

Untersuchungen zur Optimierung der dermalen Peptidpenetration

D i s s e r t a t i o n

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

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I
– Biowissenschaften –

der Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg,

Vorgelegt von

Frau Elfi Sommer

geboren am 5. März 1984 in Magdeburg

Gutachter:

1. Prof. Dr. Dr. h. c. Reinhard H. H. Neubert
2. Prof. Dr. Johannes Wohlrab
3. Prof. Dr. Dr.-Ing. Jürgen Lademann

Halle (Saale), November 2017

Tag der öffentlichen Verteidigung in Halle (Saale): 23.04.2018

I. Inhaltsverzeichnis

I. Inhaltsverzeichnis	ii
II. Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen	v
III. Abbildungsverzeichnis	vii
IV. Tabellenverzeichnis	xiii
1. Einleitung und Zielsetzung	1
2. Theoretische Grundlagen	3
2.1. Die menschliche Haut als Applikationsort für Peptide	3
2.1.1. Aufbau und Funktionen.....	3
2.1.2. Grundlagen der dermalen Wirkstoffaufnahme.....	4
2.1.3. Strategien zur Optimierung der dermalen Peptidpenetration.....	6
2.2. Mikroemulsionen.....	7
2.2.1. Definition und Eigenschaften.....	7
2.2.2. Mikroemulsionen zur dermalen Applikation.....	8
2.2.3. Mikroemulsionen als Vehikel für Peptide	9
2.3. Peptide als Wirkstoffe.....	10
2.3.1. Dermale Anwendung.....	10
2.3.2. Peptide in der Kosmetik.....	11
3. Eigenschaften der untersuchten Modellpeptide	12
3.1. Anwendungsgebiete und Zielkompartimente.....	12
3.2. Physikochemische Eigenschaften der Peptide.....	14
3.2.1. Isoelektrischer Punkt	14
3.2.2. Löslichkeit	15
3.2.3. Kalkulierte Parameter mit Einfluss auf das Penetrationsverhalten	16
3.3. Extraktionsverfahren	18
3.4. Stabilität.....	20
3.4.1. Stabilität von GEKG, Palmitoyl-GEKG, PKEK und Palmitoyl-PKEK.....	21
3.4.2. Stabilität von LPA, LPBG und LPT	23
4. Mikroemulsionen zur Applikation von Peptiden auf die Haut	27
4.1. Entwicklung der Mikroemulsionen	27
4.2. Phasendiagramme	29
4.3. Physikochemische Charakterisierung	31
4.3.1. Polarisationsmikroskopie	31
4.3.2. Rheologische Eigenschaften	31
4.3.3. Konduktivitätsmessungen	34
4.3.4. Dynamische Differenzkalorimetrie	37

4.3.5. Dynamische Lichtstreuung	40
4.3.6. pH-Wert.....	42
4.4. Einarbeitung der Peptide in die Mikroemulsionen.....	43
4.5. Bewertung der Verträglichkeit der Mikroemulsionen	43
4.5.1. Toxikologische Eigenschaften der Bestandteile der Mikroemulsionen	43
4.5.2 HET-CAM	46
5. Penetrationsuntersuchungen an peptidhaltigen Formulierungen	48
5.1. Untersuchung der Penetration aus Standardvehikeln	51
5.1.1. GEKG.....	51
5.1.2. PKEK.....	53
5.1.3. LPA, LPBG und LPT.....	56
5.2. Optimierung der Penetration durch chemische Modifizierung der Peptide	59
5.2.1. Palmitoyl-GEKG.....	59
5.2.2. Palmitoyl-PKEK.....	62
5.3. Optimierung der Penetration durch den Einsatz von Mikroemulsionen	64
5.3.1. GEKG	64
5.3.2. PKEK	67
5.3.3. LPA, LPBG und LPT.....	70
5.4. Optimierung der Penetration durch den Einsatz hydrophiler Enhancer	72
5.4.1. GEKG.....	74
5.4.1.1. Screening mit Enhancer-haltigen Formulierungen (n=1)	74
5.4.1.2. Screening mit Enhancer-haltigen Formulierungen (n=3)	79
5.4.2. PKEK	83
5.4.2.1. Screening mit Enhancer-haltigen Formulierungen (n=1)	83
5.4.2.2. Screening mit Enhancer-haltigen Formulierungen (n=3)	86
6. Zusammenfassung und Ausblick	89
7. Experimenteller Teil.....	92
7.1. Analytische Methoden zur Quantifizierung der Peptide	92
7.1.1. Chromatographische Methoden (LC-MS und HPLC-UV).....	92
7.1.2. Flüssigkeitsszintillationsmessung.....	94
7.1.3. Kapillarelektrophorese.....	95
7.2. Herstellung der Formulierungen	95
7.2.1. Mikroemulsionen	95
7.2.2. Cremes	96
7.3. Charakterisierung der Peptide.....	96
7.3.1. Experimentelle Bestimmung des isoelektrischen Punktes.....	96
7.3.2. Bestimmung der Sättigungslöslichkeit.....	97
7.3.3. Computergestützte Ermittlung physikochemischer Parameter.....	97
7.3.4. Extraktionsversuche	97

