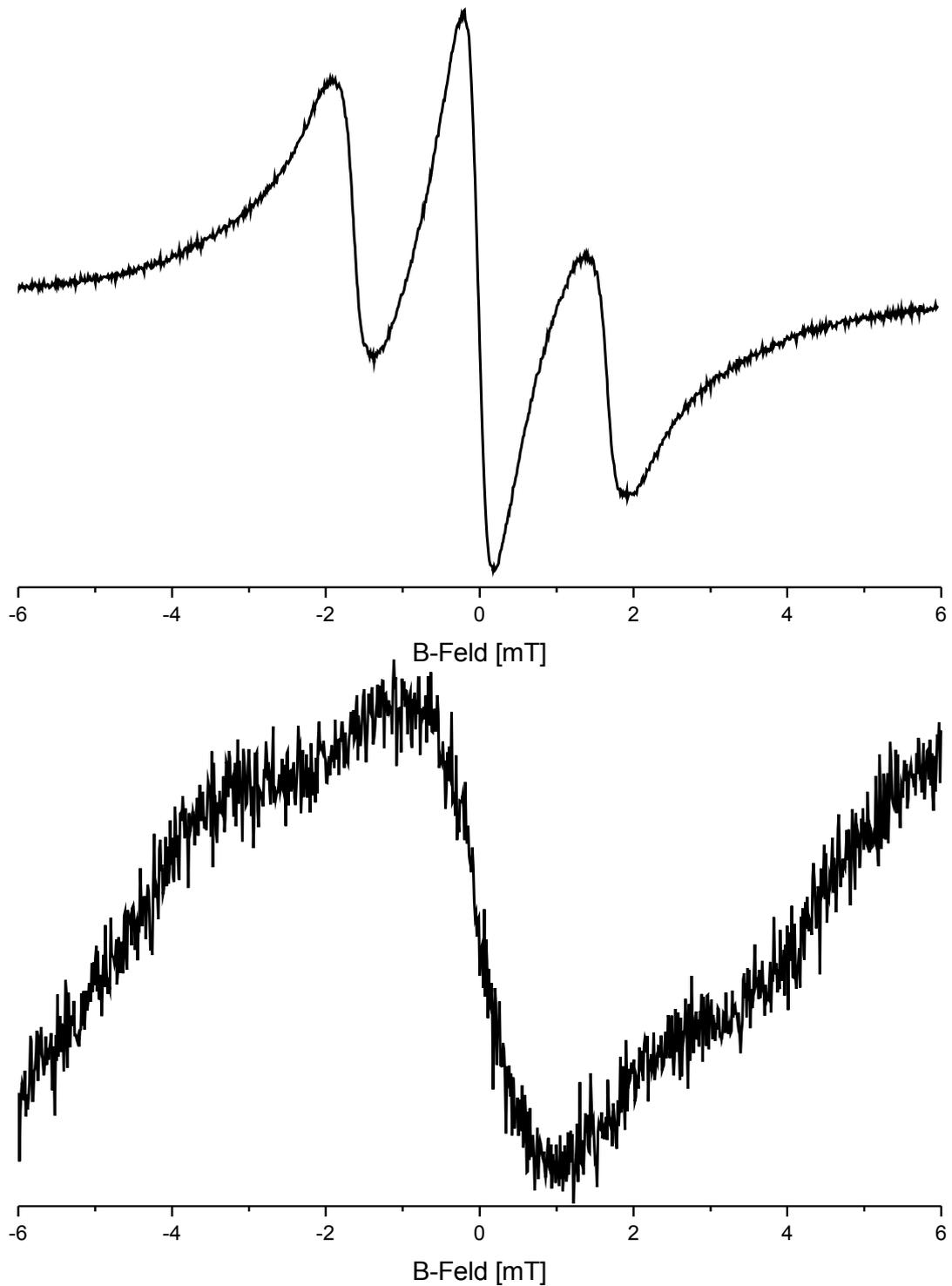
$$c_x = \frac{n_{\text{PCU}}}{V} = \frac{n_{\text{PCU-BSA}} \cdot f}{V} = \frac{\frac{m_{\text{PCU-BSA}}}{M_{\text{PCU-BSA}}} \cdot f}{V} = \frac{\frac{10 \text{ mg}}{80 \text{ kDa}} \cdot 87}{1 \text{ ml}} \approx 10,9 \frac{\text{mmol}}{\text{l}} \quad (2)$$

Spin-Spin-Austauscheffekte sind dabei durchaus zu erwarten. Eine so starke Verbreiterung, wie in Abbildung 22 oben zu sehen ist, tritt jedoch nicht auf. Dies weist darauf hin, dass eine lokal deutlich höhere Konzentration vorliegen muss, wie dies bei den nahe beieinander liegenden Bindungsstellen des BSAs der Fall ist. Da selbst kleinste Mengen an freier Spinsonde als deutlich schmalere Signalspitzen zu sehen gewesen wären, war davon auszugehen, dass bei der Dialyse sämtliche freien Spinsondenmoleküle entfernt worden waren.

Für die Stabilitätsuntersuchung wurden die Proben wie in Kapitel 4.2.9.2 auf Seite 92 hergestellt und gelagert. Durch die starke Linienverbreiterung aufgrund des Markierungsgrades waren zwar keine Aussagen über geringe Beweglichkeitsunterschiede, wie z.B. bei fortschreitender Aggregation möglich, jedoch konnte untersucht werden,



**Abbildung 21:** PCU-markiertes Rinderserumalbumin; oben: Gemeinsame Darstellung des Signals des Brechungsindexdetektors und der mittels Lichtstreuung bestimmten Molekulargewichte. Unten: Einpassung von 6 Gauß-Funktionen in das Brechungsindexdetektorsignal.



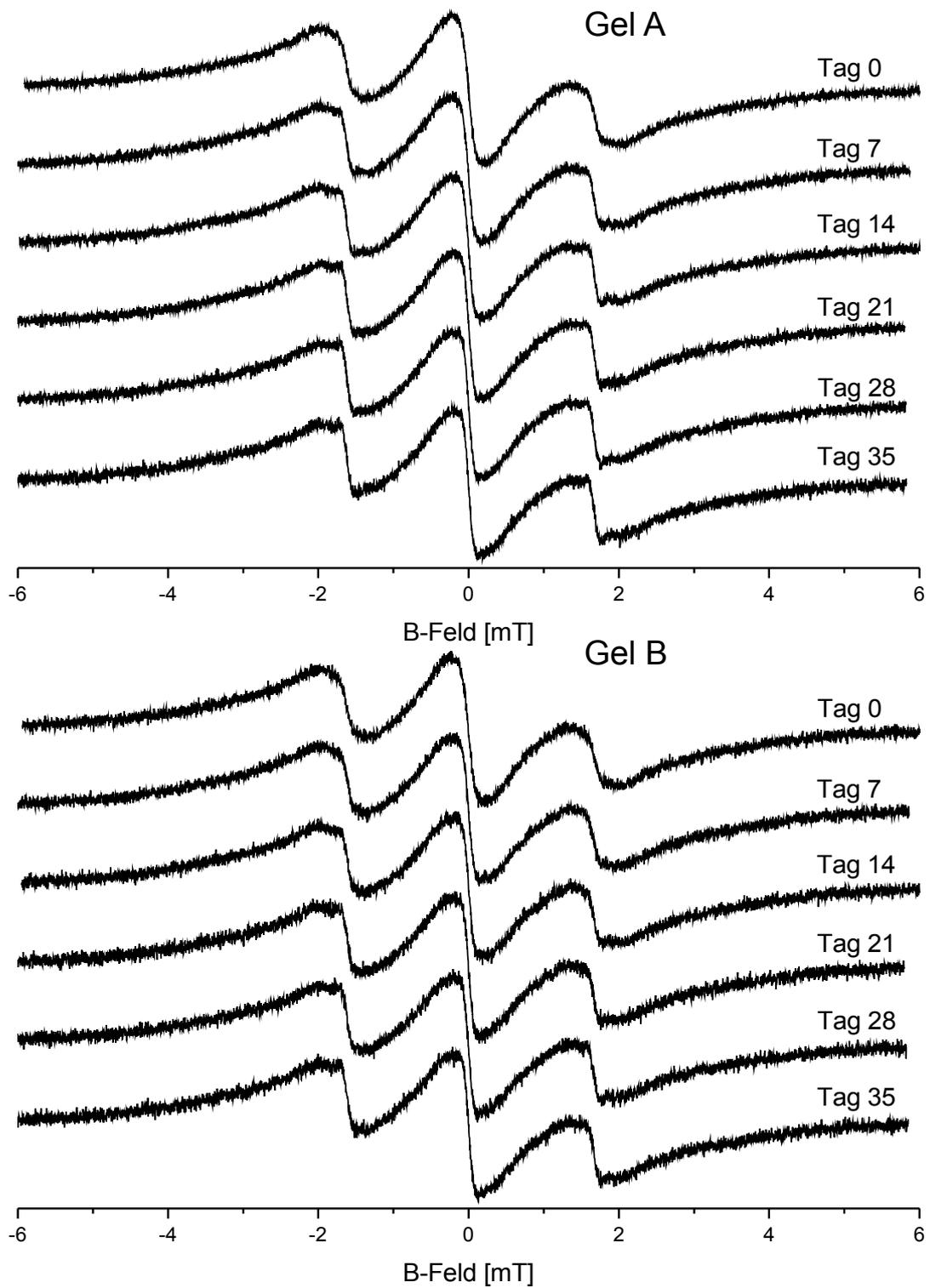
**Abbildung 22:** ESR-Spektrum des spinmarkierten Rinderserumalbumins bei einer Konzentration von  $10 \frac{\text{mg}}{\text{ml}}$  (oben) sowie ungelöst (unten).

inwiefern sich der gesamte bewegliche Anteil verringert, was auf eine Präzipitation hindeuten würde (Abbildung 22 unten) oder sich nicht spin-spin-austauschverbreiterte Anteile ausbilden, was geringere lokale Konzentrationen und damit eine Zersetzung des Proteins anzeigen würde. Eine Synthese mit geringerem Markierungsgrad war keine Option, da die zu untersuchenden Systeme teilweise nur 10 % wässrige Phase enthielten und damit nur ein sehr schwaches Signal detektierbar war.

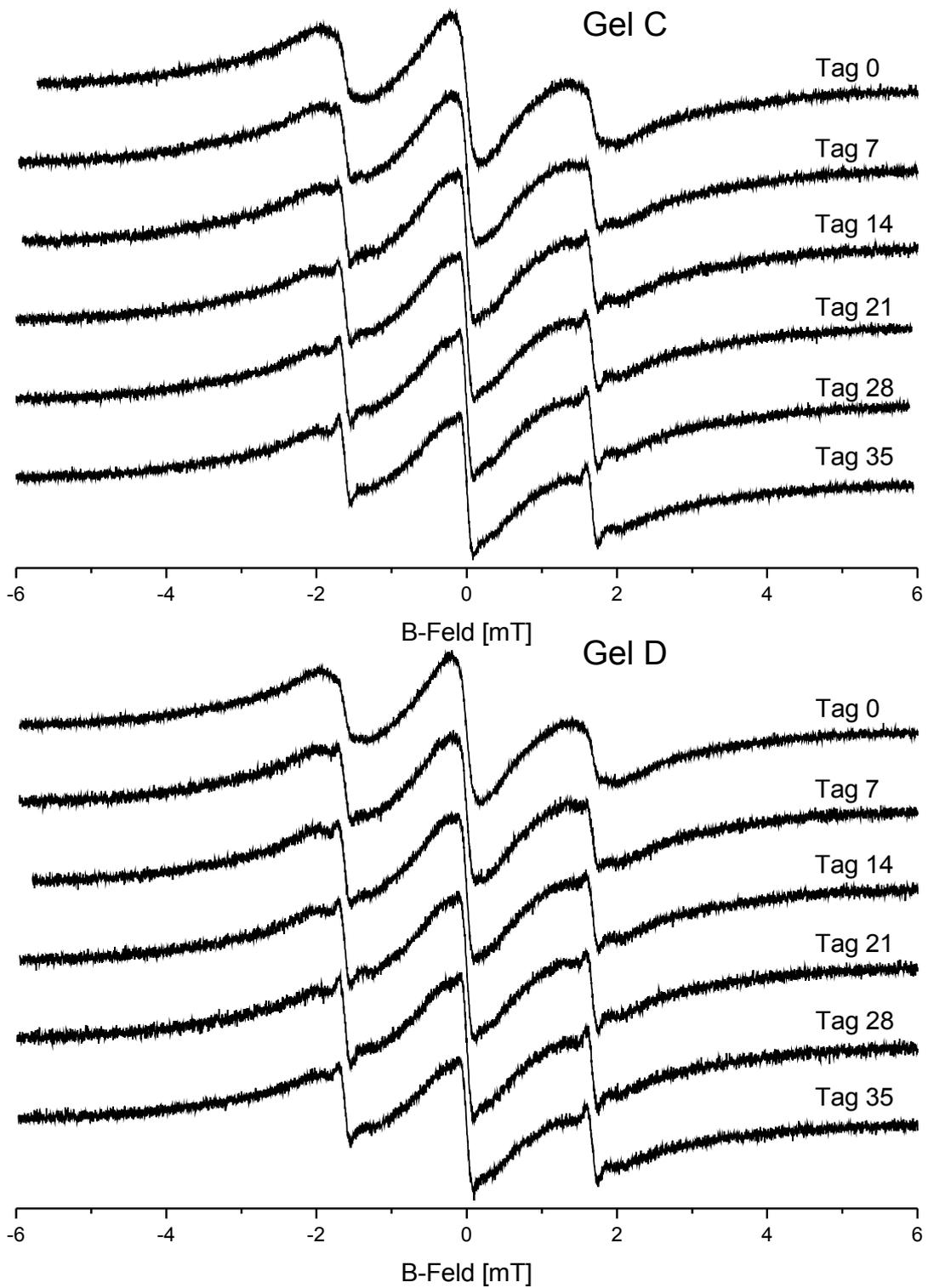
Die Abbildungen 23, 24 und 25 auf den Seiten 47, 48 und 49 zeigen die Spektren von jeweils einer ausgewählten Probe jedes Gels im Verlauf von 35 Tagen bzw. die konservierte und die unkonservierte Kontrolllösung im Verlauf von 28 Tagen. Eine Abnahme des mobilen Spektrums konnte für keine Probe beobachtet werden. Bei den Gelen A und B war keine Veränderung zu erkennen. Bei den Gelen C und D war dagegen die Ausbildung einer noch mobileren Spezies zu sehen. An Tag 7 ist diese bei beiden Systemen das erste Mal im Ansatz sichtbar. Im Verlauf der Zeit bildete sich dieser mobile Anteil dann immer weiter aus.

Im Vergleich dazu zeigte die unkonservierte Kontrolllösung (Abbildung 25) jedoch ein deutlich ungünstigeres Verhalten. Bereits nach 14 Tagen war ein erheblicher Anteil der Spinsonde frei beweglich. Bei der konservierten Lösung dagegen, waren die Veränderungen mit denen der entwickelten Systeme vergleichbar. Demnach wurde dieser Abbau wahrscheinlich durch mikrobiologische Einflüsse hervorgerufen und durch Natriumazid und durch die Formulierung in den neuen Systemen verlangsamt bzw. verhindert. Die antimikrobielle Wirkung der Gele C und D war somit mit der einer Natriumazidlösung mit einer Konzentration von 0,02 % vergleichbar, obwohl keine konservierenden Zusätze enthalten waren. Dies stellt für spätere Anwendungen einen großen Vorteil dar. Da auf eine Konservierung der Arzneimittel verzichtet werden kann, sind Probleme mit Wechselwirkungen zwischen Konservierung und Protein bzw. Arzneistoff ausgeschlossen. Auch Allergien und andere Unverträglichkeiten gegenüber Konservierungsmitteln spielen somit keine Rolle.

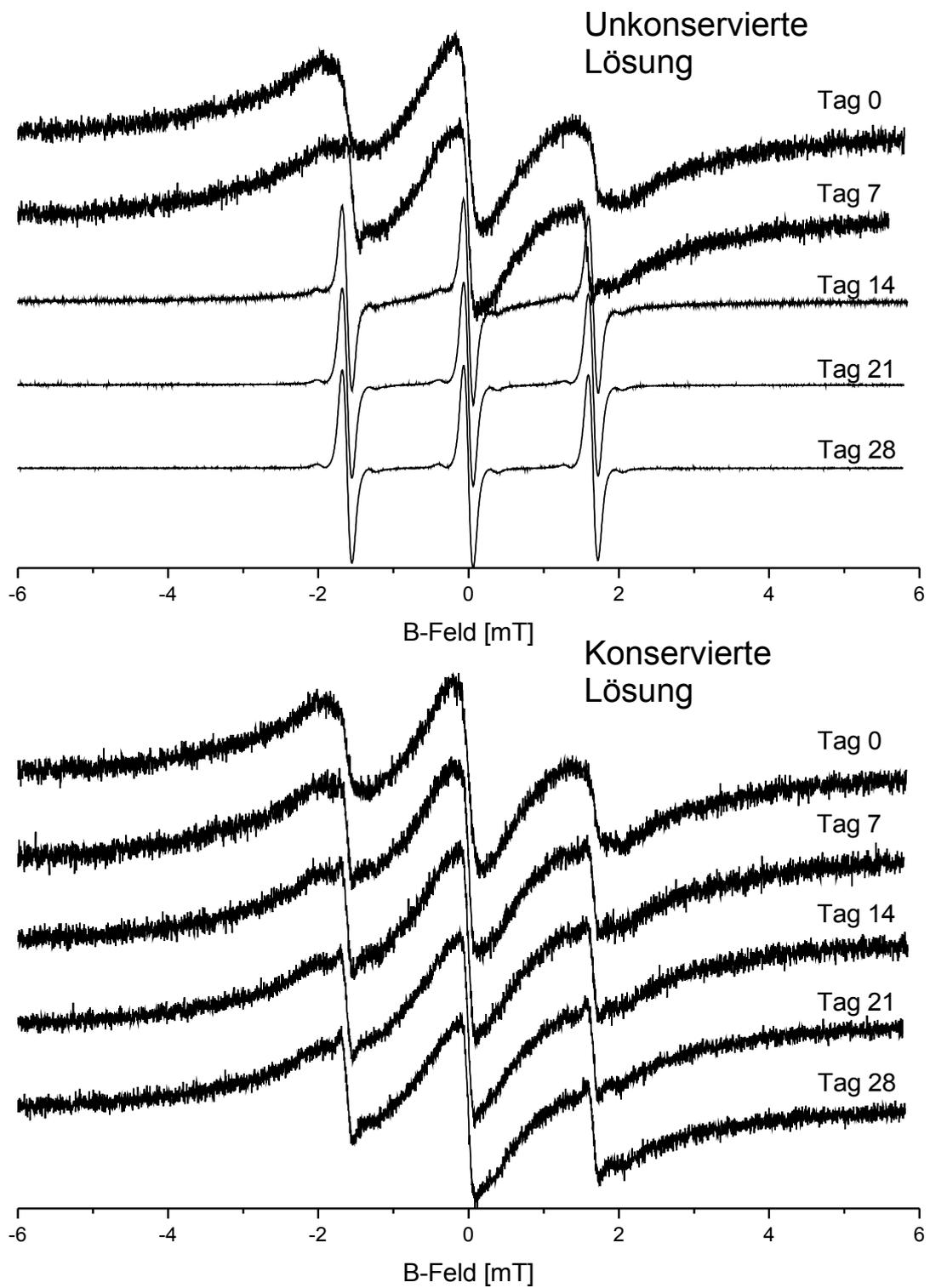
Trotz dieser positiven Eigenschaft konnte eine leichte Zunahme an mobiler Spezies bei den Systemen mit 50 % innerer Phase beobachtet werden. Eine exakte Quantifizierung des mobilen Anteils ist deshalb von großem Interesse. Mit EPRSIM-C, V.6.2 wurde versucht [97] über eine Simulation die verschiedenen Anteile am Gesamtspektrum quantitativ zu bestimmen. Abbildung 26 auf Seite 50 zeigt die einzelnen simulierten Spektren am Beispiel des Spektrums von Gel D nach 35 Tagen, welches die Veränderung am deutlichsten zeigte. Die Messdaten setzten sich demnach neben der mobilen noch aus zwei weiteren Spezies zusammen, welche auf an Albumin gebundene Spinsonde zurückzuführen waren. Laut diesen Ergebnissen machte der mobile Anteil trotz deutlicher Sichtbarkeit nur 1,2 % des Gesamtspektrums aus. Da die Differenz zwischen Simulation und Messdaten jedoch nicht weit genug reduziert werden konnte, ist dies



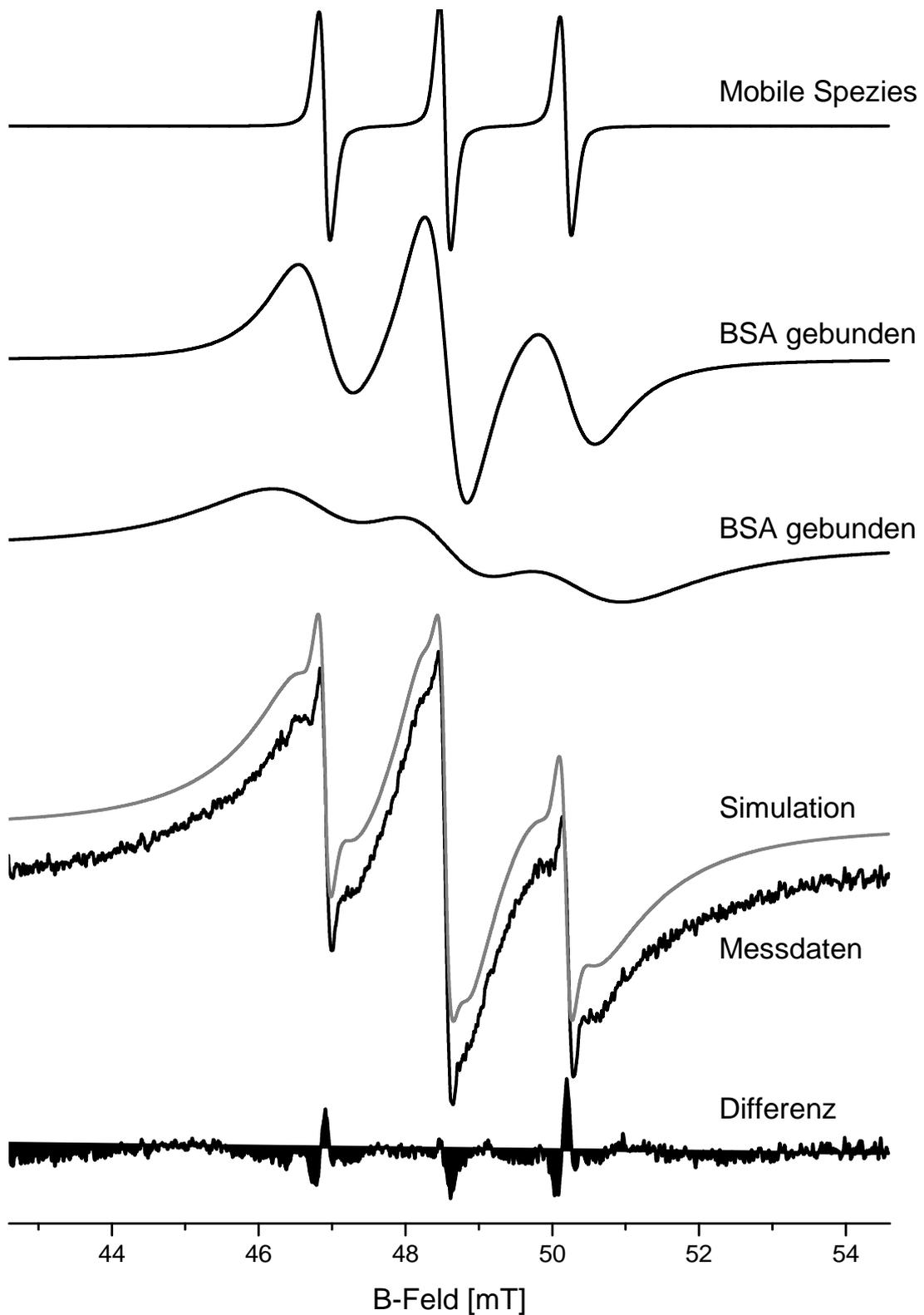
**Abbildung 23:** ESR-Spektren des spinmarkierten Rinderserumalbumins im Verlauf von 35 Tagen in den Gelen A (oben) und B (unten).



**Abbildung 24:** ESR-Spektren des spinmarkierten Rinderserumalbumins im Verlauf von 35 Tagen in den Gelen C (oben) und D (unten).



**Abbildung 25:** ESR-Spektren des spinmarkierten Rinderserumalbumins im Verlauf von 28 Tagen in PBS pH 6,8 unkonserviert (oben) und konserviert (unten).



**Abbildung 26:** Simulation des Spektrums von Gel D nach 35 Tagen. Trotz des deutlich sichtbaren Signals der mobilen Spezies beträgt deren Anteil am Gesamtspektrum laut Simulation nur 1,2%.

nur als grobe Orientierung aufzufassen. Dennoch kann die Menge an zersetztem Protein als vernachlässigbar klein eingestuft werden. Das Protein war somit innerhalb des untersuchten Zeitraums stabil. Auf eine genauere Untersuchung der Anteile der verschiedenen Spezies wurde jedoch aufgrund der zu großen Abweichung der Simulation von den Originalmesswerten verzichtet.