7.3.5. Untersuchung der Peptidstabilität in Gegenwart von Humanhautthomogenat	98
7.4. Charakterisierung der Mikroemulsionen.....	98
7.4.1. pH-Wert Bestimmung	98
7.4.2. Erstellung der Phasendiagramme	99
7.4.3. Polarisationsmikroskopie	99
7.4.4. Rheologische Untersuchungen.....	99
7.4.5. Konduktivitätsmessungen	99
7.4.6. Dynamische Differenzkalorimetrie	99
7.4.7. Dynamische Lichtstreuung	100
7.4.8. HET-CAM	100
7.5. <i>ex vivo</i> Penetrationsuntersuchungen	101
7.5.1. Penetrationsuntersuchungen mit radioaktiv markiertem Peptidmaterial	102
7.5.2. Penetrationsuntersuchungen ohne radioaktiv markiertes Peptidmaterial	103
7.6. Auswertung und Statistik.....	104
7.7. Geräte und Hilfsmittel.....	105
7.7.1. Laborgeräte	105
7.7.2. Verbrauchsmaterialien	106
7.7.3. Biologisches Material	107
7.8. Chemikalien.....	107
8. Literatur	109
9. Anhang.....	131
Anhang A: Eigenschaften der Mikroemulsionsbestandteile.....	131
Anhang B: Zusammensetzung der Mikroemulsionen für die physikochemische Charakterisierung	134
Anhang C: HET-CAM-Ergebnisse	135
Anhang D: Übersicht über das verwendete radioaktiv markierte Material	136
Anhang E: Zusammensetzung der O/W-Emulsionen	137
Anhang F: Übersicht über die Penetrationsdaten	141
10. Publikationsliste.....	156
11. Danksagung	158
12. Lebenslauf.....	160
13. Eidesstattliche Erklärung	161

II. Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

ACN	Acetonitril
Aib	α -Aminoisobuttersäure, α -Methylalanin
BC	Basiscreme DAC
BuG	Butylenglykol
¹⁴ C	Radiokohlenstoff
CAM	Chorion Allantois Membran
CAS-Nr.	Registriernummer des Chemical Abstract Service
CE	Kapillarelektrophorese
DAC	Deutscher Arzneimittel-Codex
DAD	Diodenarray-Detektor
DLS	Dynamische Lichtstreuung
DMSO	Dimethylsulfoxid
ESI	Elektrospray-Ionisation
EZM	Extrazelluläre Matrix
FA	Ameisensäure
GEKG	Einbuchstabencode des Peptids Glycyl-L- α -Glutamyl-L-Lysyl-Glycin
³ H	Tritium
HaCaT	humane Keratinozyten Zelllinie
HCB	Hydrocortisonbutyrat
HET-CAM	Hühner-Ei-Test an der Chorion-Allantois-Membran
HHH	Humanhauthomogenat
HILIC	hydrophile Interaktionschromatographie
HLB	beschreibt die Hydrophilie bzw. Lipophilie von Tensiden (engl.: <i>hydrophilic-lipophilic balance</i>)
HPLC-UV	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie mit UV-Detektion
ICCVAM	Koordinierungsausschuss für die Validierung alternativer Methoden (engl.: <i>Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods</i>)
i.d.	Innendurchmesser
IEP	Isoelektrischer Punkt
INCI	Internationale Nomenklatur für kosmetische Stoffe
IPM	Isopropylmyristat
IPP	Isopropylpalmitat
IS	Irritationsscore
LC-MS	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung
LD ₅₀	mittlere Letaldosis
LOD	Nachweisgrenze
LOQ	Bestimmungsgrenze
LPA	Peptid: L-Lysyl-L-Prolyl- α -Aminoisobuttersäure
LPBG	Peptid: L-Lysyl-L-Prolyl- <i>tert</i> -Butylglycin

II. Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

LPT	Peptid: Dimethylsilyl-D-Prolyl-N-Methylthreonin
ME	Mikroemulsion
ME1	Mikroemulsion bestehend aus Polyglyceryl-4-laurat, Sorbitanmonooleat (2:1), Wasser, 1,3-Butylenglykol (1:1) und Isopropylpalmitat
ME2	Mikroemulsion bestehend aus Polyglyceryl-3-oleat, Polyglyceryl-3-caprat (2:3), Wasser, 1,2-Pentylenglykol (2:1) und Isopropylpalmitat
MeOH	Methanol
MMS	Mometasonfuroat
MoS	Sicherheitsspanne (engl.: <i>Margin of Safety</i>)
MW	Mittelwert
m/z	Masse-Ladungs-Verhältnis
n	Anzahl der Messwerte
NOAEL	höchste Dosis bei der keine toxischen Befunde beobachtet werden (engl.: <i>No observed adverse effect level</i>)
O/W	Öl in Wasser
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
Pal-GEKG	N-terminal palmitoyliertes GEKG
Pal-PKEK	N-terminal palmitoyliertes PKEK
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PeG	Pentylenglykol
PEG	Polyethylenglykol
Ph. Eur.	Europäisches Arzneibuch
PGFE	Polyglycerolfettsäureester
PKEK	Einbuchstabencode für das Peptid L-Prolyl-L-Lysyl-L- α -Glutamyl-L-Lysin
POPOP	1,4-bis-2-(5-Phenyloxazolyl)-benzen
PPO	2,5-Diphenyloxazol
prä-ME1	Mikroemulsion bestehend aus Polyglyceryl-4-laurat, Sorbitanmonooleat (2:1), Wasser und Isopropylmyristat
PrG	Propylenglykol
PSA	polare Oberfläche
RT	Retentionszeit
SC	Stratum corneum
SCCS	Wissenschaftlicher Ausschuss für Verbrauchersicherheit
SD	absolute Standardabweichung
SED	Systemische Expositionsdosis
SIM	Registrierung vorgewählter Massen in der Massenspektrometrie
S/N	Signal-Rausch-Verhältnis
VK	Variationskoeffizient
vs.	(lat.: <i>versus</i>) gegen im Sinne von gegenüber gestellt
WFR	Wiederfindungsrate
W/O	Wasser in Öl

III. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aufbau der Haut.....	3
Abbildung 2: Verschiedene Wege der Wirkstoffaufnahme durch die Haut, modifiziert nach Barry und Neubert et al. [6, 13]	4
Abbildung 3: Strategien zur Optimierung der dermalen und transdermalen Verfügbarkeit von Peptiden.....	6
Abbildung 4: Mögliche Strukturen in ME; A: Tröpfchen in einer W/O-ME, B: bikontinuierliche Strukturen, C: Tröpfchen in einer O/W-ME (O=Öl, W=Wasser) [109]	8
Abbildung 5: Einteilung kosmetisch verwendeter Peptide nach ihrem Wirkmechanismus...	11
Abbildung 6: Strukturformeln der Tetrapeptide GEKG und PKEK, sowie den N-terminal palmitoylierten Peptiden Pal-GEKG und Pal-PKEK.....	12
Abbildung 7: Strukturformeln der Tripeptide LPA, LPBG und LPT	12
Abbildung 8: Stabilität von GEKG in wässriger Lösung mit und ohne Gegenwart von HHH und von Pal-GEKG in Gegenwart von HHH; n=3, MW ± SD, *p < 0,01, #p < 0,05, ¹ GEKG: HHH vs. Lösung, ² GEKG in HHH vs. Pal-GEKG in HHH	21
Abbildung 9: Stabilität von PKEK in wässriger Lösung mit und ohne Gegenwart von HHH und von Pal-PKEK in Gegenwart von HHH; n=3, MW ± SD, *p < 0,01, #p < 0,05, ¹ PKEK: HHH vs. Lösung, ² PKEK in HHH vs. Pal-PKEK in HHH.....	21
Abbildung 10: Stabilität von LPA, LPBG und LPT in wässriger Lösung in Gegenwart von HHH ohne und mit Zusatz von Natriumazid, sowie in wässriger Lösung ohne HHH bei 32 °C und 8 °C; n=3, MW ± SD, *p < 0,01 und #p < 0,05, ¹ HHH vs. HHH+Na-azid, ² HHH vs. Wasser 32 °C, ³ HHH vs. Wasser 8 °C	23
Abbildung 11: Mögliche Abbaureaktion von LPA und LPBG zum Diketopiperazin.....	25
Abbildung 12: LC/ESI-MS Chromatogramme und Spektren von LPA- und LPBG-Proben der Stabilitätsversuche in Gegenwart von HHH nach 1000 min Versuchszeit	25
Abbildung 13: Pseudoternäre Phasendiagramme der ME1 (A) und ME2 (B) mit Markierung des isotropen Bereichs (schwarz) und der Dilutionsreihen a-e (a, c: grün; b, d: blau; e: rot), die zur weiteren Charakterisierung genutzt wurden; Mengenangaben in % (m/m)	29
Abbildung 14: Dynamische Viskosität der ME1 entlang A) der Reihe a und B) der Reihe b in Abhängigkeit von der Scherrate	32
Abbildung 15: Dynamische Viskosität der ME1 entlang Reihe a in Abhängigkeit vom Wassergehalt (A) und Reihe b in Abhängigkeit vom Emulgatorgehalt (B) (n=16, MW ± SD)	32
Abbildung 16: Dynamische Viskosität der ME2 entlang der A) Reihen c, B) Reihe d und C) Reihe e in Abhängigkeit von der Scherrate.....	33

III. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 17: Dynamische Viskosität der ME2 entlang Reihe c und e in Abhängigkeit vom Wassergehalt (A) und Reihe d in Abhängigkeit vom Emulgatorgehalt (B) (n=16, MW ± SD)	33
Abbildung 18: Elektrische Leitfähigkeit κ der ME1 entlang Reihe a (n = 5, MW ± SD), klein: erste Ableitung der elektrischen Leitfähigkeit gegen die Wasserfraktion ϕ_w	35
Abbildung 19: Elektrische Leitfähigkeit κ der ME1 entlang Reihe b (n = 5, MW ± SD)	35
Abbildung 20: Elektrische Leitfähigkeit κ der ME2 entlang Reihe c und e (n = 3, MW ± SD), klein: erste Ableitung der elektrischen Leitfähigkeit gegen die Wasserfraktion ϕ_w	36
Abbildung 21: Elektrische Leitfähigkeit κ der ME2 entlang Reihe d (n = 3, MW ± SD)	36
Abbildung 22: DSC-Kühlkurven der einzelnen Bestandteile der ME1 und ME2; HPGC.3 = Hydriol PGC.3	38
Abbildung 23: DSC-Kühlkurven der ME1 entlang der Verdünnungsreihen a (Mischungen a ¹ -a ⁶) und b (Mischungen b ¹ -b ⁵) sowie von 100 % IPP	39
Abbildung 24: DSC-Kühlkurven der ME2 entlang der Verdünnungsreihen c (Mischungen c ¹ -c ⁷), d (Mischungen d ¹ - d ⁴) und e (Mischungen e ¹ -e ⁴) sowie von 100 % IPP und dem Emulgatormischung Isolan® GO 33/Hydriol PGC.3 (2:3)	39
Abbildung 25: Hydrodynamische Radien R_h der untersuchten MEs entlang Dilutionsreihe a und c (13 Messwinkel, MW ± SD)	41
Abbildung 26: Hydrodynamische Radien R_h der untersuchten MEs entlang Dilutionsreihe b (13 Messwinkel, MW ± SD)	41
Abbildung 27: (A) Penetrationsergebnisse von GEKG aus der O/W-Emulsion mit 5000 ppm Peptidgehalt als relativer Anteil in den untersuchten Proben Tupfer (Tu), SC, lebende Hautschichten (LH = Summe aus vitaler Epidermis (EP), Dermis (DR) und Stumpf (Stu)), Gaze (Ga) und Akzeptormedium (Ak); MW ± SD; n = 3 für Tu, SC, Ga, Ak; n = 9 für LH, EP, DR, Stu und (B) das dazugehörige Tiefenprofil (TP) ohne SC; MW ± SD; n = 9; *p < 0,01; #p < 0,05 für Unterschiede zwischen den Versuchszeiten, TP: ¹ 30 min vs. 300 min, ² 100 min vs. 300 min	51
Abbildung 28: (A) Penetrationsergebnisse von PKEK aus der O/W-Emulsion mit 5000 ppm Peptidgehalt als relativer Anteil in den untersuchten Proben Tupfer (Tu), SC, lebende Hautschichten (LH = Summe aus vitaler Epidermis (EP), Dermis (DR) und Stumpf (Stu)) und Akzeptormedium (Ak); MW ± SD; n = 3 für Tu, SC, Ak; n = 9 für LH, EP, DR, Stu und (B) das dazugehörige Tiefenprofil (TP) ohne SC; MW ± SD; n = 9; *p < 0,01; #p < 0,05 für Unterschiede zwischen den Versuchszeiten, TP: ¹ 30 min vs. 100 min, ² 30 min vs. 300 min, ³ 100 min vs. 300 min	53
Abbildung 29: (A) Penetrationsergebnis von PKEK aus der O/W-Emulsion mit 40 ppm Peptidgehalt als relativer Anteil in den untersuchten Proben Tupfer (Tu), SC, lebende Hautschichten (LH = Summe aus vitaler Epidermis (EP), Dermis (DR) und Stumpf (Stu)) und Akzeptormedium (Ak); MW ± SD; n = 3 für Tu, SC, Ak; n = 9 für LH, EP, DR, Stu und	