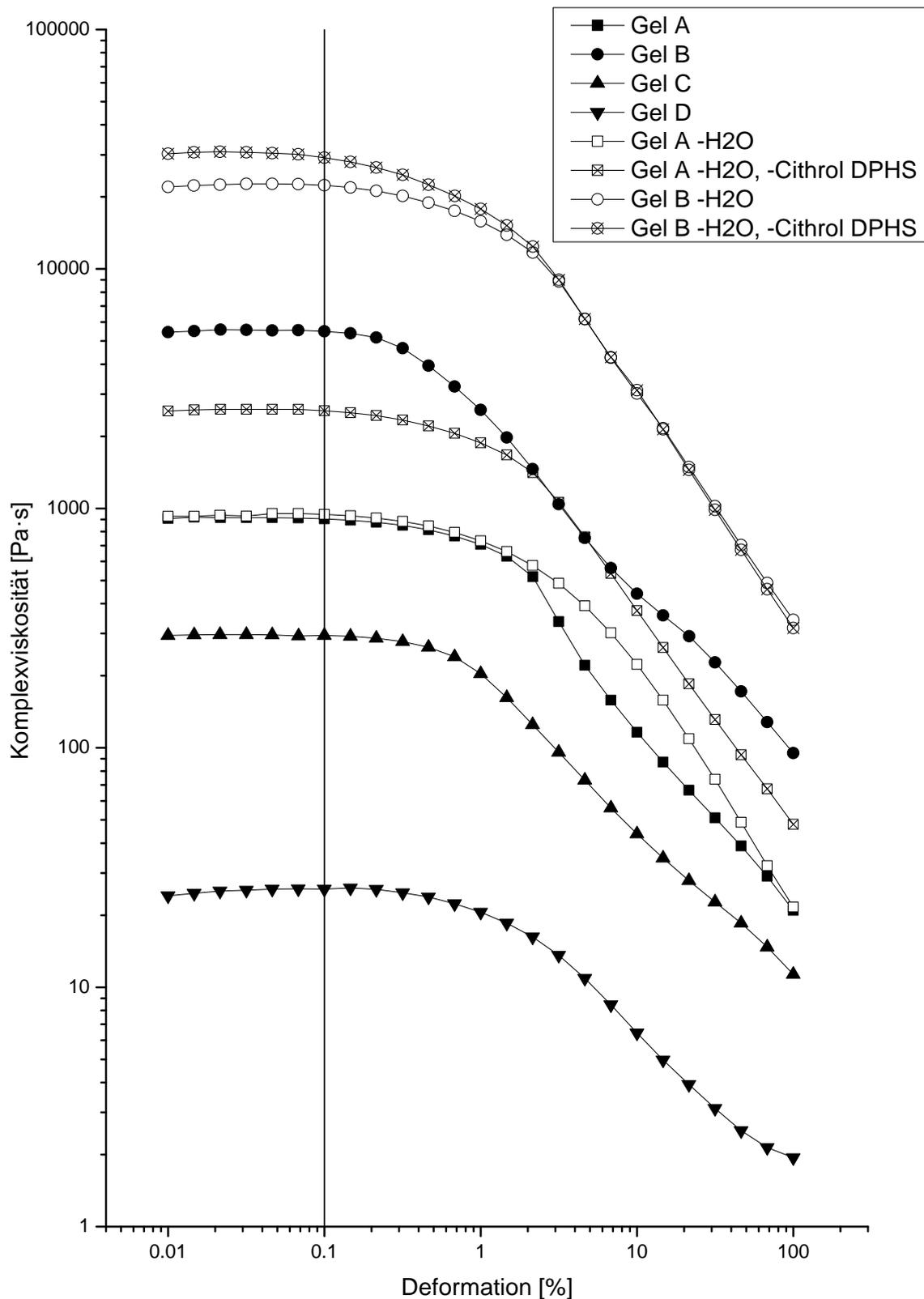
## 2.6. Rheologie

Die Gele A–D sowie die Gele A und B jeweils in einer wasserfreien und einer wasser- und emulgatorfreien Variante wurden mittels oszillierender Rheologie untersucht. Wie in Abbildung 27 auf Seite 52 zu sehen ist, zeigten alle acht gemessenen Systeme einen linearviskoelastischen Bereich. Die Grenze dessen war zwar unterschiedlich, befand sich jedoch in jedem Fall im Bereich von 0,1–1 % Deformation. Damit war der Bereich kleiner als z.B. der der Chitosan- $\beta$ -Glycerolphosphat-Gele von Kempe et. al. [53], welche bei einer Deformation von 1 % weiter untersucht werden konnten. Deshalb musste eine Deformation von 0,1 % für die frequenzabhängige Messung gewählt werden.

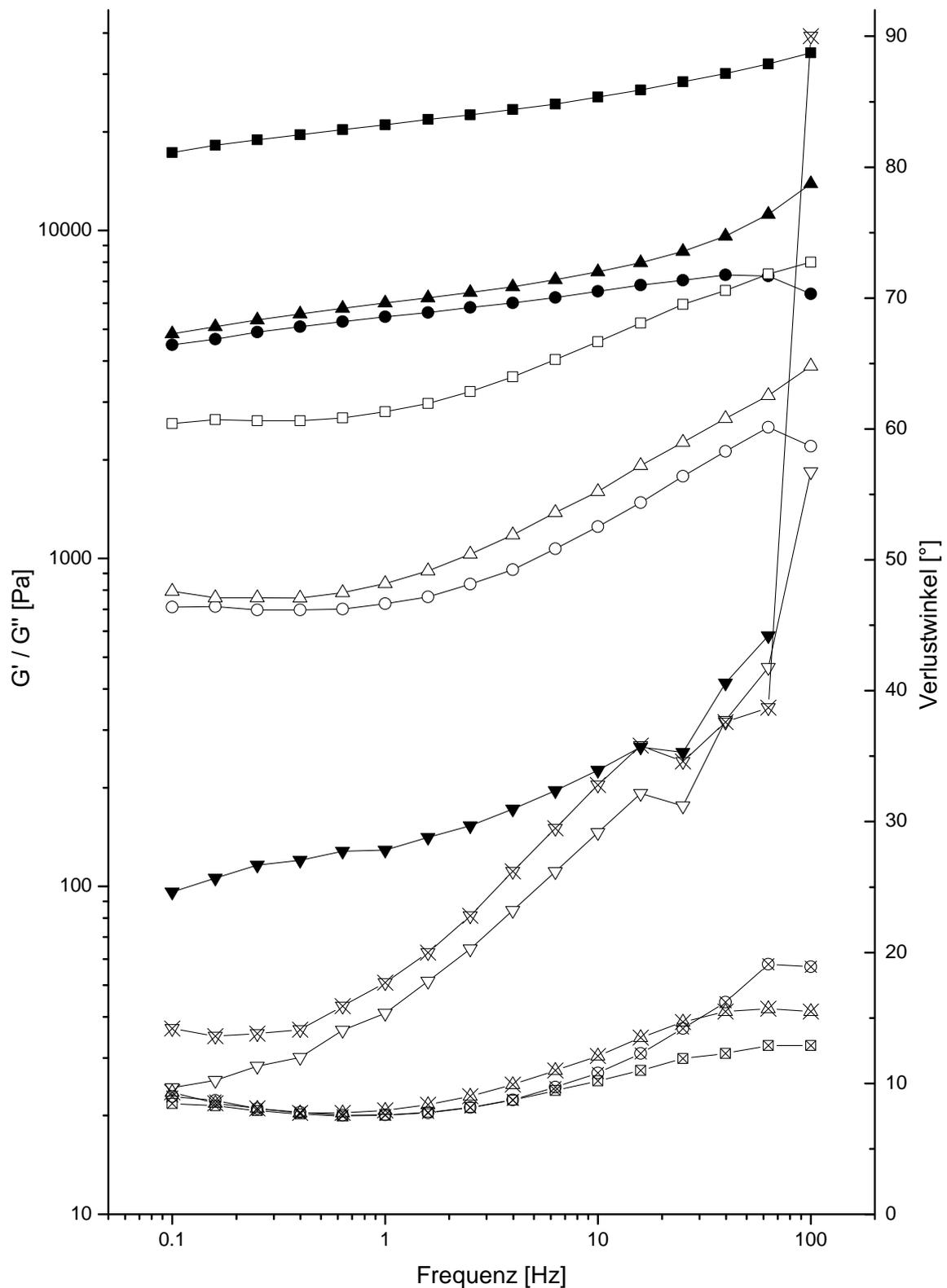
Durch die im Zusammenhang damit bestimmten Komplexviskositäten ließen sich bereits weitere Aussagen treffen. Den mit Abstand höchsten Wert in diesem Bereich zeigten die Gele auf MCT-Basis ohne innere Phase. Es folgte mit einem gewissen Abstand das MCT-Gel mit 10 %. Die Erdnussölgele lagen in der gleichen Reihenfolge mehr als eine Zehnerpotenz darunter. Die niedrigsten Komplexviskositäten zeigten die beiden Gele mit 50 % innerer Phase. Die Reihenfolge der beiden Öle schien zunächst im Widerspruch zum Ergebnis von Kapitel 2.1.1 auf Seite 20 zu stehen, da MCT die schwächeren Gele ausbildet. Jedoch wurde bereits bei der Einführung des Verfestigungsschrittes in Kapitel 2.1.4 auf Seite 25 festgestellt, dass dabei die Gelbildungstemperatur der Erdnussölgele nicht überschritten wird und demnach eine Verfestigung von weitaus geringerem Ausmaß als bei MCT-Gelen erreicht wird. Darüber hinaus war ein eindeutiger Einfluss des Anteils an innerer Phase auf die Komplexviskosität zu sehen. Bei einem Anteil von 50 % ist diese um mindestens eine Zehnerpotenz verringert.

In den Abbildungen 28 und 29 auf den Seiten 53 und 54 ist der Verlustwinkel während der frequenzabhängigen Messung dargestellt. Mit Ausnahme des Gels mit 50 % innerer Phase auf Erdnussölbasis (Gel D) zeigten alle Systeme über den gesamten Messbereich einen Verlustwinkel von unter  $45^\circ$  und damit vorwiegend elastisches Verhalten. Gel D wies von Beginn an einen geringeren Anteil an Elastizität auf. Diese nahm bei steigender Frequenz stetig weiter ab. Bei 100 Hz wurde eine vollständige Plastizität gemessen.

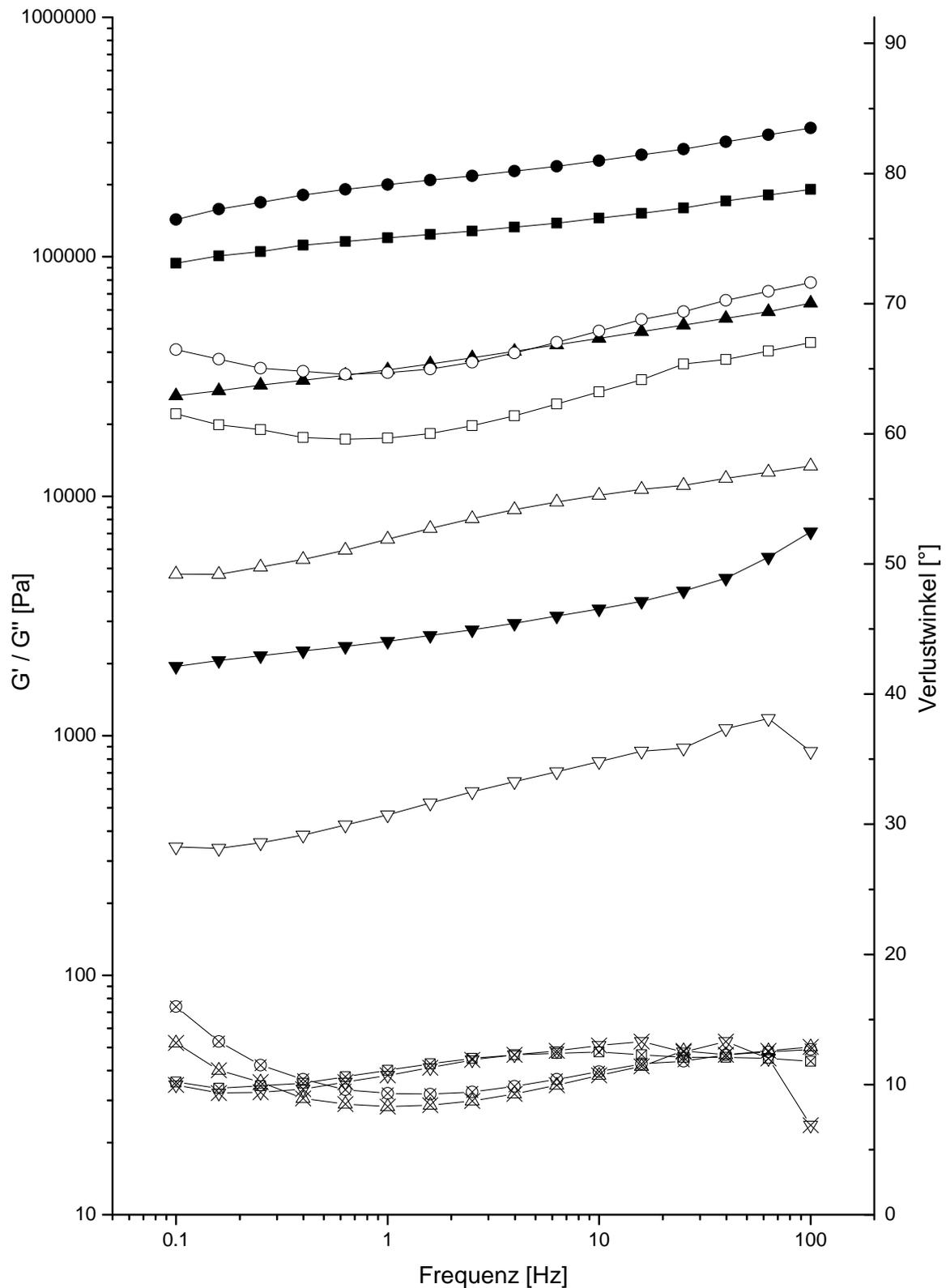
Die Gele waren demzufolge zunächst recht stabile, nahezu ideale Festkörper. Anhand der Speicher- und Verlustmodule zeigte sich, dass diese bis zu einer Menge von 10 % an innerer Phase deutlich stabiler waren, als die bereits erwähnten Chitosan- $\beta$ -



**Abbildung 27:** Bestimmung des linearviskoelastischen Bereichs der Gele A–D sowie der Gele A und B jeweils in einer wasserfreien und einer wasser- und emulgatorfreien Variante bei einer Frequenz von 1 Hz. Bei 0,1% Deformation befinden sich noch alle Proben im linearviskoelastischen Bereich.



**Abbildung 28:** Frequenzabhängige Messung bei einer Deformation von 0,1% für die erdnussölhaltigen Gele. Die zugehörige Legende ist aus Gründen der Übersichtlichkeit separat in Tabelle 8 auf Seite 55 dargestellt. Mit Ausnahme des Gels mit 50% innerer Phase besaßen alle Systeme über den gesamten Frequenzbereich einen Verlustwinkel von unter 45° und zeigten damit vorwiegend elastische Eigenschaften. Die Rangordnung der Speicher- und Verlustmodule entsprach jener der deformationsabhängigen Messung.



**Abbildung 29:** Frequenzabhängige Messung bei einer Deformation von 0,1% für die MCT-haltigen Gele. Die zugehörige Legende ist aus Gründen der Übersichtlichkeit separat in Tabelle 8 auf Seite 55 dargestellt. Alle Systeme auf MCT-Basis besaßen über den gesamten Frequenzbereich einen Verlustwinkel von unter 45° und zeigten damit vorwiegend elastische Eigenschaften. Die Rangordnung der Speicher- und Verlustmodule entsprach jener der deformationsabhängigen Messung.

**Tabelle 8:** Legende zu den Abbildungen 28 und 29 auf den Seiten 53 und 54. Die Form der Symbole bestimmt das jeweils gemessene System, die jeweilige Symbolfüllung den gemessenen Parameter. Die Bezeichnung „Öl“ wurde stellvertretend für Erdnussöl bzw. MCT in Abhängigkeit jeweiligen Abbildungen verwendet.

Zusammensetzung	G'	G''	Verlustwinkel
54 mg 12-Hydroxystearinsäure ad 1,8 g Öl	—■—	—□—	—⊗—
54 mg 12-Hydroxystearinsäure 40 mg Cithrol™ DPHS ad 1,8 g Öl	—●—	—○—	—⊗—
54 mg 12-Hydroxystearinsäure 40 mg Cithrol™ DPHS ad 1,8 g Öl +200 µl Wasser f. Inj.	—▲—	—△—	—⊗—
30 mg 12-Hydroxystearinsäure 40 mg Cithrol™ DPHS ad 1 g Öl +1000 µl Wasser f. Inj.	—▼—	—▽—	—⊗—

Glycerolphosphat-Gele von Kempe et. al. [53] mit einem Speicher- bzw. Verlustmodul von ca. 1000 Pa bzw. 100 Pa. Das MCT-Gel mit 50% innerer Phase war mit diesen vergleichbar, das entsprechende System auf der Basis von Erdnussöl dagegen unterlegen. Dem gegenüber stand der kleinere linearviskoelastische Bereich. Die Implantate wurden bereits bei einer kleineren Verformung irreversibel beeinflusst. Jedoch war bei den meisten Systemen dazu eine deutlich größere Beanspruchung notwendig.

Die Schergeschwindigkeit der die Systeme ausgesetzt waren wurde mittels der Gleichungen 3–11 berechnet. In Gleichung 3 wurden zunächst die einer oszillierenden Bewegung zu Grunde liegende Beziehung von momentaner Geschwindigkeit  $v$ , maximaler Geschwindigkeit  $v_{\max}$ , Frequenz  $f$  und Zeit  $t$  sowie die allgemein für alle Bewegungen geltende Beziehung von Weg  $s$ , Geschwindigkeit  $v$  und Zeit  $t$  aufgezeigt. In Gleichung 4 wurden diese zusammengeführt. Durch Integration erhielt man Gleichung 5.

$$s = \int_0^t v dt \quad v = v_{\max} \cdot \sin(2\pi f \cdot t) \quad (3)$$

$$s = \int_0^t v_{\max} \cdot \sin(2\pi f \cdot t) dt \quad (4)$$

$$s = \left[ -v_{\max} \frac{\cos(2\pi f \cdot t)}{2\pi f} \right]_0^t \quad t_{0,5} = \frac{0,5}{f} \quad (5)$$

Von nun an wurde sich auf die Betrachtung einer halben Oszillationsperiode ( $t = t_{0,5}$ ) festgelegt. Damit ergaben sich die Integralgrenzen wodurch Gleichung 6 erhalten und über Gleichung 7 zu Gleichung 8 vereinfacht und nach  $v_{\max}$  umgestellt wurde.

$$s = v_{\max} \frac{\cos(2\pi f \cdot 0)}{2\pi f} - v_{\max} \frac{\cos(2\pi f \cdot \frac{0,5}{f})}{2\pi f} \quad (6)$$

$$s = v_{\max} \frac{1}{2\pi f} - v_{\max} \frac{-1}{2\pi f} \quad (7)$$

$$s = \frac{v_{\max}}{\pi f} \quad v_{\max} = s\pi f \quad (8)$$

Da die maximale Deformation des Gels als Prozessparameter auf 0,1 % festgelegt wurde, konnte der während einer halben Periode zurückgelegte Weg relativ zur Schichtdicke  $x$  angegeben werden. Während einer halben Periode wurde der Weg zweimal zurückgelegt (von maximaler Auslenkung zurück in die zentrale Position und von dort weiter zur maximalen Auslenkung der anderen Seite). Somit ergab sich die Beziehung in Gleichung 9.

$$s_{0,5} = 2 \cdot 0,1 \% x \quad (9)$$

Nun wurde Gleichung 8 in Gleichung 9 und diese wiederum in die Grundgleichung der Schergeschwindigkeit (Gleichung 10) eingesetzt.

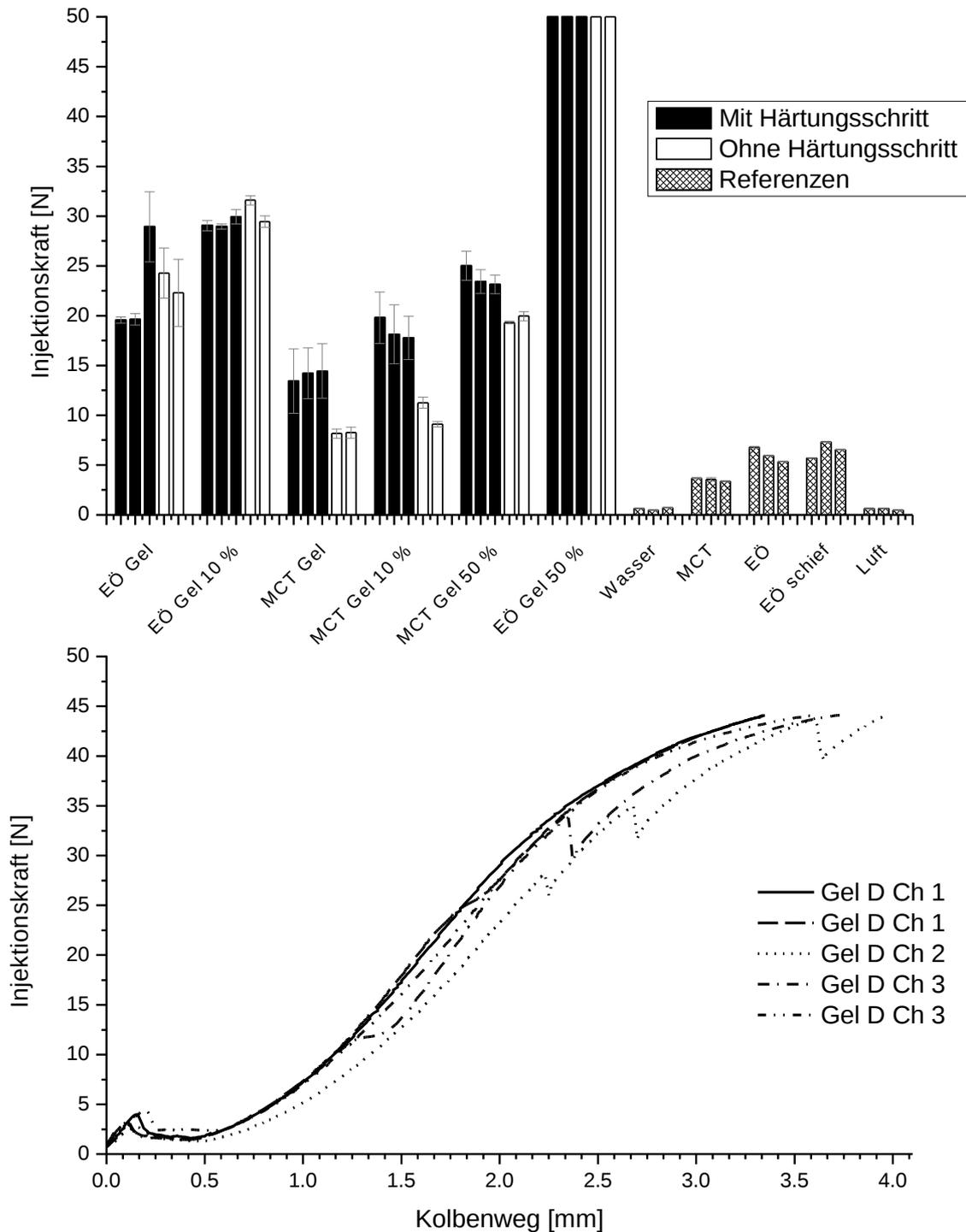
$$\dot{\gamma} = \frac{dv}{dx} = \frac{v_{\max}}{x} = \frac{2 \cdot 0,1 \% x \pi f}{x} \quad (10)$$

Dabei entfiel die Schichtdicke  $x$  als Parameter und es konnte zu Gleichung 11 vereinfacht werden. Somit konnte eine Schergeschwindigkeit von 0,631/s bestimmt werden, was eine sehr geringe Belastung für das System darstellt.

$$\dot{\gamma} = 2 \cdot 0,1 \% \pi f \approx 0,631/s \quad (11)$$

## 2.7. Messung der Injektionskraft

Wie in Abbildung 30 oben auf Seite 57 zu sehen ist, schwankten die für eine Injektion nötigen Kräfte zwischen den verschiedenen Systemen stark. Unter den gewählten Bedingungen war das Erdnussölgel mit 50 % innerer Phase (Gel D) als einziges nicht vollständig vom CT3-4500 TextureAnalyzer mit seiner maximalen Kraft von 4,5 kg entsprechenden Gewichtskraft ausspritzbar. Somit konnte mathematisch kein Wert für die Injektionskraft bestimmt werden. Aufgrund der Tatsache, dass die Kurvenverläufe, wie in Abbildung 30 unten zu sehen, beim Überschreiten der maximalen Belastbarkeit des



**Abbildung 30:** Oben: Injektionskräfte der verschiedenen Systeme. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert der mittleren 3,4 mm des Weges des Spritzenstempels. Dies entspricht ca. 200  $\mu$ l Injektionsvolumen. Der Fehlerbalken ist die Standardabweichung während dieser 3,4 mm. Unten: Der Kraftverlauf beim Ausspritzen von Gel D. Bei Charge 3 wurde bei allen Systemen auf den Härtungsschritt verzichtet.

Gerätes das Plateau bereits fast erreicht hatten, wurden die Injektionskräfte für dieses System auf ca. 50 N geschätzt. Damit wären diese Gele an der Grenze dessen, was noch ohne Probleme als injizierbar anzunehmen ist [98]. Die restlichen Gele waren bei der gewählten Geschwindigkeit und der verwendeten Kanülengröße injizierbar (25–50 N) oder sogar leicht injizierbar (10–25 N). Die Referenzen waren erwartungsgemäß sehr leicht injizierbar (0–10 N).

Insgesamt zeigen diese Ergebnisse ein deutlich anderes Verhalten als die rheologischen Untersuchungen. Die Erdnussölgele ließen sich deutlich schwieriger injizieren als die MCT-Gele. Eine Ursache dafür könnte sein, dass bei der Herstellung der Gele durch die Einarbeitung der inneren Phase und die dabei auftretende Scherung kleine Gelpartikel entstehen, die sich im Nachhinein während des Härtungsschrittes wieder durch schwächere Gelbrücken zu einem Gesamtgel verbinden ohne dabei vollständig zu verschwinden. Die Messung mittels oszillierender Rheologie innerhalb des linearviskoelastischen Bereiches ist ein nicht destruktives Verfahren. Es wurde die Plastizität und Elastizität des Gesamtsystems im Ausgangszustand und damit auch die schwächeren Brücken gemessen. Diese sind bei den MCT-Gelen aufgrund der effektiveren Härtung stärker als bei den Systemen auf Erdnussölbasis. Daraus resultierte die höhere Komplexviskosität. Das Pressen des Gels durch die Kanüle ist ein destruktiver Vorgang mit einer sehr hohen Schergeschwindigkeit, welche die Brücken zerstört. Das Ausmaß der Schergeschwindigkeit unter den gewählten Messbedingungen wurde mittels der Gleichungen 12–17 versucht abzuschätzen. In Gleichung 12 wurde zunächst ein linearer Geschwindigkeitsabfall vom Zentrum der Kanüle bis hin zum Rand angenommen. Damit ergibt sich eine kegelförmige Verteilung für den Volumenstrom ( $\frac{V}{t} \approx 12 \frac{\mu\text{l}}{\text{s}}$ ) mit der höchsten Fließgeschwindigkeit  $v_{\text{max}}$  als Höhe  $h$  des Kegels sowie einem Radius  $r$ , welche dem Innenradius der Kanüle (0,16 mm laut Hersteller [99]) entspricht. In Gleichung 13 wurde dies zusammengefasst.

$$\frac{V}{t} = \frac{\frac{1}{3}\pi r^2 h}{t} \qquad v_{\text{max}} = \frac{h}{t} \qquad (12)$$

$$\frac{V}{t} = \frac{1}{3}\pi r^2 v_{\text{max}} \qquad (13)$$

Nach der maximalen Fließgeschwindigkeit umgestellt (Gleichung 14), lässt sich diese in die Gleichung der Schergeschwindigkeit  $\dot{\gamma}$  (Gleichung 15) einsetzen.

$$v_{\text{max}} = \frac{V}{t} \frac{3}{\pi r^2} \qquad (14)$$

$$\dot{\gamma} = \frac{dv}{dx} = \frac{v_{\text{max}}}{r} \qquad (15)$$

Auf diese Weise wird die zur Berechnung nötige Gleichung 16 erhalten und schließlich in Gleichung 17 als Schergeschwindigkeit 2800 1/s ermittelt.

$$\dot{\gamma} = \frac{V \cdot 3}{t \pi r^2} = \frac{V \cdot 3}{t \pi r^3} \quad (16)$$

$$\dot{\gamma} = 12 \frac{\text{mm}^3}{\text{s}} \cdot \frac{3}{\pi \cdot (0,16 \text{ mm})^3} \approx 2800 \text{ 1/s} \quad (17)$$

Im Vergleich zu den 0,63 1/s, die während der oszillationsrheologischen Untersuchung auf das System wirkten, ist dies eine außerordentlich starke Belastung. Damit ist nachzuvollziehen, dass schwächere Gelbereiche, deutlich weniger Einfluss auf diese Messmethode besitzen als auf die Untersuchungen in Kapitel 2.6.