III. Abbildungsverzeichnis

(B) das dazugehörige Tiefenprofil ohne SC; MW ± SD; *p < 0,01; #p < 0,05 für Unterschiede zwischen den Versuchszeiten	54
Abbildung 30: (A) Penetrationsergebnis von LPA, LPBG und LPT aus der BC mit 1,0 % Peptidgehalt als Anteil der applizierten Dosis in den untersuchten Proben Tupfer (Tu), SC, lebende Hautschichten (LH = Summe aus vitaler Epidermis (EP), Dermis (DR) und Stumpf (Stu)), Gaze (Ga) und Akzeptormedium (Ak); MW ± SD; n = 1 für Tu, Ga, Ak; n = 3 für SC, LH, EP, DR, Stu und (B) die dazugehörigen Tiefenprofile mit SC; MW ± SD; n = 3 nach einer Versuchszeit von 300 min	57
Abbildung 31: (A) Penetrationsergebnis von Pal-GEKG aus der O/W-Emulsion mit 5000 ppm Peptidgehalt als relativer Anteil in den untersuchten Proben Tupfer (Tu), SC, lebende Hautschichten (LH = Summe aus vitaler Epidermis (EP), Dermis (DR) und Stumpf (Stu)) und Akzeptormedium (Ak); MW ± SD; n = 3 für Tu, SC, Ak; n = 9 für LH, EP, DR, Stu und (B) das dazugehörige Tiefenprofil (TP) ohne SC; MW ± SD; *p < 0,01; #p < 0,05 für Unterschiede zwischen den Versuchszeiten, TP: 130 min vs. 100 min.....	60
Abbildung 32: Vergleich der Penetrationsergebnisse von GEKG und Pal-GEKG aus der O/W-Emulsion mit 5000 ppm Peptidgehalt als relativer Anteil in den untersuchten Proben; MW ± SD; n = 3 für Tupfer, SC und Akzeptor; für lebende Hautschichten (Summe aus vitaler Epidermis, Dermis und Stumpf), Epidermis, Dermis, Stumpf; #p < 0,05 für GEKG vs. Pal-GEKG.....	61
Abbildung 33: Vergleich der Tiefenprofile ohne SC von GEKG und Pal-GEKG aus der O/W-Emulsion mit 5000 ppm Peptidgehalt; MW ± SD; n = 9; #p < 0,05 für GEKG vs. Pal-GEKG.....	61
Abbildung 34: (A) Penetrationsergebnisse von Pal-PKEK aus der O/W-Emulsion mit 5000 ppm Peptidgehalt als relativer Anteil in den untersuchten Proben Tupfer (Tu), SC, lebende Hautschichten (LH = Summe aus vitaler Epidermis (EP), Dermis (DR) und Stumpf (Stu)) und Akzeptormedium (Ak); MW ± SD; n = 3 für Tu, SC, Ak; n = 9 für LH, EP, DR, Stu und (B) das dazugehörige Tiefenprofil (TP) ohne SC; MW ± SD; n = 9; *p < 0,01; #p < 0,05 für Unterschiede zwischen den Versuchszeiten, TP: 130 min vs. 100 min, 2100 min vs. 300 min	63
Abbildung 35: Vergleich der Penetrationsergebnisse von PKEK und Pal-PKEK aus der O/W-Emulsion mit 5000 ppm Peptidgehalt als relativer Anteil in den untersuchten Proben; MW ± SD; n = 3 für Tupfer, SC und Akzeptor; n = 9 für lebende Hautschichten (Summe aus vitaler Epidermis, Dermis und Stumpf), Epidermis, Dermis, Stumpf; *p < 0,01; #p < 0,05 für PKEK vs. Pal-PKEK.....	64
Abbildung 36: Vergleich der Tiefenprofile von PKEK und Pal-PKEK aus der O/W-Emulsion mit 5000 ppm Peptidgehalt als relativer Anteil in den untersuchten Proben; MW ± SD; n = 9; *p < 0,01, #p < 0,05 für PKEK vs. Pal-PKEK	64
Abbildung 37: (A) Penetrationsergebnisse von GEKG aus der ME1 mit 5000 ppm Peptidgehalt als relativer Anteil in den untersuchten Proben Tupfer (Tu), SC, lebende Hautschichten (LH = Summe aus vitaler Epidermis (EP), Dermis (DR) und Stumpf (Stu)), Gaze (Ga) und Akzeptormedium (Ak); MW ± SD; n = 3 für Tu, SC, Ga, Ak; n = 9 für LH, EP, DR, Stu und (B) das dazugehörige Tiefenprofil (TP) ohne SC; MW ± SD; n = 9; *p < 0,01;	

III. Abbildungsverzeichnis

#p < 0,05 für Unterschiede zwischen den Versuchszeiten, TP: ¹ 30 min vs. 300 min, ² 100 min vs. 300 min	65
Abbildung 38: Vergleich der Penetrationsergebnisse von der O/W-Emulsion und der ME1 mit je 5000 ppm GEKG als relativer Anteil in den untersuchten Proben; MW ± SD; n = 3 für Tupfer, SC, Gaze und Akzeptor; n = 9 für lebende Hautschichten (Summe aus vitaler Epidermis, Dermis und Stumpf), Epidermis, Dermis, Stumpf; *p < 0,01; #p < 0,05 für O/W-Emulsion vs. ME	66
Abbildung 39: Vergleich Tiefenprofile ohne SC von der O/W-Emulsion und der ME1 mit je 5000 ppm GEKG; MW ± SD; n = 9; * p < 0,01, #p < 0,05 für O/W-Emulsion vs. ME1	66
Abbildung 40: (A) Penetrationsergebnisse von PKEK aus der ME1 mit 5000 ppm Peptidgehalt als relativer Anteil in den untersuchten Proben Tupfer (Tu), SC, lebende Hautschichten (LH = Summe aus vitaler Epidermis (EP), Dermis (DR) und Stumpf (Stu)) und Akzeptormedium (Ak); MW ± SD; n = 3 für Tu, SC, Ak; n = 9 für LH, EP, DR, Stu und (B) das dazugehörige Tiefenprofil (TP) ohne SC; MW ± SD; n = 9, *p < 0,01; #p < 0,05 für Unterschiede zwischen den Versuchszeiten, TP: ¹ 30 min vs. 100 min, ² 30 min vs. 300 min, ³ 100 min vs. 300 min	67
Abbildung 41: Vergleich der Penetrationsergebnisse von der O/W-Emulsion und der ME1 mit je 5000 ppm PKEK als relativer Anteil in den untersuchten Proben; MW ± SD; n = 3 für Tupfer, SC und Akzeptor; n = 9 für lebende Hautschichten (Summe aus vitaler Epidermis, Dermis und Stumpf), Epidermis, Dermis, Stumpf; *p < 0,01; #p < 0,05 für O/W-Emulsion vs. ME	68
Abbildung 42: Vergleich der Tiefenprofile von der O/W-Emulsion und der ME1 mit je 5000 ppm PKEK; MW ± SD; n = 9; #p < 0,05 für O/W-Emulsion vs. ME1	69
Abbildung 43: (A) Penetrationsergebnisse von LPA, LPBG und LPT aus der ME1 mit 1,0 % Peptidgehalt nach einer Versuchszeit von 300 min als Anteil der applizierten Dosis in den untersuchten Proben Tupfer (Tu), SC, lebende Hautschichten (LH = Summe aus vitaler Epidermis (EP), Dermis (DR) und Stumpf (Stu)), Gaze (Ga) und Akzeptormedium (Ak); MW ± SD; n = 1 für Tu, Ga, Ak; n = 3 für SC, LH, EP, DR, Stu und (B) die dazugehörigen Tiefenprofile mit SC; MW ± SD; n = 3	70
Abbildung 44: Vergleich der Penetrationsergebnisse von der BC und der ME1 mit je 1 % Peptid nach einer Versuchszeit von 300 min als Anteil in % der Ausgangskonzentration in den untersuchten Proben Tupfer (Tu), SC, lebende Hautschichten (LH = Summe aus vitaler Epidermis (EP), Dermis (DR) und Stumpf (Stu)), Gaze (Ga) und Akzeptormedium (Ak); MW ± SD; n = 1 für Tu, Ga, Ak; n = 3 für SC, LH, EP, DR, Stu	71
Abbildung 45: Vergleich der Tiefenprofile von der BC und der ME1 mit je 1 % Peptid nach einer Versuchszeit von 300 min; MW ± SD; n = 3; **p < 0,01; *p < 0,05 für den Vergleich der BC gegenüber ME1	72
Abbildung 46: Penetrationsergebnisse von GEKG aus der unmodifizierten O/W-Emulsion, sowie O/W-Emulsionen mit 5 % verschiedener Penetrationenhancer, sowie ME1 und ME2 (Peptidgehalt: 50 ppm) als relativer Anteil in den untersuchten Proben Tupfer (Tu),	