Nun lagen vornehmlich die kleineren Gelpartikel vor. Diese sind beim Erdnussöl stabiler, da 12-Hydroxystearinsäure damit ein stärkeres Gel ausbildet. Ähnlich ist die umgekehrte Reihenfolge beim Anteil an innerer Phase zu deuten. Bei der oszillierenden Rheologie hatten die Gele mit einem höheren Anteil eine niedrigere Komplexviskosität, da mehr Gesamtgel durch innere Phase ersetzt ist. Beim Injizieren mussten die einzelnen Tröpfchen durch die Kanüle gedrückt werden, wodurch sie sich gegenseitig behinderten und somit die notwendige Kraft anstieg.

Des Weiteren ließ sich auch in diesem Experiment die geringe bis fehlende Wirkung des Härtungsschrittes bei den Erdnussölgelen bestätigen. Während bei den MCT-Systemen ein deutlicher Unterschied zwischen gehärtet und nicht gehärtet zu sehen war, lag dieser bei den Erdnussölgelen im Bereich der Standardabweichung.

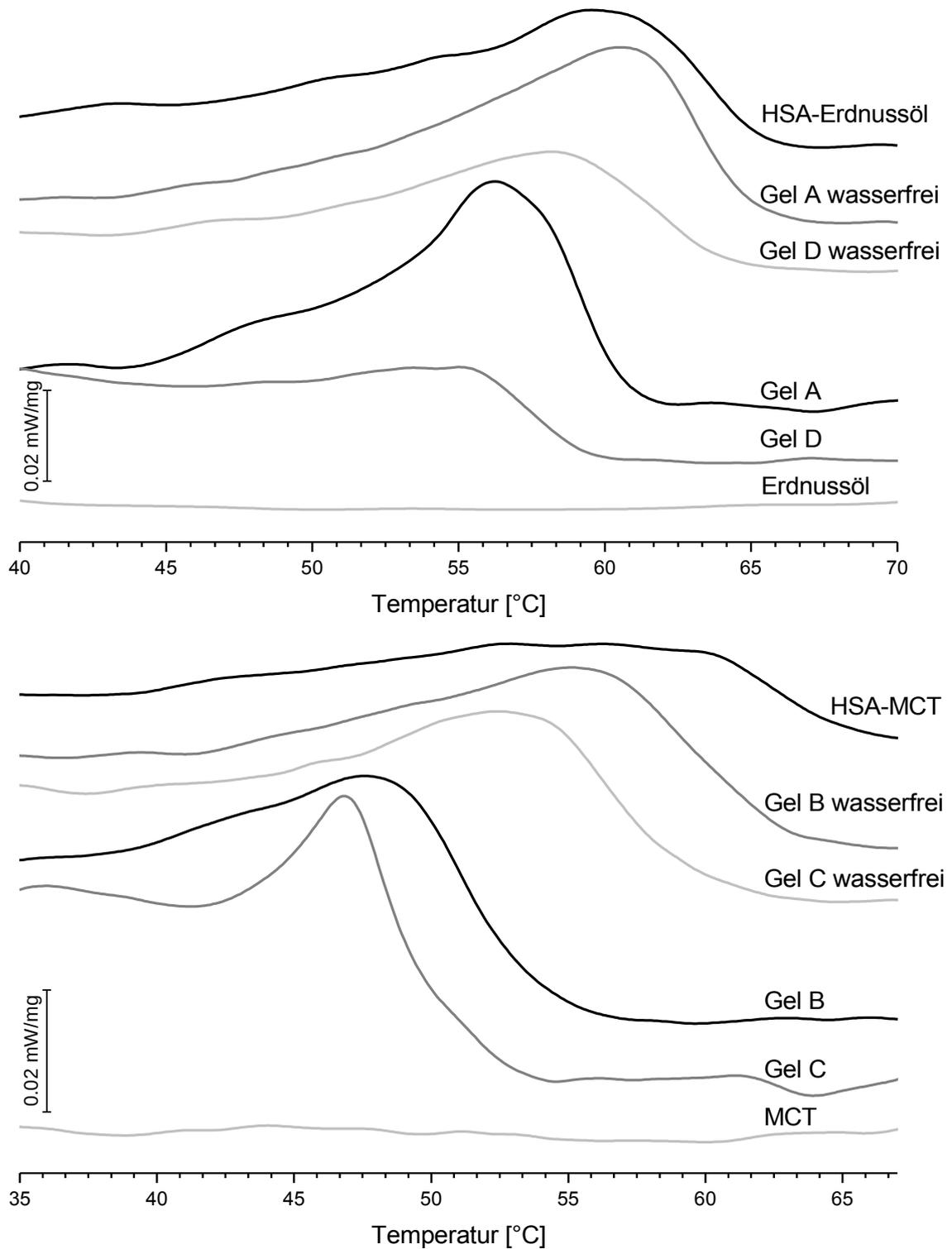
Anhand von reinem Erdnussöl wurde darüber hinaus die Anwendungssicherheit der Methode überprüft. Die Hauptfehlerquelle schien das ordnungsgemäße senkrechte Positionieren der Spritze zu sein. Deshalb wurden die Versuche mit Erdnussöl mit der maximal möglichen Schiefelage wiederholt. Das Ergebnis zeigte jedoch, dass der Einfluss der Schrägheit verschwindend gering war.

## 2.8. Bestimmen der Gelbildungstemperatur

### 2.8.1. Differenzialkalorimetrie

Mittels der Differenzialkalorimetrie wurde versucht die Gelbildungstemperatur, also die Temperatur unterhalb welcher sich ein Gel ausbildet, zu bestimmen. Dafür wurden die vier Systeme zusammen mit den zugehörigen wasserfreien, sowie wasser- und emulgatorfreien Varianten vermessen. Außerdem wurden die reinen Öle zum Vergleich untersucht.

Wie Abbildung 31 auf Seite 60 zeigt, konnte der Übergang für alle Gele – wenn auch



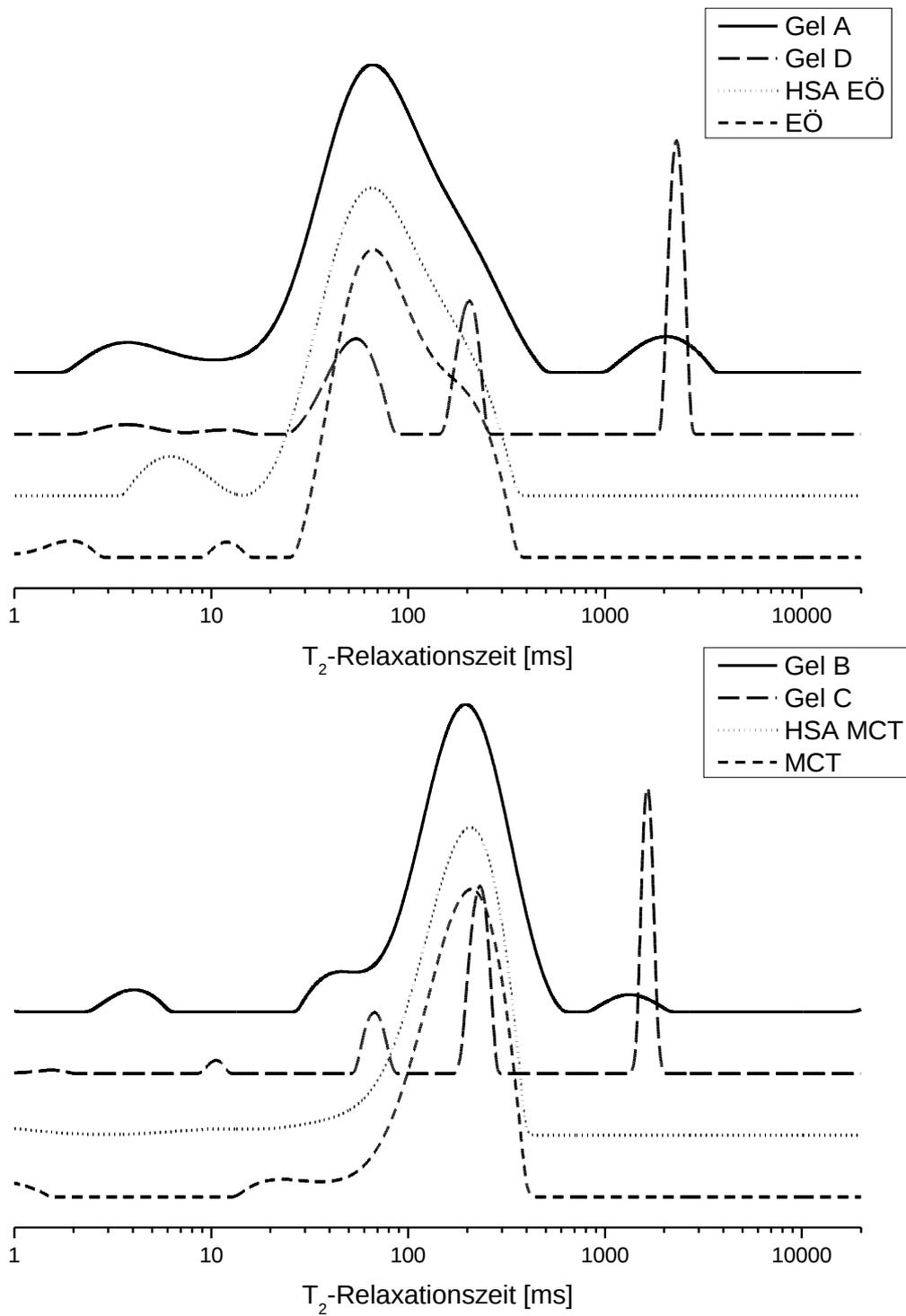
**Abbildung 31:** Darstellung der Heizleistung während der Differenzialkalorimetrie in Abhängigkeit von der Temperatur im Bereich der Gelbildungstemperatur.

nur als relativ schwaches und breites Signal – detektiert werden, während die Blindversuche mit den reinen Ölen keine Übergänge zeigten. Ein Schmelzen von 12-Hydroxystearinsäure kann ausgeschlossen werden, da dies je nach Reinheit bei ca. 75–81 °C, also deutlich höheren Temperaturen, geschieht [100]. Dabei wurde zunächst der Unterschied zwischen den beiden Ölen sichtbar. Wie erwartet zeigten die Erdnussölgele einen Übergang bei einer höheren Temperatur, als die MCT-Varianten. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen in Abbildung 5 auf Seite 21 wonach das MCT-Gel mit 3 % 12-Hydroxystearinsäure bei 50 °C bereits erste Übergangserscheinungen zum Sol zeigte, während das entsprechende Erdnussölgel noch vollständig stabil war. Darüber hinaus war zu sehen, dass bei dieser Temperatur die Gelbildungstemperatur für die Gele B und C bereits überschritten war, während die Gele A und D kaum beeinflusst waren. Dies bestätigt die entsprechenden Annahmen aus den Kapiteln 2.6 und 2.7 ab Seite 51 bzw. 56.

Darüber hinaus war ein Abfall der Gelbildungstemperatur mit zunehmendem Anteil an Cithrol<sup>TM</sup> DPHS ähnlich einer Gefrierpunktserniedrigung sowohl für die Erdnussöl- als auch die MCT-Gele zu erkennen. Einen noch deutlich größeren Einfluss hatte die innere Phase. Bereits 10 % Wasser erniedrigten die Übergangstemperatur um ca. 4 K bei den Erdnussöl- und sogar um ca. 8 K bei den MCT-Gele jeweils im Vergleich zum System gleicher Emulgatorkonzentration. Die Erhöhung der Wassermenge hatte jedoch keine zusätzliche Absenkung zur Folge. Der Unterschied zwischen den beiden wasserhaltigen Systemen war sogar in beiden Fällen geringfügig kleiner als bei den zugehörigen wasserfreien Gelen. Die Ursache hierfür war die zunehmende Fläche der Phasengrenze bei steigendem Wassergehalt. Dadurch wurde mehr Emulgator dort gebunden, wodurch weniger Tensid frei gelöst im Gel vorlag. Nur dieses kann jedoch Einfluss auf die Gelbildungstemperatur nehmen.

### 2.8.2. Kernspinresonanzrelaxometrie

Aufgrund der breiten Signale und der geringen Intensität bei der Differenzialkalorimetrie wurde versucht, die Gelbildungstemperatur zusätzlich mittels BT-NMR zu bestimmen. Dieser Methode liegt zugrunde, dass frei bewegliche Protonen wie z.B. in Wasser eine längere  $T_2$ -Relaxationszeit haben als unbewegliche wie z.B. in einem Festkörper oder einem festen Gel. Abbildung 32 auf Seite 62 zeigt die Verteilung der  $T_2$ -Relaxationszeiten bei 25 °C für die vier Gele sowie jeweils das entsprechende wasserfreie System und das reine Öl. Weder beim Erdnussöl noch beim MCT war jedoch ein Unterschied zwischen dem freien Öl und dem jeweiligen 12-Hydroxystearinsäuregel zusehen. Bei dem wasserhaltigen System mit 10 % innerer Phase war ausschließlich das Wassersignal bei ca. 2000 ms zusätzlich enthalten. Bei den Gelen mit 50 % innerer Phase spaltete sich außerdem das Signal des Öls in ein beeinflusstes und ein unbeeinflusstes



**Abbildung 32:** Verteilung der  $T_2$ -Relaxationszeiten der Protonen in erdnussöhlhaltigen (oben) und MCT-haltigen (unten) Systemen bei 25°C.

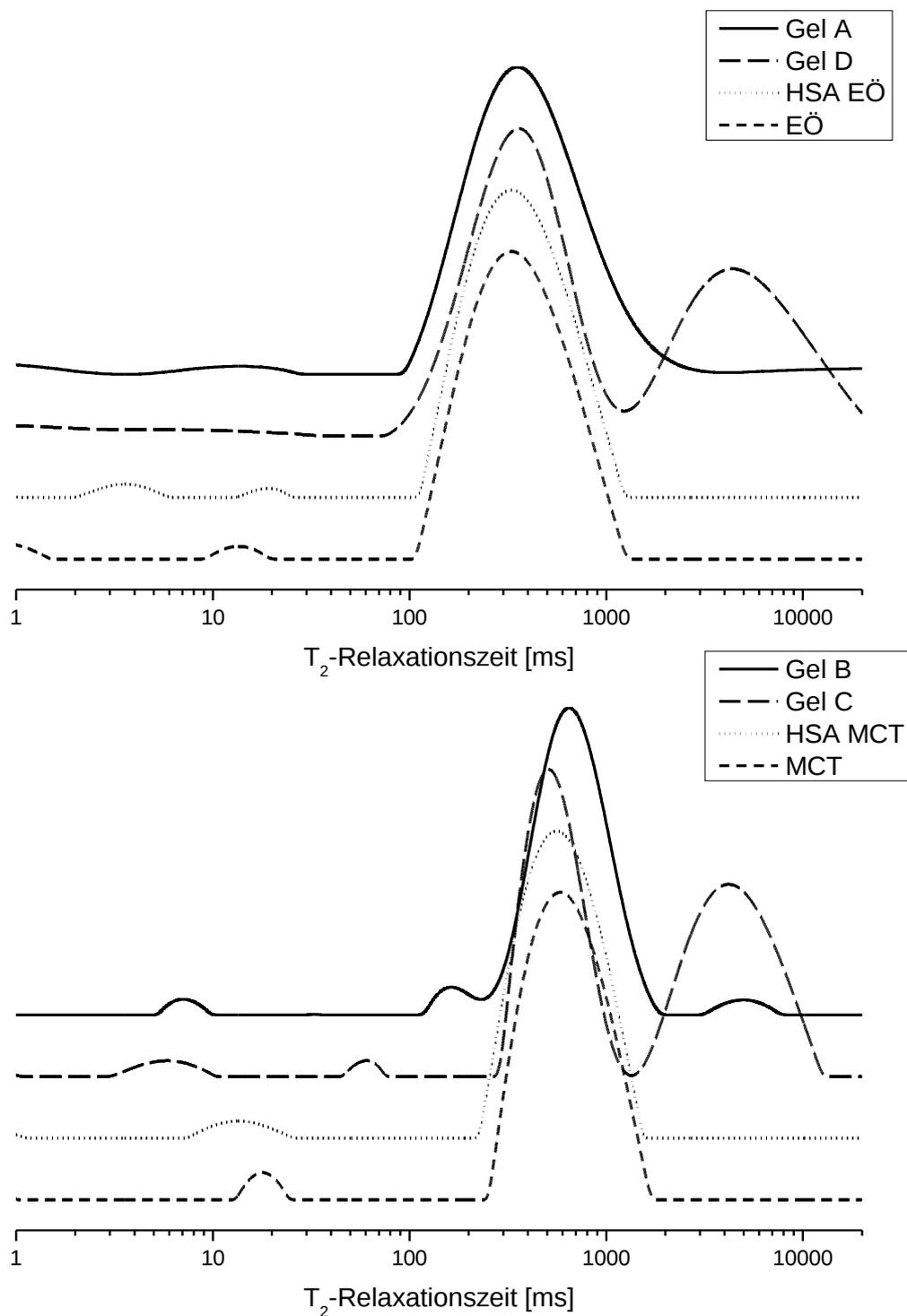
auf. Ursache hierfür war wahrscheinlich die große Grenzfläche bei einer so hohen Menge an innerer Phase.

Die nahezu identische Verteilung der  $T_2$ -Relaxationszeiten bei den Gelen und dem freien Öl ließ darauf schließen, dass es sich um ein Gel mit einer weitmaschigen Matrix und großen Bereichen an freiem unbeeinflusstem Öl handelt. Die Matrix erhöht hierbei zwar die Makroviskosität in erheblichem Maße, die Mikroviskosität bleibt jedoch unverändert. Dabei ist die Diffusion von Molekülen unterhalb einer bestimmten Größe vollständig ungehindert. Erst ab einem kritischen räumlichen Ausmaß wird durch die Matrix ein Einfluss vergleichbar mit einem Netz ausgeübt. Durch diesen Aufbau blieb die Gelstruktur für die Kernspinresonanzrelaxometrie unsichtbar, da die Anzahl der von der 12-Hydroxystearinsäure beeinflussten Protonen im Vergleich zum gesamten Öl verschwindend gering war. Zum Vergleich wurden die Systeme erneut oberhalb der Gelbildungstemperatur bei 75 °C gemessen, vergleiche Abbildung 33 auf Seite 64. Neben der allgemeinen Verschiebung aller Signale der Verteilung zu längeren Zeiten war jedoch keine Veränderung zu sehen. Nur die Aufspaltung des Ölsignals bei den Gelen mit 50 % innerer Phase konnte bei den hohen Temperaturen nicht mehr erfasst werden. Eine Bestimmung der Gelbildungstemperatur mittels dieser Methode war damit für diese Systeme in dieser Form unmöglich. Eine Lösung wäre die Trennung des Signals des Öls von dem der 12-Hydroxystearinsäure gewesen, da deren Beweglichkeit sich am Punkt der Gelierung schlagartig ändert. Jedoch wären dafür bei BT-NMR vollständig deuterierte Öle notwendig, welche nicht verfügbar waren.

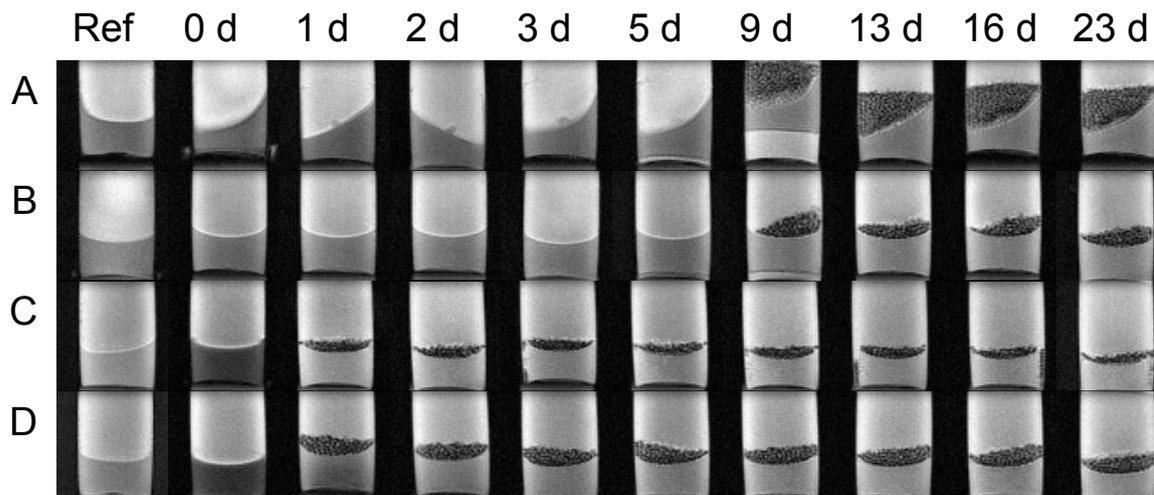
## 2.9. *In-vitro*-Freisetzungsuntersuchungen

### 2.9.1. Magnetresonanztomographie

Wie bei den Untersuchungen mittels Relaxometrie festgestellt, unterscheiden sich die  $T_2$ -Relaxationszeiten nicht von denen des ursprünglichen Öls. In einem, wie auf Seite 91 beschrieben, aufgenommenen,  $T_2$ -gewichteten Tomogramm sollten demzufolge die Bereiche des Öls dunkel sein, während das Wasser eine hohe Intensität zeigt. Auf dieser Basis sollte der Austausch zwischen dem schweren Wasser im Gellinneren und dem normalen Wasser außerhalb des Gels beobachtet werden. Wie in Abbildung 34 auf Seite 65 zu erkennen, war ein Kontrast zwischen den Phasen deutlich sichtbar. Jedoch konnte mit den gewählten Messparametern nicht das gesamte Signal des Öls unterdrückt werden. Demzufolge war der Kontrast bei den Gelen C und D aufgrund des höheren Gehaltes an  $^1\text{H}$ -NMR inaktivem schweren Wasser ausgeprägter. Bei den Systemen A und B ist der Unterschied zwischen frischer Probe mit schwerem Wasser und der Referenz so gering, dass hier keine Aussagen getroffen werden können. Dagegen



**Abbildung 33:** Verteilung der  $T_2$ -Relaxationszeiten der Protonen in erdnussöhlhaltigen (oben) und MCT-haltigen (unten) Systemen bei 75°C.



**Abbildung 34:**  $T_2$ -gewichtete Magnetresonanztomogramme der mit schwerem Wasser hergestellten und mit normalem Wasser (hell) überschichteten Gele (dunkel) und die zugehörigen Referenzen (mit normalem Wasser hergestellt). Aufschwimmende Gele wurden mit Glasperlen beschwert (dunkle Punkte).

ist der Kontrast bei C und D groß genug. Jedoch ist bereits nach einem Tag bei Gel C und spätestens nach zwei Tagen bei Gel D ebenfalls kein Unterschied mehr zur mit normalem Wasser hergestellten Referenz zu erkennen. Es scheint somit einen relativ schnellen Austausch zwischen dem Wasser innerhalb und außerhalb des Gels zu geben. Dieser scheint bei den MCT-Gele etwas schneller abzulaufen. Da dieses etwas weniger hydrophob ist als Erdnussöl, ist dieses Verhalten nachvollziehbar. Eine Aussage, ob auch ein gelöster Arzneistoff bzw. ein gelöstes Protein diesen Austausch in gleicher Geschwindigkeit zeigt, kann jedoch an dieser Stelle nicht getroffen werden.

### 2.9.2. Entwicklung eines *In-vitro*-Freisetzungsmodells

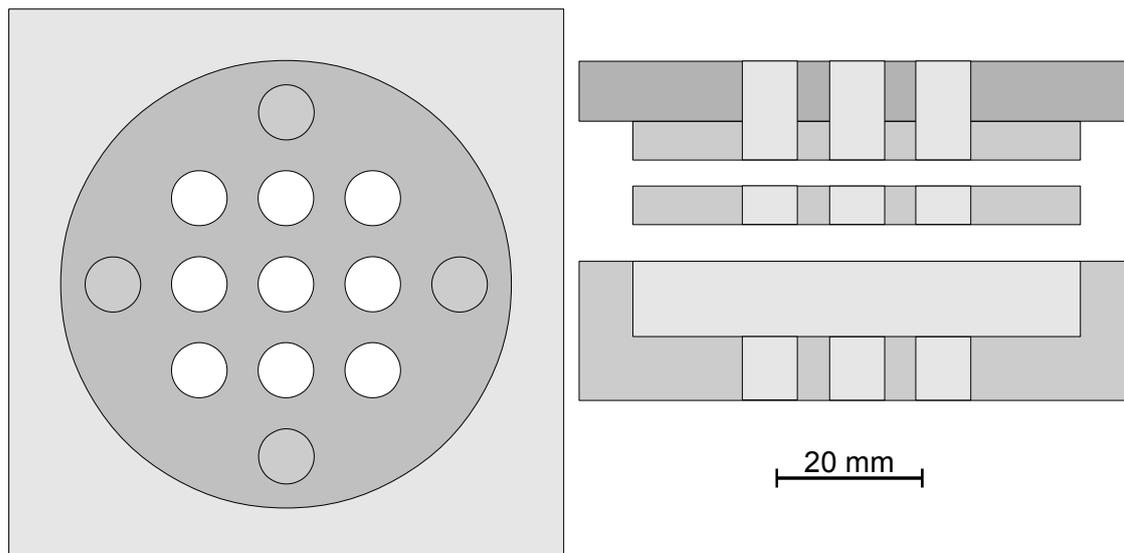
Die Simulation der Umgebung, der ein subkutanes Implantat *in vivo* ausgesetzt ist, stellt ein nicht unerhebliches Problem beim Versuch einer *In-vitro*-Freisetzung dar. Die gebräuchlichste Methode ist dabei die Durchführung unmittelbar in Puffer, sowie das Quantifizieren der in den Puffer freigesetzten Menge [101]. Es gibt jedoch zahlreiche Implantate, die sich unter diesen Bedingungen grundverschieden im Vergleich zu *In-vivo*-Versuchen verhalten. Hydrogelbildende Implantate reagieren mit Auflösung und öl-basierte mit Aufschwimmen. Neben der Vermeidung dieser Probleme ist es außerdem günstig *In-vivo*- und *In-vitro*-Untersuchungen mit der gleichen Methode durchführen zu können. Im Rahmen dieser Arbeit war der Einsatz der multispektralen Fluoreszenzbildgebung mittels des „Maestro<sup>TM</sup> in vivo imaging systems“ für die Tierversuche geplant. Dem entsprechend wurde versucht, diese Technik auch für die *In-vitro*-Untersuchungen zu verwenden.



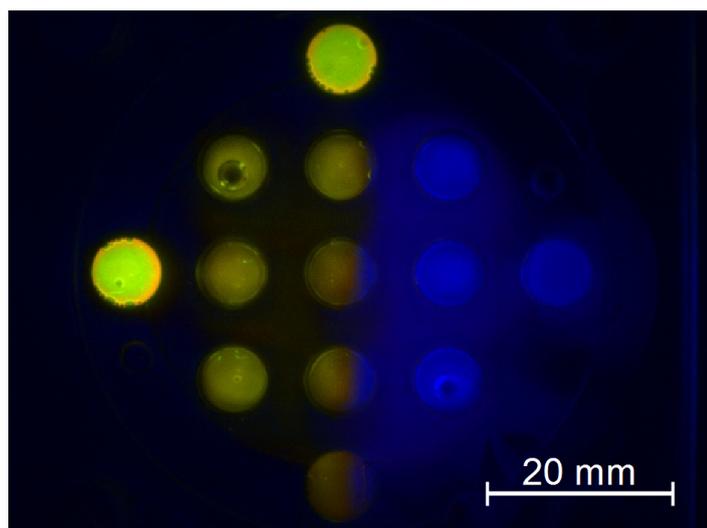
**Abbildung 35:** *Erster Entwurf eines neuen Freisetzungmodells (nicht umgesetzt). Ein Dialyseschlauch sollte durch ein äußeres Gerüst gehalten und das Ende mittels eines Schraubverschlusses verschließbar sein.*

Der erste Entwurf eines neuen Freisetzungmodells lehnte sich an die Dialysesackmethode an. Zwar berichtete Washington 1989, dass diese Methode nie Sinkbedingungen schaffen könne [102], jedoch ist dies für die Simulation der subkutanen Umgebung auch gar nicht nötig. Um diese Methode mit dem „Maestro<sup>TM</sup> in vivo imaging system“ messbar zu machen, wurde eine Art Exoskelett entworfen, welches einen Dialyseschlauch halten und eine optische Messung zwischen den stabilisierenden Stäben ermöglichen sollte (vergleiche Abbildung 35 auf Seite 66). Dieses Konzept wurde jedoch aus zwei Gründen nie umgesetzt. Zum einen hätte es für eine Vergleichbarkeit mit den *In-vivo*-Messungen für eine Probengröße von 200  $\mu\text{l}$  gebaut werden müssen, zum anderen wäre es nur eine Lösung für hydrogelbildende Implantate gewesen. Die ölbasierten Gele im Rahmen dieser Arbeit würden nur unzureichend mit den hydrophilen Membranen interagieren. Aus diesen beiden Gründen wurde dieser Ansatz verworfen.

Ein neuer Entwurf wechselte von dem labilen Exoskelett zu einem massiveren Acrylblock. Dieser bestand aus einer Boden-, einer Mittel- und einer Deckplatte. Dazwischen befand sich jeweils die Membran. Die Proben wurden in die Aushöhlungen der Mittelplatte gefüllt und das Modell anschließend über vier Nylonschrauben verschlossen. Dies sollte gegenüber dem ersten Entwurf mehrere Vorteile bringen. Durch die verschiedenen Aussparungen mit einem Volumen von 200  $\mu\text{l}$  in der mittleren Platte (vergleiche Abbildung 36 auf Seite 67) wurden diese relativ kleinen Volumina von stabilem Acryl eingeschlossen. Dadurch wurde für das Gesamtobjekt eine handliche Größe erreicht. Des Weiteren kann die Dialysemembran für die Verwendung mit Gelen auf öligter Basis auch durch ein PET-Netz ersetzt werden, welches ein Aufschwimmen verhindert, jedoch kaum ein Diffusionshindernis darstellt. Eine Referenz ohne jegliche Freisetzung sollte durch die Aushöhlungen an den Enden ohne darüber und darunter liegende Öffnungen realisiert werden. Aber auch bei diesem Prototyp traten Probleme auf. Die zunächst als Vorteil gedachte große Anzahl von Aushöhlungen, um zahlreiche Proben parallel untersuchen zu können, erwies sich als ungünstig. Es war fast unmöglich verschiedene Implantate sauber getrennt voneinander einzufüllen. Außerdem reichte durch die große

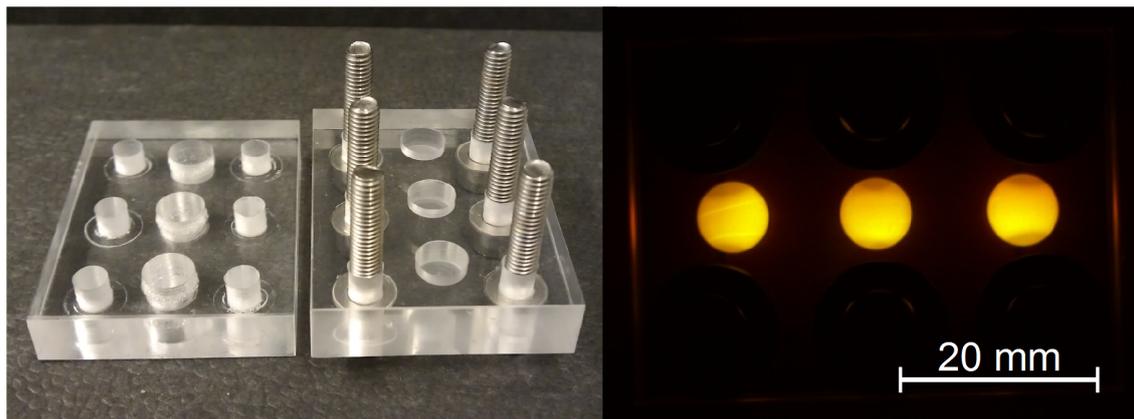


**Abbildung 36:** Zweiter Entwurf eines Freisetzungmodells. Dieser wurde als Prototyp umgesetzt, jedoch aufgrund ausgeprägter Diffusion entlang der eingesetzten Membran und der schwierigen Bedienbarkeit bei unterschiedlichen Proben nicht verwendet.



**Abbildung 37:** Testfreisetzung von ALEXA Fluor® 647-BSA (gelb) und Methylenblau (blau) aus einem Hyaluronanhydrogel. Es zeigt sich eine starke Ausbreitung der Fluoreszenz zwischen den Probenkammern.

Fläche der Druck, mit dem das Modell verschlossen wurde, nicht aus, um die Öffnungen der Mittelplatte sauber zu verschließen, wie in Abbildung 37 zu sehen. Dabei handelte es sich um Testfreisetzen von ALEXA Fluor® 647-BSA (gelb) und Methylenblau (blau) aus einem Hyaluronanhydrogel. Nach 4 h war deutlich eine Diffusion der Fluoreszenzfarbstoffe parallel zur Dialysemembran zu erkennen. Methylenblau drang sogar bis in die Probenkammern ein, in die ursprünglich die ALEXA Fluor® 647-BSA-haltigen Gele gefüllt wurden. Auch die Referenzkammer war nicht ausreichend abgedichtet.

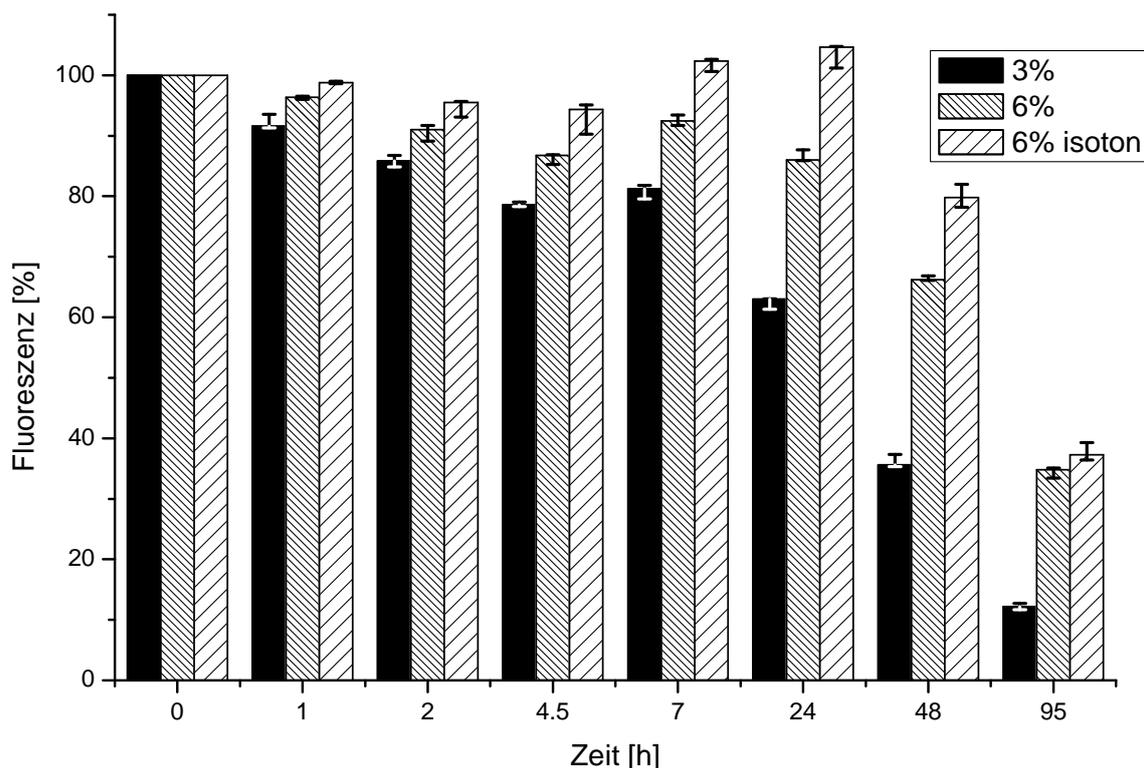


**Abbildung 38:** Links: Der finale Prototyp des Freisetzungsmodells. Die Probleme des vorigen Entwurfs wurden über eine geringere Probenzahl und Fläche sowie größere Kraft durch eine größere Anzahl von stabileren Schrauben gelöst. Rechts: Testfreisetzung von ALEXA Fluor<sup>®</sup> 647-BSA wie in Abbildung 37. Es ist kaum noch Diffusion parallel zur Membran zu sehen. Zusätzlich ist das Bild durch die flache Unterseite des Modells als Betrachtungsoberfläche deutlich schärfer.

Daraufhin wurde die Geometrie modifiziert. Boden- und Deckplatte wurden deutlich verstärkt. Außerdem wurde die Anzahl der Schrauben erhöht. Dennoch war nach einer Wiederholung des Experiments keine Besserung festzustellen.

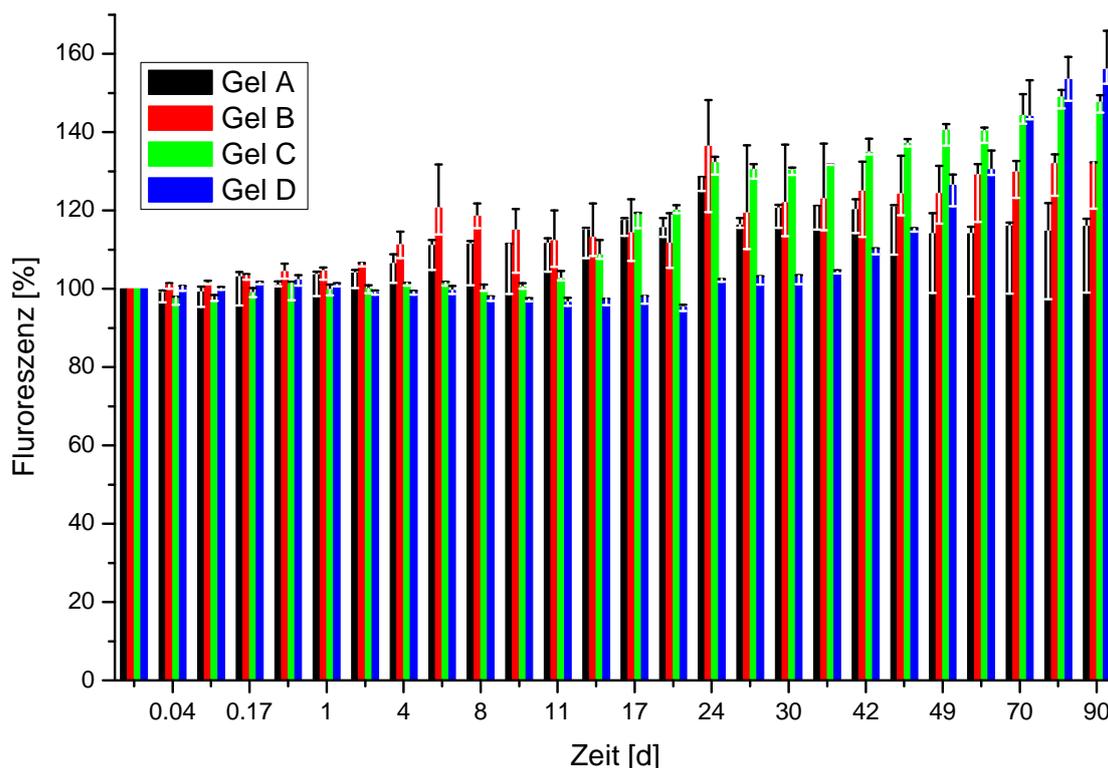
Als Konsequenz daraus wurden tiefgreifende Änderungen an der Konstruktion vorgenommen. Die Fläche und die Anzahl der Probenkammern wurde stark verkleinert und die Presskraft durch einen Austausch der Nylonschrauben gegen sechs Stahlschrauben stark erhöht. Das nun fertige Modell ist in Abbildung 38 zu sehen. Es besitzt nur noch drei einseitig geöffnete Vertiefungen weiterhin mit einem Fassungsvermögen von 200  $\mu\text{l}$ . Je nach Charakteristik des zu untersuchenden Objekts kann über diese eine hydrophile Dialysemembran mit beliebigem Molekulargewichtsausschluss oder ein PET-Netz gelegt werden. Abbildung 38 (rechts) zeigt eine Testfreisetzung von ALEXA Fluor<sup>®</sup> 647-BSA nach 10 h ähnlich zu Abbildung 37. Das Ausmaß der Diffusion parallel zur Dialysemembran ist deutlich reduziert. Gleichzeitig bietet das Modell durch seine glatte Unterseite eine geeignetere Oberfläche für die Messung, was an der deutlich höheren Schärfe der Aufnahme zu sehen ist. Die Anzahl der Vertiefungen ermöglicht dabei immer noch eine Dreifachbestimmung mit nur einem Messvorgang. Da die Vertiefungen nur einseitig geöffnet sind, eröffnet sich zusätzlich ein weiteres Anwendungsgebiet: Die Freisetzung aus flüssigen Trägern, wie Konjugaten von wasserlöslichen Polymeren oder Nanopartikeln [103]. Dabei ist dieses Modell umso geeigneter, je langsamer die Freisetzung aus den Partikeln oder die Spaltung der Konjugate erfolgt und je weniger damit die Diffusion durch die Membran als geschwindigkeitsbestimmender Schritt ins Gewicht fällt.

Das fertige Modell sollte nun einem realitätsnahen Test unterzogen werden. Dazu



**Abbildung 39:** Testfreisetzung von ALEXA Fluor<sup>®</sup> 680-BSA aus dem finalen Freisetzungsmodell. Dargestellt ist jeweils der Median der relativen Fluoreszenzintensitäten bezogen auf den jeweiligen Startwert aus den drei Kammern. Die Fehlerbalken stellen die Maxima und Minima dar.

wurden mit ALEXA Fluor<sup>®</sup> 680-BSA beladene Hyaluronangele verwendet. Dabei wurden drei verschiedene Gele verglichen. Zum einen wurden 3% und 6% Hyaluronan verwendet. Das dritte Gel hatte ebenfalls eine Konzentration von 6% und war zusätzlich mit Glycerol isotoniert. Die Freisetzung erfolgte wie auf Seite 95 beschrieben. Die Grafik in Abbildung 39 zeigt die Fluoreszenzintensität zu den gewählten Zeitpunkten bezogen auf den Anfangswert. Die Freisetzung dieses bei der herkömmlichen Methode problematischen Systems konnte mittels des neuen Freisetzungsmodells bestimmt werden. Dabei wurden sowohl Unterschiede zwischen verschiedenen Konzentrationen an Hydrogelbildner als auch zwischen isotonierten und nicht isotonierten Gelen festgestellt. Der Abfall der Fluoreszenzintensität war aus dem Gel mit 3% Hyaluronan deutlich schneller als bei 6%. Des Weiteren wurde bei einer Isotonisierung eine Verzögerung bis zum Beginn der Freisetzung festgestellt. Die Variabilität zwischen den einzelnen Kammern war dabei äußerst gering. Damit erfüllte dieses Modell die zu Beginn der Entwicklung gestellten Anforderungen.

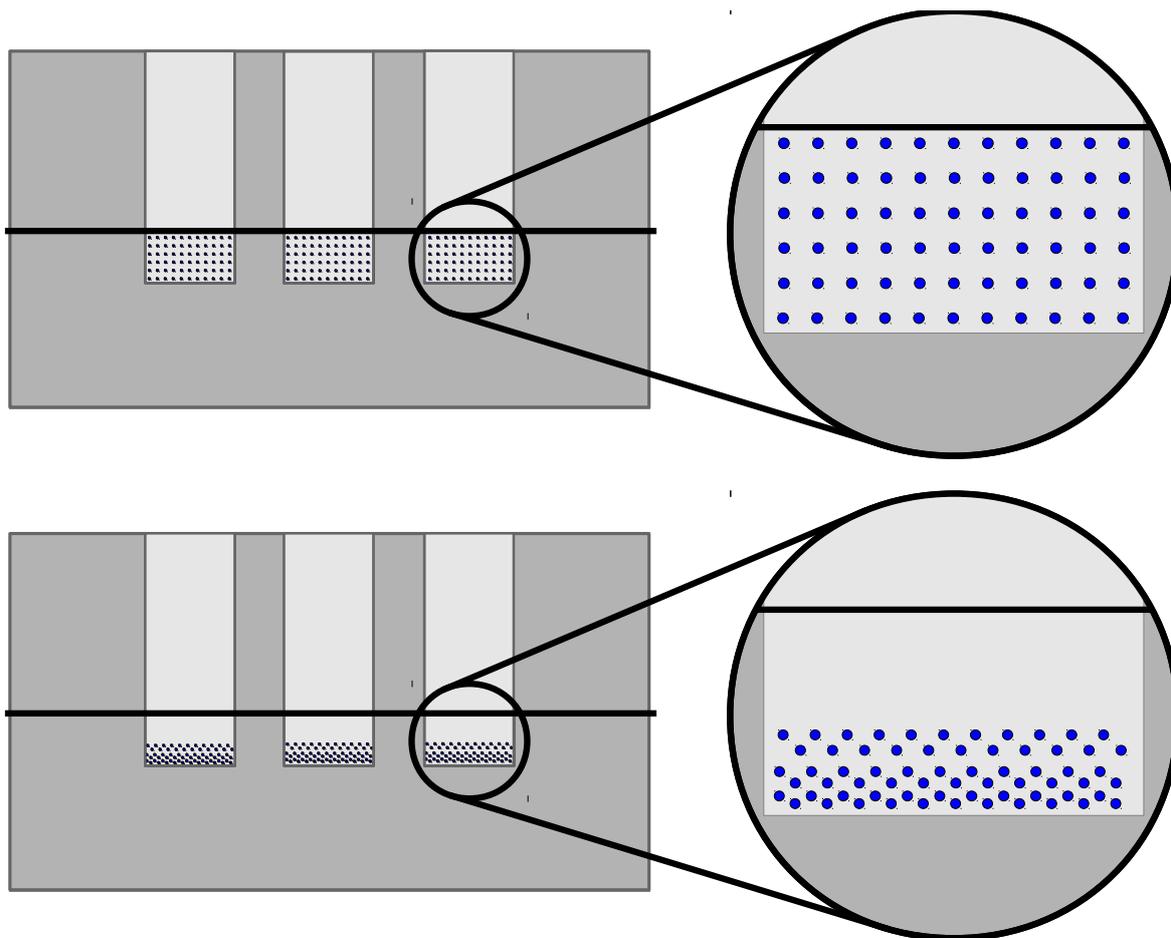


**Abbildung 40:** Freisetzung von ALEXA Fluor<sup>®</sup> 680-BSA aus den Gelen A–D. Dargestellt ist jeweils der Median der relativen Fluoreszenzintensitäten bezogen auf den jeweiligen Startwert aus den drei Kammern. Die Fehlerbalken stellen die Maxima und Minima dar.

### 2.9.3. *In-vitro*-Freisetzungsuntersuchung mittels des entwickelten Modells

Abbildung 40 zeigt die relativen Intensitäten der Fluoreszenzen bezogen auf den jeweiligen Startwert in Abhängigkeit von der Freisetzungsdauer. Dargestellt ist der Median der drei Kammern des Freisetzungsmodells aus Kapitel 2.9.2. Die Fehlerbalken stellen die Kammern mit der jeweils höchsten und niedrigsten gemessenen Intensität dar. In den ersten zwei Tagen war zunächst keine Veränderung zu beobachten. Dann begannen bei den Gelen A und B die Intensitäten anzusteigen. Ab Tag 11 zeigte Gel C das gleiche Verhalten. Bei Gel D dauerte es einen Monat bis die Intensitäten anzusteigen begannen. Nach einigen Tagen bis Wochen war die Fluoreszenz auf ein Maximum angestiegen und blieb dort dann wieder konstant.

Bei der Betrachtung dieser Daten muss zunächst die Frage gestellt werden, wie es zu einem Anstieg der Intensitäten kommen konnte. Zwar war es auch schon bei anderen Experimenten, welche die multispektrale Fluoreszenzbildgebung zum Quantifizieren nutzten, vorgekommen, dass Intensitäten zu Beginn der Untersuchung aufgrund von



**Abbildung 41:** Schematische Darstellung der Sedimentation der Wassertröpfchen im Gel während der In-vitro-Freisetzungsuntersuchungen.

Anpassungsvorgängen an die neue Umgebung (z.B. Temperatur, Verformung) ansteigen. Jedoch geschah dies für gewöhnlich in den ersten Minuten [104] oder maximal Stunden [105]. Eine Zunahme an Intensität nach Tagen konnte demnach nicht darauf zurückzuführen sein.

Eine mögliche Erklärung wurde bereits in Kapitel 2.3.2 beschrieben. Bei einer Lager-temperatur von 37 °C kam es zu einer langsamen Sedimentation der Wassertröpfchen (vergleiche Abbildung 41). Die farbstoffhaltigen Tröpfchen sammelten sich somit verstärkt an der geschlossenen Bodenplatte. Genau durch diese wurde jedoch die Messung durchgeführt. Aus Sicht des Maestro<sup>TM</sup> hatte sich somit die Menge an Farbstoff erhöht. Real war dieser jedoch nur näher an die Oberfläche gelangt. Je nach Wassergehalt und Öl war die Sedimentation unterschiedlich ausgeprägt. In Übereinstimmung mit Kapitel 2.3.2 trat diese bei den Gelen A und B zuerst auf, gefolgt von Gel C und schließlich Gel D.

Da die Sedimentation nur während begrenzter Abschnitte des Experiments auftrat, ließ sich trotz der Überlagerung feststellen, dass keines der Systeme *in vitro* eine Freiset-

zung von Rinderserumalbumin zeigte. Da gezielt auf den Zusatz von Lipasen verzichtet und somit eine Erosion des Implantates verhindert wurde, wurde hiermit ausschließlich die Freisetzung durch Diffusion charakterisiert. Aufgrund dieser Ergebnisse konnte eine solche für Proteine durch die ölige Phase nach außen ausgeschlossen werden. Demzufolge beschränkt sich der in Kapitel 2.9.1 festgestellte Austausch auf das Wasser selbst, während gelöstes Protein unberührt bleibt. Für eine Freisetzung *in vivo* ist somit eine Erosion als Mechanismus anzunehmen. Dieser liegt vermutlich eine Degradation der Triglyceride von Erdnussöl bzw. MCT zu Grunde, welche mit großer Wahrscheinlichkeit durch Lipasen oder Esterasen vornehmlich an der Grenzschicht zum umliegenden Gewebe stattfindet. Dabei entstehen im ersten Schritt weniger lipophile Diglyceride. Es kann ein weiterer Abbau zu Monoglyceriden und Fettsäuren erfolgen. Wie bereits in Kapitel 2.1.1 gezeigt wurde, wird die Gelstabilität stark von der Lipophilie der Flüssigkeit beeinflusst und nimmt mit sinkender Lipophilie ab. Somit ist anzunehmen, dass durch die Degradation des Öls an der Grenzfläche die äußeren Schichten nach und nach geschwächt werden und schließlich erodieren. Die Zusammensetzung im Inneren ändert sich währenddessen vermutlich nur wenig. Wassertröpfchen, die so an die Oberfläche gelangen, werden somit durch Erosion freigesetzt. Eine Diffusion im Inneren des intakten Gels findet nicht statt. Als zusätzlicher Mechanismus kommt ein Brechen der Emulsion nach fortgeschrittener Degradation der Glyceride im Gelinneren in Betracht, da die sich bildenden Fettsäuren, Mono- und Diglyceride mit dem Emulgator um die Grenzfläche konkurrieren und so die Stabilität negativ beeinflussen.