III. Abbildungsverzeichnis

SC, lebende Hautschichten (LH = Summe aus vitaler Epidermis (EP), Dermis (DR) und Stumpf (Stu)), Gaze (Ga) und Akzeptormedium (Ak); n = 1; kleine Abbildung: MW ± SD für die 3 Stenzen eines Hautstücks.....	74
Abbildung 47: Tiefenprofile von GEKG aus der unmodifizierten O/W-Emulsion, sowie O/W-Emulsionen mit 5 % verschiedener Penetrationenhancer, sowie ME1 und ME2 (Peptidgehalt: 50 ppm) ohne SC; EP: lebende Epidermis, DR: Dermis; MW ± SD; n = 3.....	76
Abbildung 48: Penetrationsergebnisse von GEKG und Pal-GEKG aus der unmodifizierten O/W-Emulsion, sowie von GEKG aus O/W-Emulsionen mit 5 % verschiedener Penetrationenhancer und der ME1 als relativer Anteil (Peptidgehalt: 50 ppm) in den untersuchten Proben Tupfer (Tu), SC, lebende Hautschichten (LH = Summe aus vitaler Epidermis (EP), Dermis (DR) und Stumpf (Stu)), Gaze (Ga) und Akzeptormedium (Ak); MW ± SD; n = 3 für Tu, SC, Ga, Ak; n = 9 für LH, EP, DR, Stu; *p < 0,01; #p < 0,05 für Unterschiede zwischen den Formulierungen.....	79
Abbildung 49: A: Tiefenprofile von GEKG aus der unmodifizierten O/W-Emulsion (F1), Emulsionen mit 5 % verschiedener Penetrationenhancer (F2–4) und der ME1 (F7), B: Tiefenprofile von GEKG und Pal-GEKG aus der unmodifizierten O/W-Emulsion (F1, F5), sowie von GEKG aus ME1 (F7) (Peptidgehalt: 50 ppm); ohne SC; MW ± SD; n = 9; *p < 0,01; #p < 0,05; ¹ F1 vs. F5, ² F5 vs. F6.....	80
Abbildung 50: Gegenüberstellung von Penetrationsergebnissen der Peptide GEKG und Pal-GEKG aus Versuchen mit unterschiedlicher Peptidkonzentration in den Vehikeln unmodifizierte O/W-Emulsion und ME1, Versuchszeit: 300 min; MW ± SD; *p < 0,01; #p < 0,05 für 5000 ppm, n=3 vs. 50 ppm (2. Screening), n=3.....	82
Abbildung 51: Penetrationsergebnisse von PKEK aus der unmodifizierten O/W-Emulsion, sowie O/W-Emulsionen mit 5 % verschiedener Penetrationenhancer, sowie ME1 und ME2 (Peptidgehalt: 40 ppm) als relativer Anteil in den untersuchten Proben Tupfer (Tu), SC, lebende Hautschichten (LH = Summe aus vitaler Epidermis (EP), Dermis (DR) und Stumpf (Stu)), Gaze (Ga) und Akzeptormedium (Ak); n = 1; kleine Abbildung: MW ± SD für die 3 Stenzen eines Hautstücks.....	83
Abbildung 52: Tiefenprofile von PKEK aus der unmodifizierten O/W-Emulsion, sowie O/W-Emulsionen mit 5 % verschiedener Penetrationenhancer, sowie ME1 und ME2 (Peptidgehalt: 40 ppm) ohne SC; MW ± SD; n = 3.....	84
Abbildung 53: Penetrationsergebnisse von PKEK aus O/W-Emulsionen mit 5 % Polyglycerol-3 Caprate (F1-F3) und Soluphor P (F6), sowie O/W-Emulsionen ohne Enhancer (F4-F5) (Peptidgehalt: 40 ppm) als relativer Anteil in den untersuchten Proben Tupfer (Tu), SC, lebende Hautschichten (LH = Summe aus vitaler Epidermis (EP), Dermis (DR) und Stumpf (Stu)), Gaze (Ga) und Akzeptormedium (Ak); MW ± SD; n = 3 für Tu, SC, Ga, Ak; n = 9 für LH, EP, DR, Stu; *p < 0,01; #p < 0,05 für Unterschiede zwischen den Formulierungen.....	86
Abbildung 54: Tiefenprofile von PKEK aus O/W-Emulsionen mit 5 % Polyglycerol-3-caprat (F1-F3) und 2-Pyrrolidon (F6), sowie O/W-Emulsionen ohne Enhancer (F4-F5)	

III. Abbildungsverzeichnis

(Peptidgehalt: 40 ppm) ohne SC; EP: lebende Epidermis, DR: Dermis; MW \pm SD; n = 9; *p < 0,01; #p < 0,05; in Abbildung B: ¹ F1 vs. F2, ² F2 vs. F3, ³ F2 vs. F6	87
Abbildung 55: Schematische Darstellung der Versuchsanordnung für die Penetrationsversuche (n=3) mit radioaktivem Tracer (grün) und ohne radioaktiven Tracer (blau)	101
Abbildung 56: Strukturformeln der Bestandteile von ME1 und ME2	131