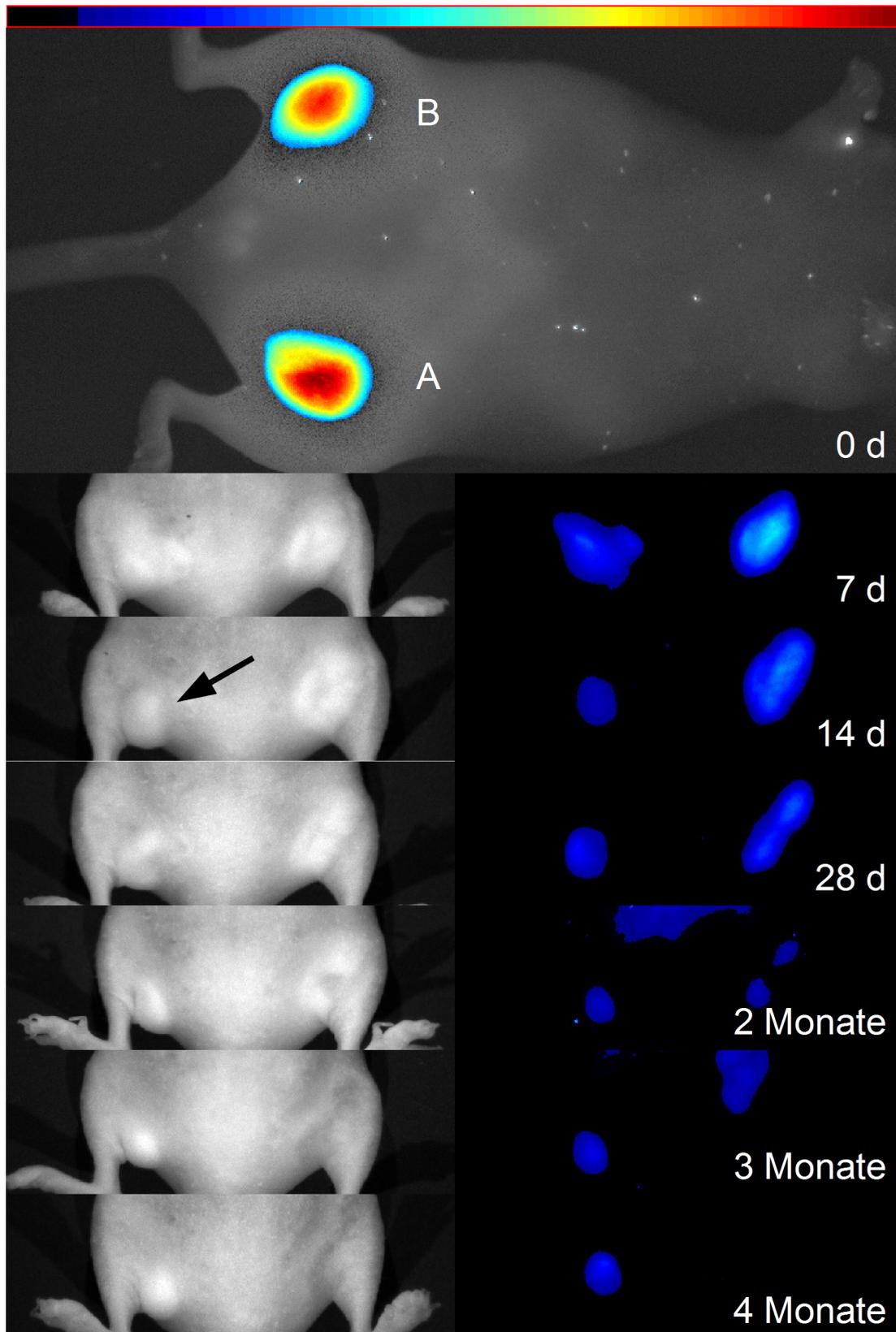
Damit stellen diese Systeme den angestrebten Idealfall dar, sofern *in vivo* eine Freisetzung nachgewiesen werden kann. Die Erosion des Geles ist von den physikochemischen Eigenschaften des Proteins unabhängig, während eine Freisetzung über Diffusion vom Verteilungsverhalten sowie dem Diffusionskoeffizienten und dem Diffusionsweg aber auch von Adsorption an Strukturen im Gelinneren abhängig wäre. Somit sind keine signifikanten Unterschiede zwischen den Kinetiken verschiedener Proteine zu erwarten.

Auf eine Simulation der Erosion *in vitro* wurde verzichtet. Entsprechende Zusätze im FreisetzungsmEDIUM wie Emulgatoren oder Lipasen beeinflussen allein durch Art und Menge das Ergebnis zu sehr. Auch ein Bezug zur physiologischen Lipaseaktivität ist nicht erfolgversprechend, da Schwab et al. bereits zeigten, dass *in vitro* ein Vielfaches der physiologischen Aktivität notwendig ist, um eine vergleichbare Kinetik zu erhalten [106].

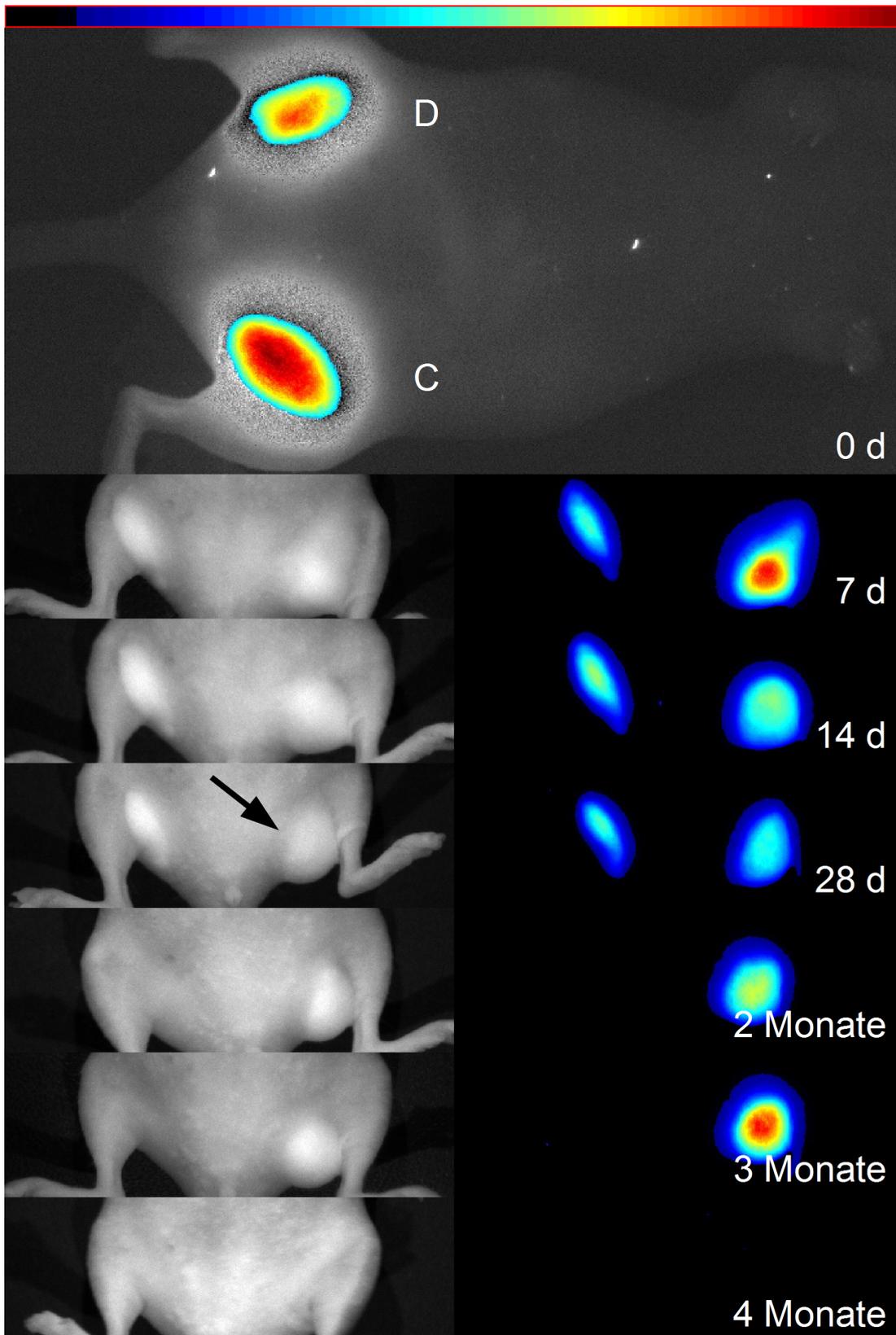
## 2.10. *In-vivo*-Freisetzungsuntersuchung

Die Abbildungen 42 und 43 auf den Seiten 74 und 75 zeigen ein Tier aus „Käfig 1“ bzw. „Käfig 2“. Neben der Veranschaulichung des Messprinzips wurden diese Tiere aus einem bestimmten Grund ausgewählt. Sie zeigten, dass bei den Gelen B (Abbildung 42 rechts) und C (Abbildung 43 links), also den beiden Systemen auf MCT-Basis, eine gewisse Neigung (jeweils dieses eine Tier) zur Bildung von Ödemen (Pfeile) bestand. Bei den auf Erdnussöl basierenden Gelen trat dies nicht auf. Jedoch war die Anzahl der Tiere zu gering um diesen Unterschied statistisch abzusichern. Es blieb somit beim Verdacht. Das Auftreten konnte jedoch begründet werden. Da die Ödeme erst nach einigen Wochen auftraten, ist ausgeschlossen, dass es eine direkte Reaktion auf das Implantat war. Die Bestandteile, mit denen der Körper zum Zeitpunkt der Applikation in Kontakt kam, konnten somit nicht dafür verantwortlich sein. Wahrscheinlicher war dagegen aufgrund der Verzögerung den Auslöser bei möglichen Abbauprodukten zu finden. An dieser Stelle fielen die Unterschiede zwischen den beiden Ölen auf. Während Erdnussöl fast vollständig aus Fettsäuren mit 16 Kohlenstoffatomen und darüber – wovon viele ungesättigt sind – besteht [107], enthält MCT mindestens zu 95 % Capryl- und Caprinsäure [108]. Letztere ist als Reinsubstanz reizend, erstere sogar ätzend. Die im Erdnussöl enthaltenen höheren Fettsäuren sind dagegen auch als Reinsubstanz ungefährlich [100]. Bei intravenöser Gabe werden die Abbauprodukte schnell verdünnt, so dass keine Reizung von Gewebe auftritt. Bei subkutaner Gabe und insbesondere durch die Retardierung in Folge der Gelierung wurden konstant Abbauprodukte an der Oberfläche des Implantats gebildet und langsam abtransportiert. Durch diesen Dauereinfluss kam es schließlich zur Reizung und damit zur Ödembildung.

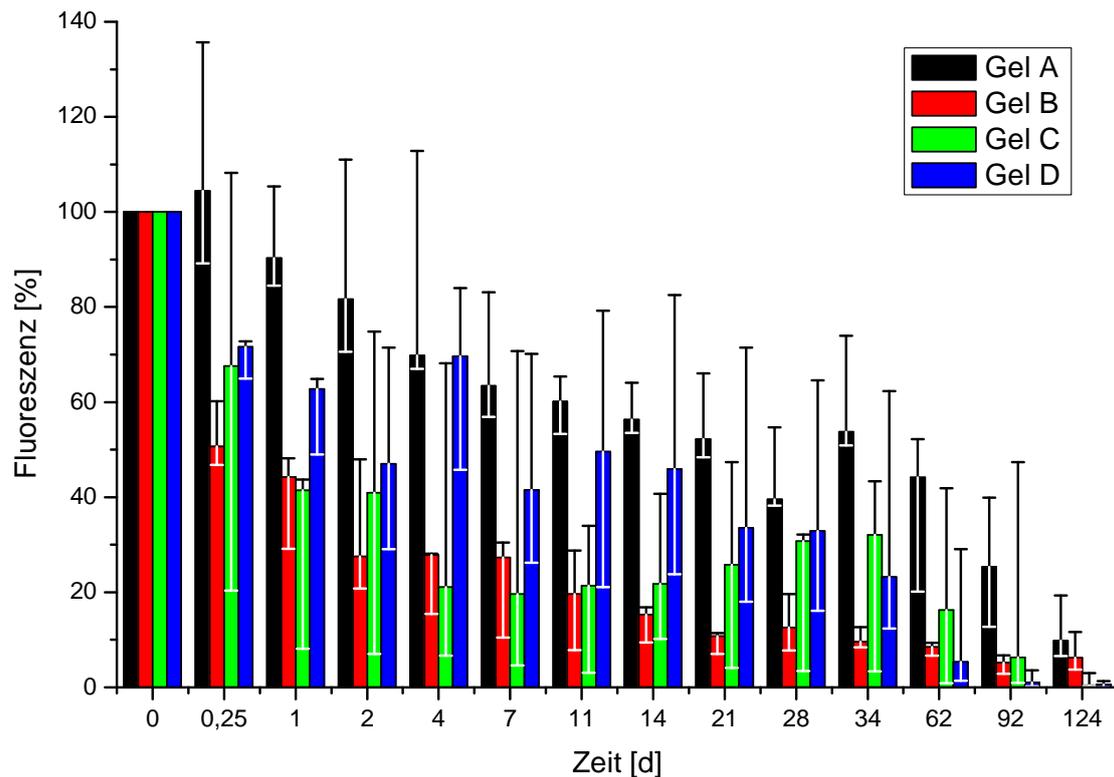
Neben der reinen Beobachtung der Tiere wurden die Fluoreszenzsignale, wie in Kapitel 4.2.10.3 auf Seite 95 beschrieben, ausgewertet. Abbildung 44 auf Seite 76 zeigt die auf die Belichtungszeit normierten Fluoreszenzintensitäten relativ zum Startwert des jeweiligen Tieres. Dargestellt ist jeweils der Median aus drei Tieren. Die Fehlerbalken stellen die Maxima und Minima dar. Die Implantate wurden über 4 Monate beobachtet. Es zeigte sich, dass die Systeme auf Basis von Erdnussöl eine langsamere und gleichmäßigere Freisetzungskinetik aufwiesen. Die beiden MCT-Gele begannen dagegen mit einem Abfall auf ca. 40 % innerhalb von einem Tag. Nach vier Tagen stagnierte die Freisetzung jedoch. Im Bereich von 21 Tagen war bei den MCT-Implantaten ein Anstieg der Fluoreszenz zu beobachten. Dieser war durch die Ödembildung begründet. Vermutlich durch den Eintritt von Gewebsflüssigkeit schwellen die Implantate an. Gleichzeitig war der Abtransport von freigesetztem Protein behindert. Dadurch verteilte sich der Fluoreszenzfarbstoff auf eine größere Fläche (bezogen auf die Messung) und war durch die zusätzliche Flüssigkeit besser solvatisiert. Daraus folgt eine günstigere



**Abbildung 42:** „Maus 1“ aus „Käfig 1“: Monochromaufnahmen unter Weißlicht (links) und Fluoreszenzintensitäten (rechts) im zeitlichen Verlauf. Die Bauchseite der Maus ist zu sehen. Gel A ist am linken Bein, Gel B am rechten Bein zu sehen. Das oberste Bild (Tag 0) ist eine Überlagerung von Autofluoreszenz (weiß) und des Signals von ALEXA Fluor® 680 als intensitätsbezogene Farbskala.



**Abbildung 43:** „Maus 3“ aus „Käfig 2“: Monochromaufnahmen unter Weißlicht (links) und Fluoreszenzintensitäten (rechts) im zeitlichen Verlauf. Die Bauchseite der Maus ist zu sehen. Gel C ist am linken Bein, Gel D am rechten Bein zu sehen. Das oberste Bild (Tag 0) ist eine Überlagerung von Autofluoreszenz (weiß) und des Signals von ALEXA Fluor® 680 als intensitätsbezogene Farbskala.



**Abbildung 44:** In-vivo-Freisetzung von ALEXA Fluor<sup>®</sup> 680-BSA aus den Gelen A–D. Dargestellt ist jeweils der Median der relativen Fluoreszenzintensitäten bezogen auf den jeweiligen Startwert aus den drei Tieren. Die Fehlerbalken stellen die Maxima und Minima dar.

Quantenausbeute, eine stärkere Anregung durch eine größere Beleuchtungsfläche und verminderte Selbstauslöschung. Es wurde somit eine falsch hohe Intensität gemessen. Am Beispiel von „Maus 3“ aus „Käfig 2“ in Abbildung 43 konnte die Veränderung der Fluoreszenz bei der Ödembildung beobachtet werden. Auch das Anschwellen war zu sehen. Zwischen der Drei- und der Viermonatsmessung war das Ödem, wie in der Aufnahme unter Weißlicht zu sehen, vollständig verschwunden. Gleichzeitig war auch das Fluoreszenzsignal nicht mehr detektierbar.

Es konnte gezeigt werden, dass eine Freisetzung von BSA *in vivo* stattfindet. In Verbindung mit Kapitel 2.9.3 kann angenommen werden, dass deren Geschwindigkeit von der Art des Proteins unabhängig ist. Allein der Abbau – hauptsächlich durch Lipasen – ist für die Freisetzung der Tröpfchen und damit des Proteins verantwortlich.

## 3. Zusammenfassung und Ausblick

Im Verlauf dieser Dissertation konnte gezeigt werden, dass es gelungen war, vier Systeme zur kontrollierten Freisetzung von Proteinen zu entwickeln. Bei der Herstellung dieser auf 12-Hydroxystearinsäure und Erdnussöl bzw. MCT basierenden Gele konnte auf organische Lösungsmittel vollständig verzichtet werden. Die thermische Belastung für Proteine war gering und kann durch eine geringe Modifikation jederzeit ganz vermieden werden. Mit der Verwendung des SpeedMixers<sup>TM</sup> kam hinsichtlich der Scherbelastung ein besonders schonendes und in der Pharmazie bisher wenig beachtetes Verfahren zur Beladung der Gele mit wässriger Proteinlösung zum Einsatz. Nachdem eine physikalische Stabilisierung mit der Gelbildung als Quasiemulgator ähnlich der Kühlsalbe DAB scheiterte, wurde die Phasengrenze mit Cithrol<sup>TM</sup> DPHS stabilisiert. Dieser Emulgator besitzt die Fähigkeit besonders große Anteile an wässriger Phase in W/O-Emulsionen zu halten. Außerdem weist er aufgrund der Polyhydroxystearatketten eine strukturelle Ähnlichkeit mit dem Organogelbildner auf. Span<sup>TM</sup> 60 wurde als Alternative getestet und als weniger geeignet verworfen. Die theoretische maximale Beladung bei mit Cithrol<sup>TM</sup> DPHS stabilisierten Emulsionen – laut Herstellerangaben 90 % – konnte zwar nicht erreicht werden. 70 % waren jedoch mit intensiverer Homogenisierung möglich. Die vier Systeme, welche letztendlich ausgewählt wurden, hatten Beladungskapazitäten von 10 % und 50 % jeweils einmal mit Erdnussöl und einmal mit MCT. Deren Tröpfchengröße wurde mittels Phasenkontrast- und konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie auf ca. 1 µm bestimmt. Andere Verfahren zur Größenbestimmung schlugen fehl. Darüber hinaus wurde die Stabilität der Gele weiter untersucht. Sowohl unter Zentrifugieren als auch bei vierwöchiger Lagerung bei verschiedenen Temperaturen war die Emulsion stabil. Bei der Lagerung bei 37 °C war zwar eine Sedimentation der inneren Phase zu beobachten, jedoch keine Koaleszenz. Ein aktives Abtrennen der inneren Phasen gelang nur unter Verwendung von Dichlormethan. Zwar lösten auch Diethylether und zum Teil Toluol, n- und Cyclohexan das Gel, jedoch blieben die einzelnen Tröpfchen dabei erhalten. Über mehrere Waschvorgänge mit Dichlormethan und der Zuhilfenahme von Zentrifugation konnte aus fertigen mit Rinderserumalbumin beladenen Gelen die innere Phase gewonnen und mit Asymmetrischer Fluss-Feldflussfraktionierung auf die Bildung von Aggregaten untersucht werden. Durch die vergleichende Untersuchung von Referenzproben konnte die Bildung von Aggregaten als vernachlässigbar gering beurteilt werden. Dabei war jedoch zu sehen, dass der Einfluss von Dichlormethan während der Extraktion mehr Aggregate verursachte als der Herstellungsprozess. Darüber hinaus wurde versucht mittels ESR-Spektroskopie die Stabilität des Albumins während einer Lagerung bei 37 °C zu verfolgen. Dazu wurde Rinderserumalbumin in

eigener Synthese spinmarkiert. Eine Aggregation konnte dabei nicht festgestellt werden. Allerdings war ein deutlicher Unterschied zu einer Referenzprobe sichtbar. Während das Spektrum des in den Gelen formulierten Albumins sich innerhalb eines Monats nicht veränderte, wurde dieses bei der Referenz bereits nach zwei Wochen vollkommen beweglich. Da dies auf eine Zersetzung durch mikrobiologisches Wachstum hindeutete, wurde auf eine entsprechende wachstumshemmende Wirkung der Systeme geschlossen, wodurch z.B. eine Konservierung vermieden werden kann. Ebenfalls mit ESR wurde die pH-Stabilität einer auf pH 6,8 gepufferten Lösung im Gel untersucht. Zwar war hier keine eindeutige Bestimmung des pH-Wertes aufgrund von Verteilungseffekten zwischen den Phasen möglich, jedoch zeigte die Betrachtung der Daten relativ zum Startwert, dass es keine Veränderung des pH-Wertes während der Lagerung gab und dieser vermutlich weiterhin bei pH 6,8 lag. Mittels oszillierender Rheologie wurde gezeigt, dass die Gele hauptsächlich Festkörpereigenschaften besitzen, jedoch bereits bei geringer Deformation zu fließen beginnen. Je nach System liegen die hohen Speichermodule von 10 000–100 000 Pa aber nahe, dass eine recht hohe Kraft notwendig ist, um eine entsprechende Verformung zu erreichen. Mit zunehmendem Anteil an innerer Phase nimmt diese Kraft ab. Bei der Messung der Spritzbarkeit mittels TextureAnalyzer zeigte sich das genaue Gegenteil. Beim Durchfließen der dünnen 25 G-Kanüle behindern sich die Tröpfchen, bedingt durch die im Gegensatz zur oszillierenden Rheologie plastische Verformung, vermutlich gegenseitig, wodurch hier ein höherer Anteil an innerer Phase höhere Kräfte verursacht. Bei einer Ausspritzgeschwindigkeit von 200  $\mu\text{l}$  in 17 s waren alle Systeme nach Vergleichen mit Literaturwerten als „injizierbar“ oder sogar „leicht injizierbar“ einzustufen.

Da bei der Herstellung die Gelbildungstemperatur von großer Bedeutung ist, wurde versucht die Systeme hinsichtlich dieser weiter zu charakterisieren. Dafür wurde die Differenzialkalorimetrie verwendet. Damit war ein recht breiter Übergangsbereich detektierbar. Neben den Unterschieden zwischen Erdnussöl- und MCT-Gelen konnte eine absenkende Wirkung sowohl des Emulgators als auch des Wassers auf die Gelbildungstemperatur gezeigt werden. Dass es sich dabei wirklich um die Gelbildung handelte, bewiesen Messungen am reinen Öl, welche keine Übergänge im entsprechenden Bereich lieferten. Auch das Schmelzen von 12-Hydroxystearinsäure konnte durch die niedrige Temperatur des Übergangs ausgeschlossen werden. Als weitere Methode wurde zusätzlich Kernspinresonanzrelaxometrie mittels BT-NMR hinzugezogen. Jedoch zeigte sich, dass selbst im vollständig gelierten Zustand immer noch der größte Teil des Öls seine volle Beweglichkeit besitzt. Die Systeme bestehen also aus weiten Bulkbereichen an Öl, welche durch eine grobe Matrix aus 12-Hydroxystearinsäure zu einem Gel zusammengehalten werden. Diese Systeme sind damit ein gutes Beispiel dafür, dass es teils gravierende Unterschiede zwischen Makro- und Mikroviskosität geben kann. Die

Gelbildung wäre demzufolge damit nur zu beobachten, wenn das Signal von Öl und 12-Hydroxystearinsäure voneinander getrennt werden könnte. Dies würde jedoch vollständig deuterierte Öle benötigen, welche nicht verfügbar waren.

Zum Abschluss wurde das Freisetzungsverhalten aus den entwickelten Systemen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* untersucht. Zunächst wurde der Austausch von schwerem Wasser im Gelinneren mit überschichtetem normalem Wasser mittels Magnetresonanztomographie beobachtet. Dabei zeigte sich eine recht schnelle Veränderung. Spätestens nach 2 Tagen war kein Unterschied zur Referenz mehr zu erkennen. Für die Freisetzung von Rinderserumalbumin wurde eigens ein Modell zur Simulation der subkutanen Umgebung entwickelt. Diese konnte mittels multispektraler Fluoreszenzbildgebung gemessen werden. Aus transparentem Acrylglas wurden Blöcke aus je zwei Platten gefertigt. Die Bodenplatte besitzt drei Vertiefungen zu je 200  $\mu\text{l}$ . Mit einer Deckplatte kann darüber je nach Anforderung des Implantates eine Dialysemembran oder ein PET-Netz gespannt werden. Durch Aussparungen in der Deckplatte ist eine Diffusion nach außen ungehindert möglich. Die Freisetzung von fluoreszenzmarkiertem Rinderserumalbumin aus den Organogelen wurde mit einem PET-Netz durchgeführt. Auf einen Zusatz von Lipasen wurde gezielt verzichtet, da somit eine Freisetzung durch Erosion verhindert und nur der Diffusionsanteil untersucht wurde. Da über einen Zeitraum von 90 Tagen keine Freisetzung durch Diffusion feststellbar war, wurde als Mechanismus eine Erosion des Implantates *in vivo* angenommen. Es folgten Freisetzungsstudien am Tier. Sechs weiblichen SKH-1 Nacktmäusen wurden jeweils 200  $\mu\text{l}$  von zwei unterschiedlichen Systemen implantiert. Das fluoreszenzmarkierte Rinderserumalbumin darin konnte insgesamt 124 Tage mittels multispektraler Fluoreszenzbildgebung verfolgt werden. Eine kontrollierte Freisetzung des Proteins war somit über diesen Zeitraum möglich.

Für die Zukunft sollte das System weiter hinsichtlich seines Freisetzungsverhaltens und seiner Verträglichkeit untersucht werden. Insbesondere sollen nach den Modellproteinen therapeutisch relevante Proteine formuliert werden. Interessant ist dabei, wie sich besonders schერempfindliche, thermolabile oder gegenüber organischen Lösungsmitteln empfindliche Proteine verhalten. Da die Pufferung der verschiedensten pH-Werte in der inneren Phase möglich sein sollte, könnten auch Proteine mit einem Stabilitätsoptimum bei extremen pH-Werten formulierbar sein. Über ELISA kann die Aktivität nach der Formulierung überprüft werden. *In vivo* wäre eine Studie zur Pharmakokinetik direkt über Plasmaspiegel und zur Pharmakodynamik der therapeutischen Proteine von Bedeutung. Eine genauere Untersuchung der Korrelation zwischen Freisetzung und Erosion ist außerdem von Interesse. Letztere kann z.B. mit *In-vivo*-BT-NMR am Tier und später mit MRT am Menschen untersucht werden. Nach erfolgter Kalibrierung könnte eine solche Bestimmung die aufwändigen Freisetzungsstudien ablösen. Nach einer solchen weiterführenden Untersuchung und gegebenenfalls auch Optimierung haben die entwickelten Systeme großes Potenzial die Marktreife zu erlangen.

## 4. Materialien und Methoden

### 4.1. Materialien

#### 4.1.1. Lösungsmittel

##### 4.1.1.1. Wasser

Das verwendete Wasser wurde durch Bidestillation (2104, GFL, Deutschland) gewonnen und entspricht der Monographie des Europäischen Arzneibuches für Wasser für Injektionszwecke.

##### 4.1.1.2. Organische Lösungsmittel

Alle verwendeten organischen Lösungsmittel waren von analytischer Qualität und wurden ohne weitere Vorbereitungen verwendet.

#### 4.1.2. Öle

<i>Name</i>	<i>Bezugsquelle</i>	<i>Monographie</i>
Raffiniertes Erdnussöl	Caesar & Loretz GmbH, Hilden, Deutschland	Ph. Eur. 7
Natives Jojobaöl	Caesar & Loretz GmbH, Hilden, Deutschland	DAC 2004
Mittelkettige Triglyceride	Hansen & Rosenthal KG, Hamburg, Deutschland	Ph. Eur. 7
Isopropylmyristat	Hansen & Rosenthal KG, Hamburg, Deutschland	Ph. Eur. 7

#### 4.1.3. Emulgatoren

<i>Emulgator</i>	<i>Bezugsquelle</i>	<i>Monographie</i>
Span <sup>TM</sup> 60	Croda, Deutschland	Ph. Eur. 7 (Sorbitanstearat)
Cithrol <sup>TM</sup> DPHS	Croda, Deutschland	Ph. Eur. 7 (Macrogol-30-Dipolyhydroxystearat)

#### 4.1.4. Proteine

<i>Name</i>	<i>Bezugsquelle</i>
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
ALEXA Fluor <sup>®</sup> 647-BSA [109]	Invitrogen AG, Carlsbad, USA
ALEXA Fluor <sup>®</sup> 680-BSA [109]	Invitrogen AG, Carlsbad, USA
PCU-BSA	Eigensynthese

#### 4.1.5. Sonstiges

<i>Name</i>	<i>Bezugsquelle</i>
12-Hydroxystearinsäure, 99 %	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Dialysemembran Spectra/Por CE 100 kDa 16 mm	Spectrum Laboratories, Inc., USA
Dialysemembran Spectra/Por 1, 6–8 kDa, 16 mm	Spectrum Laboratories, Inc., USA
Dextranblau	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
2,2,5,5-Tetramethyl-3-pyrrolin- 1-oxyl-3-carboxylsäure- N-hydroxysuccinimidester	Alfa Aesar, Ward Hill, USA
4-Amino-2,2,5,5-tetramethyl- 3-imidazolin-1-oxyl-Radikal	N.N. Vorozhtso Institute of Organic Chemistry, Novosibirsk, Russland
Hyaluronan-Natrium aus Strep- tococcus equi	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

Alle weiteren Chemikalien waren von analytischer Qualität und wurden ohne weitere Vorbereitungen verwendet.

## 4.2. Methoden

### 4.2.1. Herstellung der Gele

Für die Grundgele wurde eine entsprechende Menge 12-Hydroxystearinsäure in ein 4 ml Glasgefäß mit Schraubdeckel bzw. in eine 10 g Kruke aus Polypropylen gefüllt, gegebenenfalls ein Emulgator zugegeben und zuletzt mit der jeweiligen lipophilen Flüssigkeit auf die Endmasse ergänzt. Anschließend wurde in einem Metallblockorbitalschüttler mit Heiz- und Kühlfunktion, dem SC20 von Torrey Pines Scientific Inc. bei 70 °C auf Stufe 3 (400 min<sup>-1</sup>) geschüttelt, bis sich die 12-Hydroxystearinsäure vollständig gelöst hatte. Die Gelbildung erfolgte beim Abkühlen unter die Gelbildungstemperatur.

Für die Herstellung der Emulsionsgele wurde der SpeedMixer<sup>TM</sup> DAC 150 SP von Hauschild Engineering (Hauschild & Co KG, Hamm, Deutschland) verwendet, dessen Funktionsweise in Abbildung 45 auf Seite 83 schematisch dargestellt ist. Neben den in der Grundausstattung vorhandenen Einsätzen stand eine Spezialanfertigung für 4 ml Glasgefäße zur Verfügung. Verwendet wurde grundsätzlich die maximale Drehzahl von 3500 min<sup>-1</sup>. Dabei wurden die Proben zum Abkühlen zunächst direkt von einer Anfangstemperatur von 70 °C aus vorgemischt. Anschließend wurde die zuvor bei 0,22 µm filtrierte wässrige Phase zugegeben und im SpeedMixer<sup>TM</sup> DAC 150 SP homogenisiert. Die Zeiten variierten je nach Probe und Versuch. Der gesamte Herstellungsprozess ist in Abbildung 46 auf Seite 84 schematisch dargestellt.

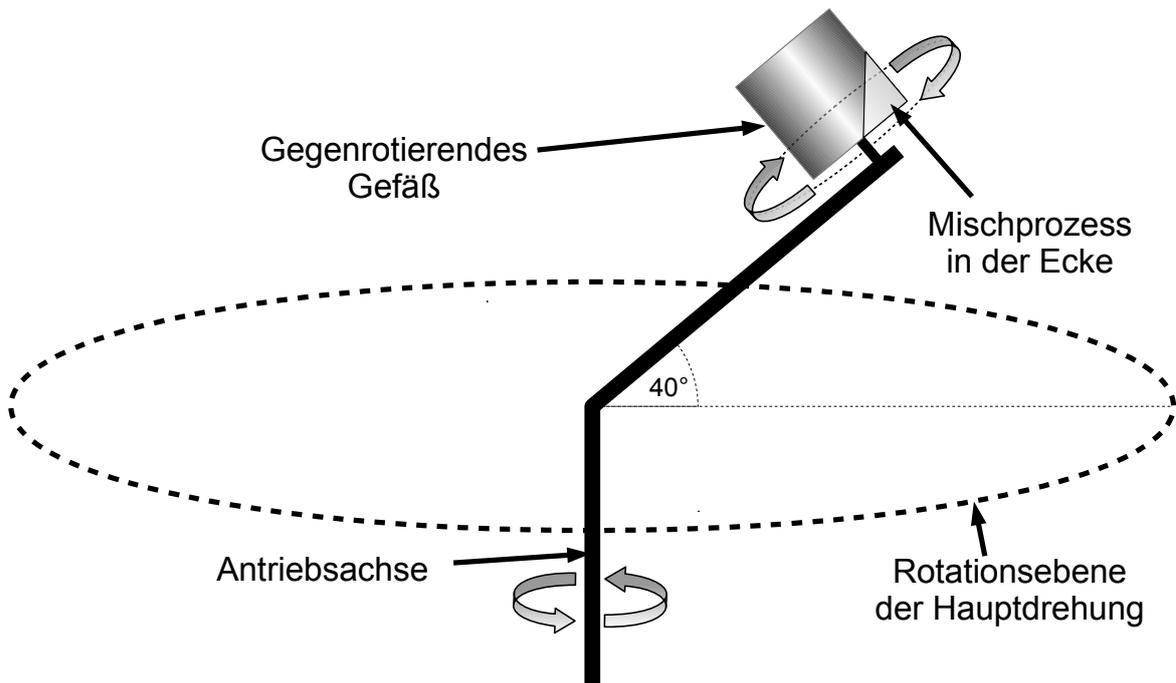
Als zusätzlichen Verfestigungsschritt wurden die Gele zusätzlich für 5 min im auf 50 °C temperierten Orbitalschüttler erwärmt, anschließend für 5 s abschließend gemischt und in Ruhe erkalten gelassen. Tabelle 9 zeigt die Zusammensetzung und Herstellungsparameter der ausgewählten und weiter charakterisierten Systeme.

Angaben zu den Anteilen von 12-Hydroxystearinsäure beziehen sich jeweils auf den lipophilen Anteil des Emulsionsgels bestehend aus 12-Hydroxystearinsäure, lipophiler Flüssigkeit und gegebenenfalls Emulgator. Die Emulgatormenge bezieht sich jeweils auf die Gesamtmasse inklusive eventuell vorhandener wässriger Phase.

### 4.2.2. Mikroskopie

#### 4.2.2.1. Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie

Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie ist ein mikroskopisches Verfahren, mit welchem sehr dünne Schichten dargestellt werden können, ohne die Probe tatsächlich in diesen Dimensionen präparieren zu müssen. Zusätzlich wird durch die Laserabstrahlung und der Detektion der dadurch angeregten Fluoreszenz eine hohe Auflösung erreicht [111].



**Abbildung 45:** Schematische Darstellung der Funktionsweise des SpeedMixer™ DAC 150 SP (modifiziert nach Massing et al. [110]).

**Tabelle 9:** Übersicht über die vier ausgewählten und weiter charakterisierten Systeme bezogen auf eine Gesamtmasse von 2 g.

	<i>Gel A</i>	<i>Gel B</i>	<i>Gel C</i>	<i>Gel D</i>
Cithrol™ DPHS	40 mg	40 mg	40 mg	40 mg
12-Hydroxystearinsäure	54 mg	54 mg	30 mg	30 mg
Lipophile Flüssigkeit	zu 1800 mg Erdnussöl	zu 1800 mg MCT	zu 1000 mg MCT	zu 1000 mg Erdnussöl
Vormischdauer	45 s	150 s	150 s	45 s
Wässrige Phase	200 µl	200 µl	1000 µl	1000 µl
Mischzeit	60 s	60 s	60 s	60 s
Härten	5 min bei 50 °C	5 min bei 50 °C	5 min bei 50 °C	5 min bei 50 °C
Abschließendes Mischen	5 s	5 s	5 s	5 s

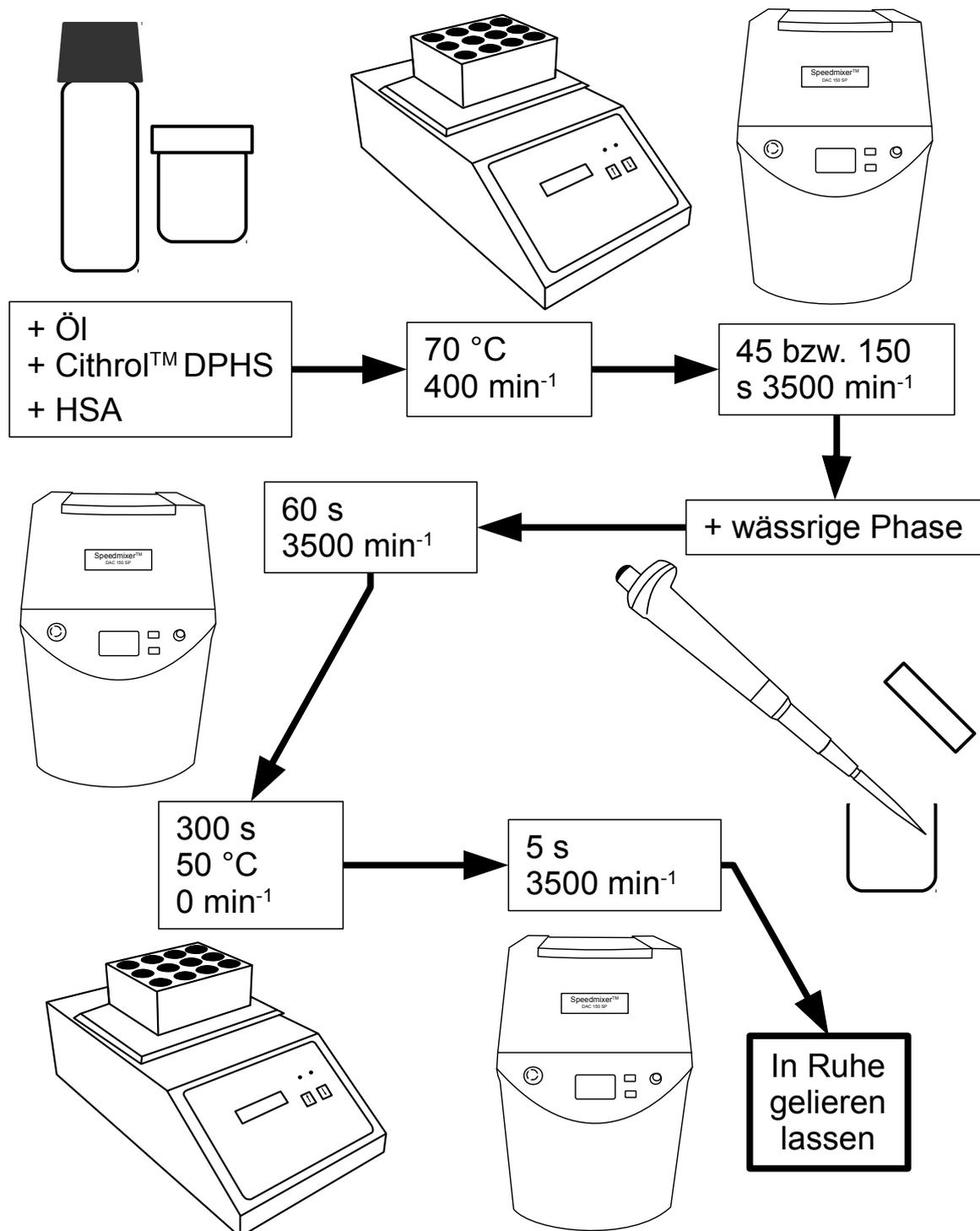


Abbildung 46: Schematische Darstellung der Herstellung der Emulsionsgele.

Die Gele aus Tabelle 9 wurden jeweils wie beschrieben im 2 g Maßstab in einer 10 g Kruke hergestellt. Dabei wurde eine Rhodamin-110-Lösung mit  $1 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$  als innere Phase verwendet. In der äußeren Phase befand sich DiI in einer Konzentration von  $10 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ , welches sich mit einem logP von ca. 17 nahezu vollständig in der lipophilen Phase verbleibt [112–114]. Diese Farbstoffkombination ist bereits in der Literatur für konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie beschrieben [115].

Eine stecknadelkopfgroße Menge wurde auf einen Objektträger gegeben und ein Deckgläschen ohne Druck draufgelegt. Anschließend wurde der Objektträger für einen kurzen Moment auf den auf 70 °C temperierten Metallblock des Orbitalschüttlers gelegt ohne jedoch zu schütteln. Da sich das Gel dadurch kurzzeitig verflüssigte, verteilte es sich in einer dünnen Schicht unter dem Deckgläschen. Zum Abschluss wurde mit einer Spritze Alleskleber um die Ränder des Deckgläschens gespritzt, um dieses zu fixieren.

Die mikroskopischen Aufnahmen wurden mit den „LSM 710“ (Carl-Zeiss, Jena, Deutschland), dem EC Plan-Neofluar 20x/0.50 M27 als Objektiv und der Software ZEN 2009 gemacht. Das Rhodamin 110 wurde dabei mit einem Laser der Wellenlänge 488 nm, das DiI mit 543 nm angeregt.

#### 4.2.2.2. Phasenkontrastmikroskopie

Der Vorteil dieses Verfahrens ist die Erzeugung des visuellen Kontrastes durch Unterschiede in den Brechungsindizes verschiedener Bereiche, hier speziell Öl und Wasser [116]. Dadurch wird im Gegensatz zur konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie die Zugabe farbiger bzw. fluoreszierender Stoffe überflüssig. Die Gele wurden wie zuvor hergestellt und präpariert. Die Messungen erfolgten mit einem Zeiss-Mikroskop mit Phasenkontrastfunktion. Als Objektiv diente das Plan-Neofluar 40x/0.75 Ph 2 von Zeiss. Die Aufnahme erfolgte über eine AxioCamMR3 und die Auswertung wurde mittels der AxioVision-Software durchgeführt.

### 4.2.3. Gelstabilität

#### 4.2.3.1. Zentrifugation

Zum Überprüfen der Stabilität wurde jeweils 1 g der Gele A–D mittels einer Labofuge 300 von Heraeus, Deutschland, im  $8 \times 15$  ml Rotor bei  $4000 \text{ min}^{-1}$  (ca.  $2500 \times g$ ) für 20 min zentrifugiert und hinsichtlich ausgetretener wässriger Phase untersucht. Diese wurde mit Dextranblau angefärbt, um eine eventuelle Phasengrenze leichter erkennen zu können. Dabei wurde sich zunächst auf das Verfahren von Yao et. al. (1990) bezogen [117]. Die Parameter wurden jedoch deutlich verschärft. Die Zentrifugalbeschleunigung wurde von ursprünglich  $380 \times g$  und die Dauer von ursprünglich 10 min erhöht.

#### 4.2.3.2. Lagerung

Um die Lagerstabilität zu überprüfen wurde jeweils 1 g der Gele A–D bei  $-20^{\circ}\text{C}$ , im Kühlschrank ( $4-8^{\circ}\text{C}$ ), im Klimaschrank bei  $23^{\circ}\text{C}$  und  $37^{\circ}\text{C}$  gelagert und einmal wöchentlich auf ausgetretene wässrige Phase untersucht. Diese wurde wieder mit Dextranblau angefärbt, um eine eventuelle Phasengrenze leichter erkennen zu können.

#### 4.2.3.3. Aktives Trennen der Emulsion

Zum Abtrennen der inneren Phase wurden verschiedene Ansätze gewählt. Zunächst wurden die Gele für bis zu 2 h bei ca.  $2500 \times g$  zentrifugiert.

Darüber hinaus wurde versucht, die Gele durch die Zugabe von nicht mit Wasser mischbaren organischen Lösungsmitteln zu lösen bzw. zu verflüssigen, um anschließend die nun flüssige Emulsion durch Zentrifugation zum Brechen zu bringen. Dafür wurden zunächst die Mischbarkeit von Cyclohexan, n-Hexan, Toluol, Diethylether und Dichlormethan mit MCT und Erdnussöl im Verhältnis 1:1 überprüft. Zusätzlich zu diesen Lösungsmitteln wurde das dem jeweiligen System zugrundeliegende Öl verwendet.

0,5 g Gel mit Dextranblaulösung als innere Phase wurde in einem 4 ml Gläschen mit ca. 2,5 ml Lösungsmittel versetzt. Anschließend wurde mit einem Vortex Schüttler gemischt und für 10 min bei ca.  $2500 \times g$  zentrifugiert. Das Verhalten der Emulsion wurde vor und nach dem Zentrifugieren bewertet.

Auf den Versuch die Emulsion im durch Wärme herbeigeführten flüssigen Zustand zu trennen wurde verzichtet, da anzunehmen ist, dass das Protein dabei in erheblichem Ausmaß denaturiert werden würde.

#### 4.2.4. Asymmetrische Fluss-Feldflussfraktionierung

Eine eventuelle Aggregatbildung des Proteins während der Herstellung wurde mittels der Asymmetrischen Fluss-Feldflussfraktionierung untersucht. Dabei kam die Eclipse AF4 (Wyatt Technology Europe, Dernbach, Deutschland) zum Einsatz. Diese war mit einem Mehrwinkellichtstredetektor (DAWN EOS, Wyatt) sowie einem Brechungsindexdetektor (Shodex RI-101) verbunden. Als Lösungs- und Elutionsmittel wurde eine mit 0,02 % (m/V) Natriumazid konservierte 50 mM Kochsalzlösung verwendet. Jede Probe wurde dabei dreifach vermessen.

Die Proben hierfür wurden mit einer Rinderserumalbuminlösung mit  $10 \frac{\text{mg}}{\text{ml}}$  in 50 mM Kochsalzlösung hergestellt. Die darin enthaltene wässrige Phase wurde wie in Abbildung 47 auf Seite 88 dargestellt gewonnen. Dabei wurde zunächst jeweils eine Menge Gel, welche einer wässrigen Phase von 200  $\mu\text{l}$  entsprach (2 g bei Gel A und B bzw. 0,4 mg bei C und D), in jeweils zwei 4 ml Gewindegeläschen gefüllt. Außerdem wurden

zur Kontrolle zwei Gläschen mit 200  $\mu\text{l}$  reiner Albuminlösung befüllt. Die Proben wurden jeweils 5 s bei  $3500 \text{ min}^{-1}$  im SpeedMixer<sup>TM</sup> gemischt, um eine kompakte Schicht am Boden der Gefäße zu erhalten. 1 ml Dichlormethan und 0,8 ml 50 mM Kochsalzlösung wurden dazugegeben und 30 s im SpeedMixer<sup>TM</sup> gemischt. Es folgte eine Sequenz aus Vortexen, 10 min Ruhe, Vortexen, Ruhe und erneutem Vortexen. Anschließend wurde bei  $4000 \text{ min}^{-1}$  (ca.  $2500 \times g$ ) in einer Labofuge 300 von Heraeus, Deutschland, im  $8 \times 15 \text{ ml}$  Rotor für 30 min zentrifugiert und die sich unten absetzende Menge an Dichlormethan mit einer Spritze abgezogen. Diese Sequenz (ab dem ersten Vortexen) wurde zweimal wiederholt nachdem 1 ml (1. Wiederholung) bzw. 2 ml (2. Wiederholung) Dichlormethan zugegeben wurden. Nach den somit drei Durchläufen wurde der wässrige Überstand in ein 2 ml Reaktionsgefäß von Eppendorf überführt und darin mit einer Minispin von Eppendorf bei  $13\,400 \text{ min}^{-1}$  ( $12100 \times g$ ) für 15 min zentrifugiert. Die Überstände wurden unter größter Vorsicht abpipettiert und die zwei auf diesem Wege erhaltenen Lösungen pro Probe wurden vereinigt. Neben diesen wurde noch zusätzlich die ursprüngliche unbehandelte Albuminlösung auf  $2 \frac{\text{mg}}{\text{ml}}$  verdünnt und zum Vergleich ebenfalls vermessen. Zwei weitere Vergleichsproben wurden durch Herstellen der Gele C und D im 2 g-Maßstab ohne Emulgator mit oben genannter Albuminlösung erzeugt. Die Extraktion erfolgte hier durch Zugabe von 4 ml der Kochsalzlösung und leichtes Scheren. 2 ml der wässrigen Phase wurden schließlich abpipettiert.

Die Auswertung der Messdaten erfolgte mittels der Software ASTRA 4.90 (Wyatt Technology Europe, Dernbach, Deutschland). Für die Ermittlung der quantitativen Verteilung von Mono-, Di-, Tri- und Tetrameren wurde das Signal des Brechungsindexdetektors verwendet. Der Lichtstreuendetektor diente zum Identifizieren der Mono- und Oligomere. Da ASTRA die Flächen der einzelnen Signale nicht über das Einpassen von Funktionen bestimmen kann, wurden die Daten hierfür nach MagicPlot Student 2.3 (Magicplot Systems, LLC, St. Petersburg, Russland) exportiert. Dort wurde die Verteilung als Summe von vier bis fünf Gauß-Funktionen nachgebildet. Jeweils eine für Mono, Di-, Tri- und Tetramere sowie soweit erforderlich eine für größere Aggregate. Ausgewertet wurden die so ermittelten Flächen der Mono- bis Tetramere hinsichtlich ihres prozentualen Anteils zueinander. Die Funktion für die größeren Aggregate diente nur als Ergänzung damit die Software die Ausgangsdaten zuverlässig nachbilden konnte. Berechnet wurden die Flächen (A) über die Amplituden (a) und Breiten (dx) der Gauß-Funktionen, die von der Software ausgegeben wurden, über  $A = \sqrt{\frac{\pi}{\ln 2}} \cdot a \cdot dx$ .

#### 4.2.5. Rheologie

Neben den in Tabelle 9 aufgeführten Systemen wurden die Gele A und B zusätzlich jeweils einmal ohne innere Phase und einmal ohne innere Phase und ohne Emulgator

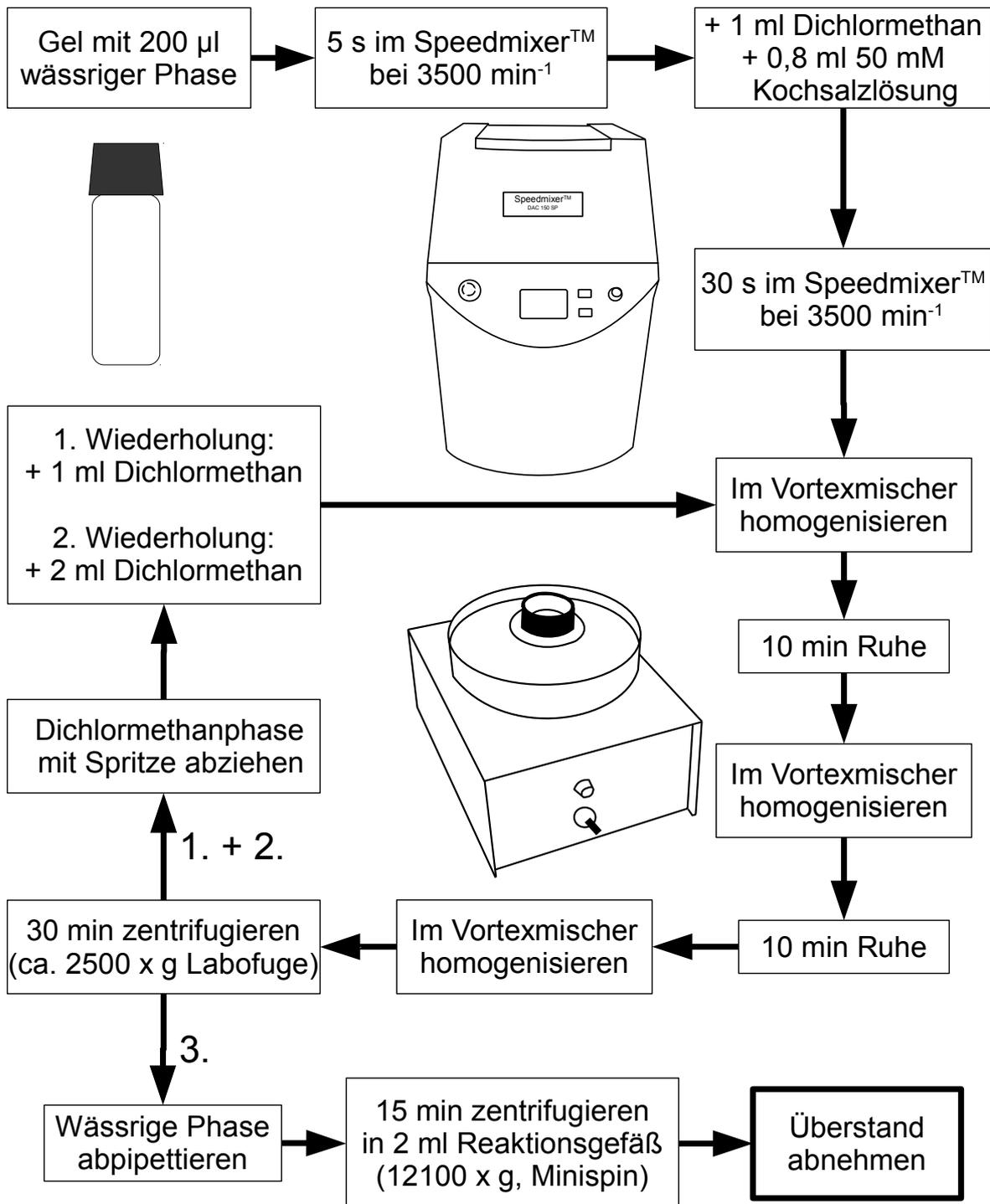


Abbildung 47: Schematische Darstellung des Prozesses zur Gewinnung der wässrigen Phase.



**Abbildung 48:** *Physica MCR 301 Oszillationsrheometer von Anton Paar mit Kegel-Platte-Geometrie; Durchmesser: 24,982 mm; Winkel des Kegels: 1,003°; Messspalt: 48  $\mu\text{m}$ .*

untersucht. Die Herstellung erfolgte wie beschrieben im 2 g Maßstab in einer 10 g Kruke. Die fertigen Gele wurden schließlich in 3 ml Spritzen mit Luer-Lok<sup>TM</sup> abgefüllt.

Die Messung wurde mittels eines Physica MCR 301 Oszillationsrheometers von Anton Paar durchgeführt; vergleiche Abbildung 48 auf Seite 89. Dabei kam eine Kegel-Platte-Geometrie mit einem Durchmesser von 24,982 mm zum Einsatz. Der Winkel des Kegels betrug 1,003° und der Messspalt 48  $\mu\text{m}$ .

Bei den Messungen sollte das *In-vivo*-Verhalten möglichst gut nachempfunden werden. Deshalb wurden jeweils ca. 200  $\mu\text{l}$  der Proben durch eine 25 G Kanüle auf die auf 37 °C temperierte Messgeometrie gespritzt. Nach dem Herunterfahren des Kegels wurde überschüssiges Probenmaterial entfernt.

Bestimmt wurde zunächst der linearviskoelastische Bereich bei einer Frequenz von 1 Hz. Dabei wurde nach einer Temperierungsphase ein Deformationsbereich von 0,01–100 % dekadisch logarithmisch bei sechs Messpunkten pro Zehnerpotenz durchfahren. Auf der Basis dieser Daten wurde eine Deformation für die folgende frequenzabhängige Messung festgelegt. Diese wurde an einer frischen Probe des jeweiligen Gels durchgeführt, da eine irreversible Destruktion während der ersten Messung nicht auszuschließen war. Dabei wurde ein Frequenzbereich von 0,1–100 Hz ebenfalls dekadisch logarithmisch und mit fünf Messpunkten pro Zehnerpotenz durchfahren.



**Abbildung 49:** CT3-4500 TextureAnalyzer von Brookfield/Rheotec Ottendorf-Okrilla, Deutschland (links); Versuchsaufbau zur Injektionskraftbestimmung (Mitte); dabei ausgespritztes Gel (rechts).

#### 4.2.6. Messung der Injektionskraft

Die Injektionskraft wurde mittels des CT3-4500 TextureAnalyzer von Brookfield-Rheotec, Ottendorf-Okrilla, Deutschland, bestimmt, vgl. Abbildung 49 auf Seite 90 [118–120]. Dafür wurden die Gele wie auf Seite 82 beschrieben in einer 10 g Kruke hergestellt und in eine 3 ml Spritze mit Luer-Lok<sup>TM</sup> von BD, USA, gefüllt. Auf diese wurde eine 25 G Sterican<sup>®</sup> Kanüle von B. Braun, Deutschland, geschraubt. Anschließend wurde die Spritze auf eine 1,5 ml Gewindeflasche ND8, VWR, Deutschland, gesteckt (vergleiche Abbildung 49 Mitte). Der Injektionsvorgang wurde mit dem TA25/1000 Aufsatz, einem Acrylglaszylinder mit einem Durchmesser von 50,8 mm und einer Höhe von 20 mm, durch einfaches Herabfahren durchgeführt. Damit der Stempel der Spritze sich während des Vorgangs durchgängig im Aktionsbereich des Gerätes befand, wurde die Gewindeflasche mit der Spritze auf einen massiven Metallblock gestellt. Die Messung erfolgte bei einer Geschwindigkeit von  $0,2 \frac{\text{mm}}{\text{s}}$ . Dies entspricht bei diesem Sprizentyp ca.  $12 \frac{\mu\text{l}}{\text{s}}$ . Damit würde ein auf diese Weise appliziertes Implantat einer Größe von 200  $\mu\text{l}$  knapp 17 s dauern. Weitere Parameter waren ein Triggerpunkt von 0,0067 N sowie eine Vorlaufgeschwindigkeit von  $2 \frac{\text{mm}}{\text{s}}$ . Während der Messung wurden 20 Punkte/s aufgezeichnet. Ausgewertet wurden die mittleren 200  $\mu\text{l}$  des gesamten Vorgangs. Dazu wurden die Messdaten des Bereichs von  $\pm 1,7 \text{ mm}$  um den Mittelwert des gesamten

Weges des Spritzenstempels exportiert. Aus diesem Datensatz an Kräften wurden der Mittelwert und die Standardabweichung bestimmt.

### 4.2.7. Differenzialkalorimetrie

Für die Differenzialkalorimetrie (DSC) wurde die DSC 200 (Netzsch, Selb) genutzt. Die Heizrate betrug  $5 \frac{\text{K}}{\text{min}}$ . Die Gele wurden wie ab Seite 82 beschrieben in einer 10 g Kruke hergestellt. Die wasserfreien Gele entsprachen in Herstellung und Zusammensetzung bis auf den Verzicht auf die innere Phase den ausgewählten Systemen A–D. Gel A und D bzw. B und C unterschieden sich somit ohne Wasser ausschließlich im Gehalt an Cithrol DPHS ( $2,2\%$  bzw.  $4\%$ ), da dieser in Bezug auf die Endmasse der kompletten Systeme konstant und somit vom Anteil an innerer Phase abhängig war. Bei den emulgatorfreien Varianten existierte entsprechend kein Unterschied. Zusätzlich wurden die reinen Öle als Blindversuch gemessen.

### 4.2.8. Kernspinresonanz

#### 4.2.8.1. Relaxometrie

Mittels eines Benchtop-NMR-Spektrometers mit 3D-Bildgebungseinheit von Oxford Instruments, Großbritannien, wurden die  $T_2$ -Relaxationszeiten (transversale Relaxation) gemessen. Dafür wurde die Carr-Purcell-Meiboom-Gill-Sequenz verwendet und jeweils 16 Messungen akkumuliert. Der Abstand zwischen diesen Wiederholungen betrug  $30\,000\,000 \mu\text{s}$  und es wurden pro Anregungspuls 16 384 Echos im Abstand von  $2\tau$  bei  $\tau = 135 \mu\text{s}$  gemessen. Die Auswertung erfolgte mit WinDXP Version 1.8.1.0 von Resonance Instruments Ltd, Großbritannien. Die Proben wurden, wie auf Seite 82 beschrieben, mit bidestilliertem Wasser als innere Phase hergestellt und bei verschiedenen Temperaturen vermessen.

#### 4.2.8.2. Magnetresonanztomographie

Für die Magnetresonanztomographie wurde das gleiche Gerät verwendet wie schon bei der Messung der Relaxationszeiten. Mit den Parametern  $t_E = 24 \mu\text{s}$  und  $t_R = 5000 \text{ ms}$  sowie 16 Messzyklen zu jeweils 64 Messungen wurden  $T_2$ -gewichtete 2D-Tomogramme aufgenommen. Dadurch wurden die Signale der Protonen des Öls unterdrückt und das Wasser als heller Kontrast dargestellt. Für diese Messung wurden die Gele, wie auf Seite 82 beschrieben, mit  $^1\text{H}$ -NMR inaktivem schwerem Wasser als innere Phase hergestellt und anschließend mit normalem bidestilliertem Wasser überschichtet. Lagerung und Messung erfolgten bei  $37^\circ\text{C}$ . Sobald ein Aufschwimmen der Probe beobachtet wurde, erfolgte eine Beschwerung des Gels mit Glasperlen.

## 4.2.9. Elektronenspinresonanzspektroskopie

### 4.2.9.1. Spinmarkierung von Rinderserumalbumin

Natives Rinderserumalbumin wurde mit 2,2,5,5-Tetramethyl-3-pyrrolin-1-oxyl-3-carboxylsäure nach einem modifizierten [109] Syntheseprotokoll zur Markierung von Proteinen von Invitrogen spinmarkiert [121]. Dafür wurden 1000 mg natives Rinderserumalbumin in 40 ml Carbonatpuffer mit einem pH-Wert von 8,5 gelöst. Anschließend wurde die Lösung auf Eis gekühlt und 60 ml Dimethylsulfoxid langsam zugegeben. 1000 mg des N-Hydroxysuccinimid-Esters von 2,2,5,5-Tetramethyl-3-pyrrolin-1-oxyl-3-carboxylsäure wurden in 30 ml Dimethylsulfoxid gelöst und langsam bei Raumtemperatur unter Rühren zur Albuminlösung getropft. Nach 1 h Rühren wurden 10 ml einer Hydroxylammoniumchloridlösung zugegeben. Diese wurde hergestellt, indem in 5 ml bidestilliertem Wasser 1050 mg Hydroxylammoniumchlorid gelöst, die Lösung anschließend mit 5 M Natriumhydroxidlösung auf einen pH-Wert von ca. 8,5 eingestellt und abschließend im Verhältnis 1:1 mit bidestilliertem Wasser verdünnt wurde. Nach erneutem einstündigem Rühren, wurde zwei Tage gegen 2 l einer Mischung aus einem Teil Dimethylsulfoxid und einem Teil 10 mM Natriumchloridlösung, anschließen zwei Tage nur gegen 2 l 10 mM Natriumchloridlösung und ein Tag gegen bidestilliertes Wasser dialysiert. Das Medium wurde dabei zweimal am Tag gewechselt. Zum Abschluss wurde die Lösung lyophilisiert.

### 4.2.9.2. Mobilitätsmessung

Für die Untersuchung der Mobilität wurde spinmarkiertes Rinderserumalbumin verwendet, wie in Kapitel 4.2.9.1 beschrieben. Es wurden die Gele A–D mit einer Lösung des markierten Rinderserumalbumins in einer Konzentration von  $10 \frac{\text{mg}}{\text{ml}}$  in PBS mit einem pH-Wert von 6,8 hergestellt. Diese wurden bei 37 °C gelagert und zu ausgewählten Zeitpunkten im ESR-L-Band-Spektrometer (RadicalScope, Magnettech, Berlin, Deutschland) vermessen. Parallel dazu wurde die reine Lösung des Proteins als Referenz jeweils in unkonservierter und mit 0,02 % Natriumazid konservierter Form bei 37 °C mitgeführt. Dabei wurde ein Messbereich mit einer Breite von 12 mT und eine Modulationsamplitude von 0,1 mT gewählt. Die Simulation der Spektren wurde mit EPRSIM-C Version 6.2 (Laboratory of Biophysics, Jožef Stefan Institute, Ljubljana) durchgeführt.

### 4.2.9.3. pH-Wert-Messung

Als pH-sensitive Spinsonde kam das 4-Amino-2,2,5,5-tetramethyl-3-imidazolin-1-oxyl-Radikal (AT) zum Einsatz, dessen Hyperfeinaufspaltung sich in Abhängigkeit des

pH-Wertes der Umgebung ändert [122]. Zunächst wurde das Verteilungsverhalten der Spinsonde zwischen den Ölen und wässrigen Phasen mit den pH-Werten 4,0 und 6,1 (pKs) untersucht. Als wässrige Phase diente dabei PBS welcher mit 0,1 N Salzsäure auf die jeweiligen pH-Werte eingestellt wurde. Anschließend wurden mit den beiden Puffern eine 2 mM AT-Lösungen hergestellt. Jeweils 1 g der Lösung und 1 g Öl wurden zusammen in ein 4 ml Gewindgläschen gegeben und 24 h im End-over-End-Mischer bei einer Temperatur von 37 °C und einer Drehgeschwindigkeit von 10 min<sup>-1</sup> inkubiert. Aus beiden Phasen wurde eine Probe gezogen und im ESR X-Band-Spektrometer (MiniScope MS200, Magnettech, Berlin, Deutschland) über 5,882 mT in 60 s vermessen. Die Modulationsamplitude betrug 0,1 mT. Die dabei erhaltenen Spektren wurden mittels Easy-Batch Version 1.2 in einen einspaltigen ASCII-Datensatz mit Kopfdaten überführt. Mit Hilfe von CU2Plot V2.4 (Christian Neidel) wurde eine Basislinienkorrektur durchgeführt und die x-Verschiebungen ausgeglichen, sodass die mittleren Linien übereinander liegen. Die Magnetfeldachse wurde dabei in eine relative Achse umgewandelt, die die Werte als Verschiebung zum B<sub>0</sub>-Feld enthält. Die Daten wurden in dieser Form in eine zweiseitige ASCII-Tabelle überführt. Diese konnte nun in MagicPlot Student 2.3 (Magicplot Systems, LLC, St. Petersburg, Russland) geladen werden. Mit dieser Software konnten die Spektren nun durch eine Überlagerung von bis zu 12 ersten Ableitungen von Gauß-Funktionen über eine automatische Minimierung der Abweichung nachgebildet werden. Da Amplituden (a) und Breiten (dx) der einzelnen Funktionen von der Software ausgegeben wurden, konnte für jede die jeweilige Intensität über deren Fläche (A) mittels  $A = \sqrt{\frac{\pi}{\ln 2}} \cdot a \cdot dx$  bestimmt werden und schließlich die Einzelintensitäten zur Gesamtintensität aufaddiert werden. Der Anteil an AT im Öl in % der Gesamtmenge wurde über  $\% = \frac{A_{\text{Öl}}}{A_{\text{Öl}} + A_{\text{PBS}}} \cdot 100 \cdot \frac{1}{\text{Gain}} \cdot \text{Faktor}$  berechnet. Die Korrektur anhand der Vorverstärkung (Gain) ist notwendig, da diese der jeweiligen Signalintensität bei jeder Messung angepasst wurde. Der Faktor dient der Korrektur der unterschiedlichen Absorption der Mikrowelle durch die jeweilige Probe und beträgt für wässrige Systeme 1,00, für Erdnussöl 0,93 und für MCT 0,80.

Um eine Hyperfeinaufspaltung einem pH-Wert zuordnen zu können wurde eine Kalibrierung durchgeführt. Dazu wurde eine 2 mM AT-Lösung in PBS hergestellt und mit 0,1 N Salzsäure bzw. Natronlauge auf pH-Werte 2,6–8,0 eingestellt. Die Proben wurden am ESR-L-Band-Spektrometer (RadicalScope, Magnettech, Berlin) über 6 mT in 60 s mit einer Modulationsamplitude von 0,1 mT vermessen. Die Auswertung erfolgte wie zuvor. Um die Abstände zwischen der ersten und der dritten Linie der Spektren zu bestimmen wurde mittels MagicPlot Student 2.3 jeweils eine Gauß-Funktion in die jeweiligen Linien gelegt. Die Hyperfeinaufspaltung ergab sich durch die halbe Differenz der von MagicPlot angegebenen x-Verschiebungen der Gauß-Funktionen (x-Wert des Maximums der ursprünglichen Gauß-Funktion, x<sub>0</sub>). Zusätzlich wurden die Spektren

von AT in MCT sowie Erdnussöl, die bereits bei der Bestimmung des Verteilungskoeffizienten gewonnen wurden, auf diese Weise ausgewertet.

Die Gele A–D wurden mit einer 2 mM Lösung von AT in PBS mit einem pH-Wert von 6,8 hergestellt. Damit war eine Pufferkapazität vorhanden wie sie auch für spätere Lösungen von therapeutischen Proteinen vorliegen könnte. Die Proben wurden bei 37 °C inkubiert und im ESR-L-Band-Spektrometer (RadicalScope, Magnettech, Berlin) vermessen. Dabei wurde ein Messbereich mit einer Breite von 6 mT und eine Modulationsamplitude von 0,1 mT gewählt. Die Auswertung erfolgte analog der Kalibrierung.

## 4.2.10. Multispektrale Fluoreszenzbildgebung

### 4.2.10.1. Theoretische Grundlagen

Für die multispektrale Fluoreszenzbildgebung wurde sowohl für die *In-vitro*- als auch die *In-vivo*-Versuche das „Maestro<sup>TM</sup> in vivo imaging system“ von Cambridge Research & Instrumentation, Inc. (CRi) verwendet. Dieses besteht aus einer Xenonlampe, deren weißes Licht zunächst über einen Bandpassfarbfilter auf den gewünschten Wellenlängenbereich reduziert wird. Das nun farbige Licht wird über Glasfaserleitungen in eine Dunkelkammer geleitet und strahlt dort auf das zu untersuchende Objekt. Das emittierte Licht wird durch einen Langpassfilter von überlagertem eingestrahlt Licht befreit. Bandpassextinktionsfilter und Langpassemissionsfilter ergeben zusammen den Filtersatz, wovon sechs verschiedene – blau, grün, gelb, rot, tiefrot und nahinfrarot (NIR) – zur Verfügung stehen. Die Selektion der gewünschten einzelnen Wellenlängen erfolgt anschließend durch einen variablen Flüssigkristallfilter. Die Intensität des durchtretenden Lichtes wird durch eine digitale Monochromkamera detektiert. Durch das Aufzeichnen von mehreren Wellenlängen ist für jeden Bildpunkt das jeweilige Emissionsspektrum rekonstruierbar [123].

Zusätzlich ist das Gerät mit einer Narkosevorrichtung ausgestattet. Diese besteht aus einer Narkosemaske, über welche die Tiere sowohl mit Narkosegas – in diesem Fall Isofluran und Sauerstoff – beatmet werden als auch überschüssiges und verbrauchtes Narkosegas abgesaugt werden können. Diese ist an eine Heizplatte angebracht, welche auf 37 °C temperiert ist und die Tiere vor einer Unterkühlung schützt. Somit können diese auch über einen längeren Zeitraum beobachtet werden [124].

Nach erfolgter Datenerfassung ist es mit der Maestro<sup>TM</sup>-Software (Version 2.10) möglich, verschiedene überlagerte Emissionsspektren über einen mathematischen Algorithmus zu trennen, zu lokalisieren und getrennt quantitativ zu analysieren. Neben den Intensitätsverhältnissen lassen sich auch spektrale Veränderungen feststellen [115].

#### 4.2.10.2. *In-vitro*-Freisetzungsuntersuchungen

##### Entwicklung eines *In-vitro*-Freisetzungsmodells

Während der Entwicklung des Freisetzungsmodells kamen verschiedene Hyaluronan-gele zum Einsatz. Sofern nicht anders beschrieben, wurde eine Konzentration von 3% Hyaluronan-Natrium verwendet. Die Fluoreszenzfarbstoffe kamen mit Konzentrationen von  $70 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$  bei den Albuminen und  $2 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$  beim Methylenblau zum Einsatz. Die Herstellung erfolgt durch einfaches Lösen der Bestandteile in PBS mit einem pH-Wert von 6,8 aus bidestilliertem Wasser. Die entstandenen Gele wurden in die Probenkammern der verschiedenen Modelle gefüllt und mit einer Dialysemembran abgedeckt. Die Messung erfolgte im „Maestro<sup>TM</sup> in vivo imaging system“ unter Verwendung des gelben Filtersatzes für Methylenblau und ALEXA Fluor<sup>®</sup> 647-BSA sowie des roten Filtersatzes bei ALEXA Fluor<sup>®</sup> 680-BSA. Für die Messung wurden die verschiedenen Prototypen des Modells mit den Gelen befüllt, anschließend mit einer Dialysemembran bedeckt, verschlossen und in das FreisetzungsmEDIUM gelegt. In vorher festgelegten Zeitabständen wurde das System aus dem Medium entnommen und in der Messkammer des „Maestro<sup>TM</sup> in vivo imaging systems“ platziert. Bei der finalen Bauart wurde der Block mit der Unterseite nach oben in den Messraum gelegt. Es wurde grundsätzlich mit einer automatisch ermittelten Belichtungszeit gemessen. Anschließend wurde die Fluoreszenzintensität pro Sekunde Belichtungszeit für jede einzelne Kammer eines Blockes bestimmt.

##### *In-vitro*-Freisetzungsuntersuchung mittels des entwickelten Modells

Die Freisetzungsuntersuchungen der ausgewählten Lipogele erfolgten mittels des eigens entwickelten Modells und wurden in phosphatgepufferter Saline (Ph. Eur.) mit einem pH-Wert von 6,8 als Medium bei 37 °C durchgeführt. Die Gele wurden mit der in Tabelle 9 auf Seite 83 beschriebenen Zusammensetzung hergestellt. Als wässrige Phase diente eine ALEXA Fluor<sup>®</sup> 680-BSA Lösung mit einer Konzentration von  $70 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$  in PBS mit einem pH-Wert von 6,8 aus bidestilliertem Wasser. Der Ablauf entsprach dem der Testfreisetzung aus dem Prototyp der finalen Bauart. Der einzige Unterschied war die Verwendung eines PET-Netzes zur Abdeckung der Probenkammern anstelle einer Dialysemembran. Auf Zusätze im Medium wurde verzichtet.

#### 4.2.10.3. *In-vivo*-Freisetzungsuntersuchungen

Die Präparation der Systeme erfolgte wie in Tabelle 9 auf Seite 83 dargestellt. Als wässrige Phase wurde eine ALEXA Fluor<sup>®</sup> 680-BSA-Lösung in bidestilliertem Wasser mit einer Konzentration von  $70 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$  verwendet. Als Tiermodell dienten sechs weibliche SKH-1 Nacktmäuse, um die Störung der Messung durch Behaarung auf ein Minimum zu reduzieren. Die Tiere wurden in zwei Gruppen eingeteilt. Den Mäusen in „Käfig 1“

wurde links Gel A und rechts Gel B appliziert. In „Käfig 2“ wurden Gel C (links) und Gel D (rechts) untersucht. Die Tiere innerhalb eines Käfigs wurden ebenfalls nummeriert (Maus 1–3) und durch Markierungen im Ohr unterschieden. Es erfolgte eine subkutane Injektion von ca. 200 µl jeweils an die Innenseiten der beiden Hinterbeine im Bereich des Oberschenkelansatzes. Somit konnten pro Maus je zwei Proben untersucht werden, wodurch die Anzahl der Versuchstiere minimiert werden konnte. Die Messung erfolgte, wie schon die Applikation, unter Isoflurannarkose in Rückenlage. Anschließend wurde das Gesamtfluoreszenzspektrum in seine Bestandteile – Hintergrund-, Maus- und Farbstoffspektrum – zerlegt und die Intensität des zum ALEXA Fluor<sup>®</sup> 680 gehörenden Anteils im Bereich der Implantate pro Sekunde Belichtungszeit quantifiziert. Zusätzlich wurden Monochromaufnahmen unter Weißlicht gemacht.

# A. Abkürzungsverzeichnis

<b>2a<sub>n</sub></b>	Abstand zwischen den beiden äußeren ESR-Signalen einer <sup>15</sup> N-Spinsonde
<b>A4F</b>	Asymmetrische Fluss-Feldflussfraktionierung
<b>A<sub>xxx</sub></b>	Fläche unter der jeweiligen Kurve; Integral bzw. bei ESR doppeltes Integral
<b>AT</b>	4-Amino-2,2,5,5-tetramethyl-3-imidazolin-1-oxyl-Radikal
<b>BMP</b>	Knochenmorphogenetische Proteine
<b>BSA</b>	Rinderserumalbumin
<b>DNA</b>	Desoxyribonukleinsäure
<b>EÖ</b>	Erdnussöl
<b>ESR</b>	Elektronenspinresonanz
<b>FDA</b>	Food and Drug Administration; US-amerikanische Aufsichtsbehörde
<b>HSA</b>	12-Hydroxystearinsäure
<b>IPM</b>	Isopropylmyristat
<b>JJ</b>	Jojobaöl
<b>MCT</b>	Mittelkettige Triglyceride
<b>MRT</b>	Magnetresonanztomographie
<b>NHS</b>	<i>N</i> -Hydroxysuccinimid
<b>NMP</b>	<i>N</i> -Methylpyrrolidon
<b>NMR</b>	Kernspinresonanz
<b>PBS</b>	Phosphatgepufferte Salzlösung
<b>PCL</b>	Polycaprolacton
<b>PCU</b>	3-Carbamoyl-2,2,5,5-tetramethyl-3-pyrrolin-1-oxyl-Radikal
<b>PEG</b>	Polyethylenglykol, Macrogol

---

<b>pH</b>	Negativer dekadischer Logarithmus der Protonenaktivität
<b>PLA</b>	Polymilchsäure
<b>PLGA</b>	Poly(milchsäure-co-glykolsäure)
<b>rhBMP-2</b>	Rekombinantes humanes knochenmorphogenetisches Protein 2
<b>RNA</b>	Ribonukleinsäure

## B. Literaturverzeichnis

- [1] R. Rudolph, F. Bordusa, Protein-Kompetenznetzwerk-Halle: „tools, targets & therapeutics“ (Gesamtbeschreibung) (2009).
- [2] ProNet T<sup>3</sup> Projekthomepage, Über ProNet-T<sup>3</sup> (<http://www.pronet-t3.de/ueber-pronet-t3>) (04 2013).
- [3] A. Burger, H. Wachter, Hunnius Pharmazeutisches Wörterbuch, 8. Auflage, Walter de Gruyter, Berlin, 1998.
- [4] A. Rutz, Ölige suspensionen als parenterale depotsysteme für rekombinante proteine, Ph.D. thesis, Ludwig-Maximilians-Universität München (2007).
- [5] A. Lochmann, H. Nitzsche, S. von Einem, E. Schwarz, K. Mäder, The influence of covalently linked and free polyethylene glycol on the structural and release properties of rhbmp-2 loaded microspheres, *Journal of Controlled Release* 147 (1) (2010) 92–100.
- [6] A. Lochmann, H. Nitzsche, S. von Einem, E. Schwarz, K. Mäder, rhbmp-2 delivery from scaffolds, microparticles and in situ-forming gels, *Saxon Biotechnology Symposium* (2007) 135.
- [7] A. F. LoBuglio, R. H. Wheeler, J. Trang, A. Haynes, K. Rogers, E. B. Harvey, L. Sun, J. Ghrayeb, M. Khazaeli, Mouse/human chimeric monoclonal antibody in man: kinetics and immune response, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 86 (11) (1989) 4220–4224.
- [8] R. U. Agu, M. I. Ugwoke, M. Armand, R. Kinget, N. Verbeke, The lung as a route for systemic delivery of therapeutic proteins and peptides, *Respiratory research* 2 (4) (2001) 198.
- [9] J. S. Patton, R. M. Platz, (d) routes of delivery: Case studies:(2) pulmonary delivery of peptides and proteins for systemic action, *Advanced drug delivery reviews* 8 (2) (1992) 179–196.
- [10] A. S. Rosenberg, Effects of protein aggregates: an immunologic perspective, *The AAPS Journal* 8 (3) (2006) 501–507.
- [11] S. Frokjaer, D. E. Otzen, Protein drug stability: a formulation challenge, *Nature Reviews Drug Discovery* 4 (4) (2005) 298–306.
- [12] E. Bormann, P. Brunner, M. Dassinger, D. M. Kober, K. Kopp, A. Kuhlmann, M. Löwe, S. Opitz, A. Pflieger, S. Salm, C. Selz, K. Sy, Rote Liste, Rote Liste Service GmbH, 2013.
- [13] ABDA Datenbank DrugBase Online (<http://www.drugbase.de>) (04 2013).
- [14] D. A. Scott, A. M. Fisher, Studies on insulin with protamine, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 58 (1) (1936) 78–92.

- 
- [15] J. J. Abel, Crystalline insulin, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 12 (2) (1926) 132.
- [16] C. R. Harington, D. A. Scott, K. Culhane, H. P. Marks, J. W. Trevan, Observations on insulin: Part i. chemical observations. part ii. physiological assay, *Biochemical Journal* 23 (3) (1929) 384.
- [17] D. A. Scott, Crystalline insulin, *Biochemical Journal* 28 (4) (1934) 1592.
- [18] D. A. Scott, A. M. Fisher, Crystalline insulin, *Biochemical Journal* 29 (5) (1935) 1048.
- [19] D. A. Scott, A. M. Fisher, The effect of zinc salts on the action of insulin, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 55 (2) (1935) 206–221.
- [20] U. Derewenda, Z. Derewenda, G. Dodson, R. Hubbard, F. Korber, Molecular structure of insulin: the insulin monomer and its assembly, *British Medical Bulletin* 45 (1) (1989) 4–18.
- [21] I. Rabinowitch, J. Foster, A. Fowler, A. Corcoran, Clinical experiences with protamine-zinc-insulin and other mixtures of zinc and insulin in diabetes mellitus, *Canadian Medical Association Journal* 35 (3) (1936) 239.
- [22] Lipid implants as drug delivery systems, Informa UK Ltd London, UK, 2008.
- [23] F. Kreye, F. Siepmann, J. Siepmann, Drug release mechanisms of compressed lipid implants, *International Journal of Pharmaceutics* 404 (1) (2011) 27–35.
- [24] A. Hatefi, B. Amsden, Biodegradable injectable in situ forming drug delivery systems, *Journal of Controlled Release* 80 (1) (2002) 9–28.
- [25] Sanofi-Aventis, Fachinformation Profact<sup>®</sup> Depot 6,3 mg 2-Monatsimplantat (09 2012).
- [26] S. Benita, *Microencapsulation: methods and industrial applications*, Vol. 158, Informa Healthcare, 2005.
- [27] N. K. Varde, D. W. Pack, Microspheres for controlled release drug delivery, *Expert Opinion on Biological Therapy* 4 (1) (2004) 35–51.
- [28] K. Mäder, U. Weidenauer (Eds.), *Innovative Arzneiformen*, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, 2010.
- [29] K. H. Bauer, K.-H. Frömring, C. Führer, *Lehrbuch der Pharmazeutischen Technologie*, 8 Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, 2006.
- [30] S. Freiberg, X. Zhu, Polymer microspheres for controlled drug release, *International Journal of Pharmaceutics* 282 (1) (2004) 1–18.
- [31] Y. Mizushima, T. Ikoma, J. Tanaka, K. Hoshi, T. Ishihara, Y. Ogawa, A. Ueno, Injectable porous hydroxyapatite microparticles as a new carrier for protein and lipophilic drugs, *Journal of Controlled Release* 110 (2) (2006) 260–265.

- [32] A. Lochmann, Development and characterization of controlled delivery systems for rhbmp-2, Ph.D. thesis, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (2011).
- [33] R. L. Dunn, J. P. English, D. R. Cowsar, D. P. Vanderbilt, Biodegradable in-situ forming implants and methods of producing the same, uS Patent 4,938,763 (Jul. 3 1990).
- [34] S. Kempe, K. Mäder, In situ forming implants - an attractive formulation principle for parenteral depot formulations., *Journal of Controlled Release* 161 (2) (2012) 668–679.
- [35] M. Dittgen, S. Fricke, H. Gerecke, I.-P. Möller, C. Völkel, et al., Injection implant, wO Patent 1,998,030,245 (Jul. 17 1998).
- [36] S. Kempe, H. Metz, P. G. C. Pereira, K. Mäder, Non-invasive in vivo evaluation of in situ forming plga implants by benchtop magnetic resonance imaging (bt-mri) and epr spectroscopy., *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 74 (1) (2010) 102–108.
- [37] W. J. Lambert, K. D. Peck, Development of an in situ forming biodegradable poly-lactide-coglycolide system for the controlled release of proteins, *Journal of Controlled Release* 33 (1) (1995) 189–195.
- [38] K. J. Brodbeck, S. Pushpala, A. J. McHugh, Sustained release of human growth hormone from plga solution depots, *Pharmaceutical Research* 16 (12) (1999) 1825–1829.
- [39] M. Kumar, R. Muzzarelli, C. Muzzarelli, H. Sashiwa, A. Domb, et al., Chitosan chemistry and pharmaceutical perspectives, *Chemical Reviews-Columbus* 104 (12) (2004) 6017–6084.
- [40] J. Berger, M. Reist, J. Mayer, O. Felt, N. Peppas, R. Gurny, Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 57 (1) (2004) 19–34.
- [41] J. Berger, M. Reist, J. Mayer, O. Felt, R. Gurny, Structure and interactions in chitosan hydrogels formed by complexation or aggregation for biomedical applications, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 57 (1) (2004) 35–52.
- [42] E. Ruel-Gariepy, J.-C. Leroux, In situ-forming hydrogels—review of temperature-sensitive systems, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 58 (2) (2004) 409–426.
- [43] J. Rassing, D. Attwood, Ultrasonic velocity and light-scattering studies on the polyoxyethylene–polyoxypropylene copolymer pluronic f127 in aqueous solution, *International Journal of Pharmaceutics* 13 (1) (1982) 47–55.
- [44] Z. Zhou, B. Chu, Anomalous association behavior of an ethylene oxide/propylene oxide aba block copolymer in water, *Macromolecules* 20 (12) (1987) 3089–3091.

- [45] G. Wanka, H. Hoffmann, W. Ulbricht, The aggregation behavior of poly-(oxyethylene)-poly-(oxypropylene)-poly-(oxyethylene)-block-copolymers in aqueous solution, *Colloid and Polymer Science* 268 (2) (1990) 101–117.
- [46] W. Brown, K. Schillen, S. Hvidt, Triblock copolymers in aqueous solution studied by static and dynamic light scattering and oscillatory shear measurements: influence of relative block sizes, *The Journal of Physical Chemistry* 96 (14) (1992) 6038–6044.
- [47] B. Jeong, S. W. Kim, Y. H. Bae, Thermosensitive sol–gel reversible hydrogels, *Advanced drug delivery reviews* 54 (1) (2002) 37–51.
- [48] B. Jeong, Y. Choi, Y. Bae, G. Zentner, S. Kim, New biodegradable polymers for injectable drug delivery systems, *Journal of Controlled Release* 62 (1) (1999) 109–114.
- [49] B. Jeong, Y. H. Bae, S. W. Kim, Drug release from biodegradable injectable thermosensitive hydrogel of peg–plga–peg triblock copolymers, *Journal of Controlled Release* 63 (1) (2000) 155–163.
- [50] A. Chenite, C. Chaput, D. Wang, C. Combes, M. Buschmann, C. Hoemann, J. Leroux, B. Atkinson, F. Binette, A. Selmani, Novel injectable neutral solutions of chitosan form biodegradable gels in situ, *Biomaterials* 21 (21) (2000) 2155–2161.
- [51] S. Hirano, H. Tsuchida, N. Nagao, N-acetylation in chitosan and the rate of its enzymic hydrolysis, *Biomaterials* 10 (8) (1989) 574–576.
- [52] K. Sakai, R. Katsumi, A. Isobe, F. Nanjo, Purification and hydrolytic action of a chitosanase from nocardia orientalis, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology* 1079 (1) (1991) 65–72.
- [53] S. Kempe, H. Metz, M. Bastrop, A. Hvilstom, R. V. Contri, K. Mäder, Characterization of thermosensitive chitosan-based hydrogels by rheology and electron paramagnetic resonance spectroscopy., *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 68 (1) (2008) 26–33.
- [54] P. Alonso, L. Perula, L. Rioja, Pain-temperature relation in the application of local anaesthesia, *British journal of plastic surgery* 46 (1) (1993) 76–78.
- [55] J. Heller, J. Barr, S. Ng, H. Shen, K. Schwach-Abdellaoui, S. Emmahl, A. Rothen-Weinhold, R. Gurny, Poly (ortho esters)–their development and some recent applications, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 50 (1) (2000) 121–128.
- [56] S. Einmahl, K. Schwach-Abdellaoui, J. Heller, R. Gurny, Poly (ortho esters): recent developments for biomedical applications, *CHIMIA International Journal for Chemistry* 55 (3) (2001) 218–222.
- [57] S. Einmahl, S. Capancioni, K. Schwach-Abdellaoui, M. Moeller, F. Behar-Cohen, R. Gurny, Therapeutic applications of viscous and injectable poly (ortho esters), *Advanced drug delivery reviews* 53 (1) (2001) 45–73.

- [58] J. B. Leach, C. E. Schmidt, Characterization of protein release from photocross-linkable hyaluronic acid-polyethylene glycol hydrogel tissue engineering scaffolds, *Biomaterials* 26 (2) (2005) 125–135.
- [59] L. Pescosolido, Interpenetrating polymer network hydrogels based on polysaccharides for biomedical applications, Ph.D. thesis, Utrecht University (2011).
- [60] J. Elisseeff, K. Anseth, D. Sims, W. McIntosh, M. Randolph, R. Langer, Transdermal photopolymerization for minimally invasive implantation, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96 (6) (1999) 3104–3107.
- [61] R. Weissleder, A clearer vision for in vivo imaging, *Nature Biotechnology* 19 (4) (2001) 316–317.
- [62] K. T. Nguyen, J. L. West, Photopolymerizable hydrogels for tissue engineering applications, *Biomaterials* 23 (22) (2002) 4307–4314.
- [63] S. Klug, H.-J. Merker, R. Jäckh, Effects of ethylene glycol and metabolites on in vitro development of rat embryos during organogenesis, *Toxicology in vitro* 15 (6) (2001) 635–642.
- [64] M. Hamdine, M.-C. Heuzey, A. Bégin, Viscoelastic properties of phosphoric and oxalic acid-based chitosan hydrogels, *Rheologica acta* 45 (5) (2006) 659–675.
- [65] H.-W. Sung, R.-N. Huang, L. L. Huang, C.-C. Tsai, In vitro evaluation of cytotoxicity of a naturally occurring cross-linking reagent for biological tissue fixation, *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* 10 (1) (1999) 63–78.
- [66] F.-L. Mi, Y.-C. Tan, H.-F. Liang, H.-W. Sung, In vivo biocompatibility and degradability of a novel injectable-chitosan-based implant, *Biomaterials* 23 (1) (2002) 181–191.
- [67] M. Nickerson, J. Patel, D. Heyd, D. Rousseau, A. Paulson, Kinetic and mechanistic considerations in the gelation of genipin-crosslinked gelatin, *International Journal of Biological Macromolecules* 39 (4) (2006) 298–302.
- [68] A. H. Krauland, V. M. Leitner, A. Bernkop-Schnürch, Improvement in the in situ gelling properties of deacetylated gellan gum by the immobilization of thiol groups, *Journal of Pharmaceutical Sciences* 92 (6) (2003) 1234–1241.
- [69] A. Bernkop-Schnürch, M. Hornof, T. Zoidl, Thiolated polymers–thiomers: synthesis and in vitro evaluation of chitosan-2-iminothiolane conjugates, *International Journal of Pharmaceutics* 260 (2) (2003) 229–237.
- [70] A. Bernkop-Schnürch, A. H. Krauland, V. M. Leitner, T. Palmberger, Thiomers: potential excipients for non-invasive peptide delivery systems, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 58 (2) (2004) 253–263.
- [71] X. Z. Shu, Y. Liu, F. Palumbo, G. D. Prestwich, Disulfide-crosslinked hyaluronan-gelatin hydrogel films: a covalent mimic of the extracellular matrix for in vitro cell growth, *Biomaterials* 24 (21) (2003) 3825–3834.

- [72] K. Kafedjiiski, R. K. Jetti, F. Föger, H. Hoyer, M. Werle, M. Hoffer, A. Bernkop-Schnürch, Synthesis and *in vitro* evaluation of thiolated hyaluronic acid for mucoadhesive drug delivery, *International Journal of Pharmaceutics* 343 (1) (2007) 48–58.
- [73] B. Qiu, S. Stefanos, J. Ma, A. Lalloo, B. A. Perry, M. J. Leibowitz, P. J. Sinko, S. Stein, A hydrogel prepared by in situ cross-linking of a thiol-containing poly(ethylene glycol)-based copolymer: a new biomaterial for protein drug delivery, *Biomaterials* 24 (1) (2003) 11–18.
- [74] J. Drobnik, Hyaluronan in drug delivery, *Advanced drug delivery reviews* 7 (2) (1991) 295–308.
- [75] A. Gutowska, B. Jeong, M. Jasionowski, Injectable gels for tissue engineering, *The Anatomical Record* 263 (4) (2001) 342–349.
- [76] S. Cohen, E. Lobel, A. Trevigoda, Y. Peled, A novel in situ-forming ophthalmic drug delivery system from alginates undergoing gelation in the eye, *Journal of Controlled Release* 44 (2) (1997) 201–208.
- [77] B. Balakrishnan, A. Jayakrishnan, Self-cross-linking biopolymers as injectable in situ forming biodegradable scaffolds, *Biomaterials* 26 (18) (2005) 3941–3951.
- [78] L. Rusu-Balaita, J. Desbrieres, M. Rinaudo, Formation of a biocompatible polyelectrolyte complex: chitosan-hyaluronan complex stability, *Polymer Bulletin* 50 (1-2) (2003) 91–98.
- [79] J. H. Hamman, Chitosan based polyelectrolyte complexes as potential carrier materials in drug delivery systems, *Marine drugs* 8 (4) (2010) 1305–1322.
- [80] F. Plourde, A. Motulsky, A.-C. Couffin-Hoarau, D. Hoarau, H. Ong, J.-C. Leroux, First report on the efficacy of l-alanine-based in situ-forming implants for the long-term parenteral delivery of drugs, *Journal of Controlled Release* 108 (2) (2005) 433–441.
- [81] A. G. Marangoni, Organogels: an alternative edible oil-structuring method, *Journal of the American Oil Chemists' Society* 89 (5) (2012) 749–780.
- [82] A. Vintiloiu, J.-C. Leroux, Organogels and their use in drug delivery—a review, *Journal of Controlled Release* 125 (3) (2008) 179–192.
- [83] A. Vintiloiu, M. Lafleur, G. Bastiat, J.-C. Leroux, In situ-forming oleogel implant for rivastigmine delivery, *Pharmaceutical Research* 25 (4) (2008) 845–852.
- [84] Z.-H. Gao, A. J. Shukla, J. R. Johnson, W. R. Crowley, Controlled release of a contraceptive steroid from biodegradable and injectable gel formulations: in vitro evaluation, *Pharmaceutical Research* 12 (6) (1995) 857–863.
- [85] Z.-H. Gao, W. R. Crowley, A. J. Shukla, J. R. Johnson, J. F. Reger, Controlled release of contraceptive steroids from biodegradable and injectable gel formulations: in vivo evaluation, *Pharmaceutical Research* 12 (6) (1995) 864–868.

- [86] A. R. Ahmed, A. Dashevsky, R. Bodmeier, Drug release from and sterilization of in situ cubic phase forming monoglyceride drug delivery systems, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 75 (3) (2010) 375–380.
- [87] A. J. Gravelle, S. Barbut, A. G. Marangoni, Ethylcellulose oleogels: Manufacturing considerations and effects of oil oxidation, *Food Research International* 48 (2) (2012) 578–583.
- [88] L. Lukyanova, R. Castangia, S. Franceschi-Messant, E. Perez, I. Rico-Lattes, Soft microporous green materials from natural soybean oil., *ChemSusChem* 1 (6) (2008) 514–518.
- [89] Y. Han, D. Shchukin, J. Yang, C. R. Simon, H. Fuchs, H. Möhwald, Biocompatible protein nanocontainers for controlled drugs release., *ACS Nano* 4 (5) (2010) 2838–2844.
- [90] M. Burkhardt, S. Kinzel, M. Gradzielski, Macroscopic properties and microstructure of hsa based organogels: sensitivity to polar additives., *Journal of Colloid and Interface Science* 331 (2) (2009) 514–521.
- [91] D. A. S. Grahame, C. Olauson, R. S. H. Lam, T. Pedersen, F. Borondics, S. Abraham, R. G. Weiss, M. A. Rogers, Influence of chirality on the modes of self-assembly of 12-hydroxystearic acid in molecular gels of mineral oil., *Soft Matter* 7 (16) (2011) 7359–7365.
- [92] M. A. Rogers, V. Kontogiorgos, Temperature dependence of relaxation spectra for self-assembled fibrillar networks of 12-hydroxystearic acid in canola oil organogels, *Food Biophysics* 7 (2) (2012) 132–137.
- [93] Deutsches Arzneibuch (2011).
- [94] W. Tian, S. Schulze, M. Brandl, G. Winter, Vesicular phospholipid gel-based depot formulations for pharmaceutical proteins: Development and in vitro evaluation, *Journal of Controlled Release* 142 (3) (2010) 319–325.
- [95] Datenblatt Cithrol DPHS, Croda (2009).
- [96] R. Lavecchia, A. Zuorro, Effect of trehalose on thermal stability of bovine serum albumin, *Chemistry Letters* 39 (1) (2010) 38–39.
- [97] J. Strancar, T. Koklic, Z. Arsov, B. Filipic, D. Stopar, M. A. Hemminga, Spin label epr-based characterization of biosystem complexity., *Journal of Chemical Information and Modeling* 45 (2) (2005) 394–406.
- [98] W. Rungseevijitprapa, R. Bodmeier, Injectability of biodegradable in situ forming microparticle systems (ism), *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 36 (4) (2009) 524–531.
- [99] B. Braun Melsungen, Präzision in der Injektion, Sicherheit in der Applikation: Spritzen, Kanülen & Entsorgung im Überblick.
- [100] Römpp Online (roempp.com) (2012).

- [101] S. Kempe, H. Metz, K. Mäder, Do in situ forming plg/nmp implants behave similar in vitro and in vivo? a non-invasive and quantitative epr investigation on the mechanisms of the implant formation process., *Journal of Controlled Release* 130 (3) (2008) 220–225.
- [102] C. Washington, Evaluation of non-sink dialysis methods for the measurement of drug release from colloids: effects of drug partition, *International Journal of Pharmaceutics* 56 (1) (1989) 71–74.
- [103] A. Noack, J. Oidtmann, J. Kutza, K. Mäder, In vitro digestion of curcuminoid-loaded lipid nanoparticles, *Journal of Nanoparticle Research* 14 (9) (2012) 1–19.
- [104] A. Schädlich, C. Rose, J. Kuntsche, H. Caysa, T. Müller, A. Göpferich, K. Mäder, How stealthy are peg-pla nanoparticles? an nir in vivo study combined with detailed size measurements, *Pharmaceutical Research* 28 (8) (2011) 1995–2007.
- [105] S. Hoffmann, L. Vystrčilová, K. Ulbrich, T. Etrych, H. Caysa, T. Müller, K. Mäder, Dual fluorescent hpma copolymers for passive tumor targeting with ph-sensitive drug release: Synthesis and characterization of distribution and tumor accumulation in mice by noninvasive multispectral optical imaging, *Biomacromolecules* 13 (3) (2012) 652–663.
- [106] M. Schwab, G. Sax, S. Schulze, G. Winter, Studies on the lipase induced degradation of lipid based drug delivery systems., *Journal of Controlled Release* 140 (1) (2009) 27–33.
- [107] S. Krist, *Lexikon der pflanzlichen Fette und Öle*, Springer-Verlag, Wien, 2008.
- [108] *Europäisches Arzneibuch*, 7. Ausgabe (2011).
- [109] M. T. S. Iain Johnson, *Molecular Probes Handbook, A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies*, 11th Edition, Invitrogen (2011).
- [110] U. Massing, S. Cicko, V. Ziroli, Dual asymmetric centrifugation (dac)—a new technique for liposome preparation, *Journal of Controlled Release* 125 (1) (2008) 16–24.
- [111] P. Furrer, J. Mayer, R. Gurny, Review confocal microscopy as a tool for the investigation of the anterior part of the eye, *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics* 13 (6) (1997) 559–578.
- [112] F. Rashid, R. W. Horobin, M. A. Williams, Predicting the behaviour and selectivity of fluorescent probes for lysosomes and related structures by means of structure-activity models., *The Histochemical Journal* 23 (10) (1991) 450–459.
- [113] Invitrogen, *Lipophilic Tracers - DiI, DiO, DiD, DiR* (2008).
- [114] Invitrogen, *Sicherheitsdatenblatt DiI* (2012).
- [115] C. Kutza, H. Metz, J. Kutza, F. Syrowatka, K. Mäder, Toward a detailed characterization of oil adsorbates as „solid liquids“, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 84 (1) (2013) 172–182.

- 
- [116] H. Beyer, *Theorie und Praxis des Phasenkontrastverfahrens*, Akademische Verlagsgesellschaft Geest & Portig K.-G., 1965.
- [117] J. Yao, K. Tanteeratarm, L. Wei, Effects of maturation and storage on solubility, emulsion stability and gelation properties of isolated soy proteins, *Journal of the American Oil Chemists' Society* 67 (12) (1990) 974–979.
- [118] F. Cilurzo, F. Selmin, P. Minghetti, M. Adami, E. Bertoni, S. Lauria, L. Montanari, Injectability evaluation: an open issue, *AAPS PharmSciTech* 12 (2) (2011) 604–609.
- [119] Y. Chien, P. Przybyszewski, E. Shami, Syringeability of nonaqueous parenteral formulations—development and evaluation of a testing apparatus, *PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology* 35 (6) (1981) 281–284.
- [120] A. Allahham, D. Mainwaring, P. Stewart, J. Marriott, Development and application of a micro-capillary rheometer for in-vitro evaluation of parenteral injectability, *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 56 (6) (2004) 709–716.
- [121] Invitrogen, *Amine-Reactive Probe Labeling Protocol* (2008).
- [122] F. Eisenächer, A. Schädlich, K. Mäder, Monitoring of internal pH gradients within multi-layer tablets by optical methods and epr imaging, *International Journal of Pharmaceutics* 417 (1) (2011) 204–215.
- [123] CRi, *Maestro 2.10 User's Manual* (2009).
- [124] A. Schädlich, H. Caysa, T. Müller, F. Tenambergen, C. Rose, A. Göpferich, J. Kuntsche, K. Mäder, Tumor accumulation of nir fluorescent peg-pla nanoparticles: Impact of particle size and human xenograft tumor model, *ACS nano* 5 (11) (2011) 8710–8720.

# C. Publikationsliste

## Artikel

- C. Kutza, H. Metz, J. Kutza, F. Syrowatka, K. Mäder, Toward a detailed characterization of oil adsorbates as „solid liquids“, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 84 (1) (2013) 172–182.
- A. Noack, J. Oidtmann, J. Kutza, K. Mäder, In vitro digestion of curcuminoid-loaded lipid nanoparticles, *Journal of Nanoparticle Research* 14 (9) (2012) 1–19.

## Patente

- K. Mäder, J. Kutza, M. Windorf, Injizierbare Depotformulierungen zur kontrollierten Wirkstofffreisetzung, DE Patent (eingereicht, AZ 10 2013 018 193.3) (2013)

## Posterpräsentationen

- J. Kutza, K. Mäder, Development of a novel model for protein release studies on hydrogels for subcutaneous application, CRS Germany Local Chapter, Würzburg (2012).
- J. Kutza, K. Mäder, Development of a novel model for protein release studies on hydrogels for subcutaneous application, 8<sup>th</sup> World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, Istanbul (2012).
- J. Kutza, A. Noack, S. Hoffmann, K. Mäder, A new model system for the investigation of in vitro drug release from hydrophilic polymer-based gels, nanoparticles and water soluble polymers by multispectral fluorescence imaging, 3<sup>rd</sup> European Summerschool in Nanomedicine, Lutherstadt Wittenberg (2011).
- J. Kutza, A. Schädlich, K. Mäder, Noninvasive in vivo investigation of an injectable subcutaneous implant of hyaluronan modified with hexadecylamine by optical imaging, 8<sup>th</sup> International Symposium on Polymer Therapeutics: From Laboratory to Clinical Practice, Valencia (2010).

## Vorträge

- J. Kutza, Polymergele zur kontrollierten Freisetzung von Proteinen, 2. Gesamtarbeitsbesprechung des ProNet-T<sup>3</sup>-Verbundprojektes (2010)
- J. Kutza, Methods for non-invasive *in vivo* Characterization of Protein Delivery Systems, 4. Gesamtarbeitsbesprechung des ProNet-T<sup>3</sup>-Verbundprojektes (2011)
- J. Kutza, Retardierungsmechanismen für Proteine in subkutanen Depotarzneiformen, 5. Gesamtarbeitsbesprechung des ProNet-T<sup>3</sup>-Verbundprojektes (2012)

# D. Danksagung

Ich danke folgenden Personen und Institutionen für die Unterstützung bei der Anfertigung dieser Doktorarbeit:

- Herrn Prof. Dr. rer. nat. habil. Karsten Mäder für die Überlassung des interessanten Themas
- Den aktuellen und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe „Pharmazeutische Technologie“ am Institut für Pharmazie in Halle, insbesondere:
  - Frau Dr. Sabine Kempe für die Unterstützung bei den ESR-Versuchen und die zahlreichen wissenschaftlichen Diskussionen
  - Herrn Dr. Metz für die Bestimmung des Korrekturfaktors der Öle am ESR X-Band
  - Frau Ute Mentzel für die Hilfe bei der täglichen Laborarbeit und die Messungen mit der Asymmetrische Fluss-Feldflussfraktionierung
  - Frau Kerstin Schwarz für die differenzialkalorimetrischen Messungen
  - Anteneh Belete Shibeshi, Johannes Stelzner, Verena Weiss und Stefan Hoffmann für die gute Atmosphäre im Büro
  - Meiner Frau Claudia Kutza
- Herrn Dieter Reese für die Zusammenarbeit bei der Entwicklung des Modells und dessen Herstellung
- Herrn Dr. rer. nat. Dr. agr. Gerd Hause für die Idee und die Hilfe bei der Phasenkontrastmikroskopie
- Frau Prof. Dr. rer. nat. habil. Michaela Schulz-Siegmund, Herrn Dr. rer. nat. Michael Hacker und Herrn Dipl-Pharm. Rudi Hötzel für die Unterstützung bei den rheologischen Untersuchungen
- Herrn Dr. rer. nat. habil. Thomas Groth für die Möglichkeit das konfokale Laser-Scanning-Mikroskop zu benutzen
- Frau Constanze Gottschalk und Frau Martina Hennicke für die Pflege der Versuchstier und die Hilfestellungen bei den *In-vivo*-Versuchen
- Dem Bundesministerium für Bildung und Forschung für die finanzielle Unterstützung
- Meiner Familie

# E. Lebenslauf

Name	Johannes Kutza
Adresse	Zwingerstr. 16 06110 Halle/Saale
Geburtsdatum	13. November 1984
Geburtsort	Eisenach
2003	Abitur, Philipp-Melanchthon-Gymnasium, Gerstungen
2003 – 2007	Studium der Pharmazie, MLU Halle-Wittenberg
10/2007 – 04/2008	Diplomand, AG Prof. Dr. K. Mäder, Pharm. Technologie, Institut für Pharmazie der MLU Halle-Wittenberg Diplomthema: Optimierung der Parameter und Beurteilung des Potentials von zwei- und dreidimensionaler ESR-Tomographie für Problemstellungen der Pharmazeutischen Technologie
04/2008 – 10/2008	Pharmaziepraktikant, Apotheke im HEP, Halle/Saale
11/2008	Abschluss der Pharmazeutischen Prüfung
01. Dezember 2008	Approbation als Apotheker
12/2008 – 02/2009	Angestellter Apotheker, Storchen-Apotheke, Gerstungen
03/2009 – 11/2012	Wissenschaftlicher Mitarbeiter, AG Prof. Dr. K. Mäder, Pharm. Technologie, Institut für Pharmazie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Seit 12/2012	Angestellter Apotheker, Storchen-Apotheke, Gerstungen

Halle/Saale, den 17. Januar 2014

---

Johannes Kutza

## F. Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Darüber hinaus erkläre ich, dass ich noch keine vergeblichen Promotionsversuche unternommen habe und dass diese Dissertation weder in der gegenwärtigen noch in einer anderen Fassung bereits einer anderen Fakultät vorgelegen hat.

Halle/Saale, den 17. Januar 2014

---

Johannes Kutza