IV. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Beispiele von Penetrationsenhancern und deren Wirkungsweise	7
Tabelle 2: Beispiele für peptidhaltige ME zur dermalen Anwendung.....	9
Tabelle 3:Übersicht über die IEP der Peptide.....	14
Tabelle 4: Löslichkeit in wässrigem Medium berechnet mittels ACD/Labs [198-202].....	16
Tabelle 5: Übersicht über die physikochemischen Eigenschaften der untersuchten Peptide berechnet mittels MarvinSketch.....	17
Tabelle 6: Korrekturfaktoren für den Extraktionsversuch.....	19
Tabelle 7: Korrigierte WFR von LPA, LPBG und LPT nach Extraktion mit MeOH-Wasser-Mischungen aus ME, BC und Haut bezogen auf die eingesetzte Dosis; n=3, MW ± SD).....	19
Tabelle 8: Emulgatorkombinationen die mit 5 % Wasser und 70 % IPM klare Mischungen ergeben	27
Tabelle 9: Emulgatorkombinationen die mit 10 % Wasser-Glykol-Gemisch und 65 % Öl klare Mischungen ergeben	29
Tabelle 10: Toxikologische Parameter der Mikroemulsionsbestandteile.....	44
Tabelle 11: Anwendungs- und Expositionsinformationen für kosmetische Produkte gemäß SCCS [34].....	45
Tabelle 12: Berechnung der systemischen Expositionsdosis (SED) und Sicherheitsspanne (MoS) für die Anwendung der ME1 und ME2 an Hand, Gesicht und Körper; C: Konzentration im Vehikel.....	46
Tabelle 13: HET-CAM-Ergebnisse aller untersuchten Formulierungen – ermittelter Irritations-score, Schweregrad der Ereignisse Hämorrhagie (H), Gefäßlyse (L) und Koagulation (C), sowie Bewertung des reizenden Potentials nach ICCVAM; Wdh.: Wiederholungsversuch [307]	47
Tabelle 14: Ergebnisse des Vergleichs der Penetrationsprofile von 40 ppm PKEK in O/W-Emulsion und 5000 ppm PKEK in O/W-Emulsion; #p < 0,05, *p < 0,01 für Unterschiede zwischen den Formulierungen.....	55
Tabelle 15: Analytische Parameter der Quantifizierung mittels HPLC-MS für Pal-GEKG und Pal-PKEK; H ₂ O = Wasser, FA = Ameisensäure, (l) = linear, (p) = polynomial.....	92
Tabelle 16: Analytische Parameter der Quantifizierung mittels HPLC-MS für LPA, LPBG und LPT; H ₂ O = Wasser, FA = Ameisensäure.....	93
Tabelle 17: Analytische Parameter der Quantifizierung mittels HPLC-UV für GEKG und PKEK; AA = Ammoniumacetat, FA = Ameisensäure, H ₂ O = Wasser	94
Tabelle 18: Experimentelle Parameter für die Bestimmung des IEP mittels CE	95
Tabelle 19: Experimentelle Parameter für den Stabilitätsversuch in Gegenwart von HHH....	98
Tabelle 20: Probenaufbereitungsschema für die Flüssigkeitsszintillationsmessung	103

IV. Tabellenverzeichnis

Tabelle 21: Aufbereitung der Penetrationsproben im Versuch ohne radioaktives Peptidmaterial.....	103
Tabelle 22: Übersicht über die verwendeten Extraktionsmittel.....	104
Tabelle 23: Aufbereitung der Gazeextrakte und Akzeptormedien im Penetrationsversuch ohne radioaktives Peptidmaterial.....	104
Tabelle 24: Zusammensetzung der ME entlang der Dilutionsreihen a bis e (TC PL4 = Tego Care PL4, HPGC.3 = Hydriol PGC.3, H ₂ O = Wasser); Mengenangaben in % (m/m).....	134
Tabelle 25: HET-CAM-Ergebnis der visuellen Beobachtung der CAM nach Applikation der ME1 und ME2 ohne Peptid, sowie ME mit je 1 % der Peptide GEKG und PKEK - Sekunden bis Eintritt der Ereignisse Hämorrhagie (H), Gefäßlyse (L) und Gerinnung (C); Wdh.: Wiederholungsversuch, n.b. = nicht beobachtet.....	135
Tabelle 26: HET-CAM-Ergebnis der visuellen Beobachtung der CAM nach Applikation der ME1 mit je 1 % der Peptide LPA, LPBG und LPT - Sekunden bis Eintritt der Ereignisse Hämorrhagie (H), Gefäßlyse (L) und Gerinnung (C); Wdh. = Wiederholungsversuch, n.b. = nicht beobachtet.....	135
Tabelle 27: HET-CAM-Ergebnis der visuellen Beobachtung der CAM nach Applikation der BC ohne Peptid und mit je 1 % der Peptide LPA, LPBG und LPT - Sekunden bis Eintritt der Ereignisse Hämorrhagie (H), Gefäßlyse (L) und Gerinnung (C); n.b. = nicht beobachtet.....	135
Tabelle 28: Eigenschaften des radioaktiven Materials.....	136
Tabelle 29: Zusammensetzung der Formulierungen für das 1. Screening mit GEKG.....	137
Tabelle 30: Zusammensetzung der Formulierungen für das 2. Screening mit GEKG.....	138
Tabelle 31: Zusammensetzung der Formulierungen für das 1. Screening mit PKEK.....	139
Tabelle 32: Zusammensetzung der Formulierungen für das 2. Screening mit PKEK.....	140
Tabelle 33: Penetrationsergebnisse von GEKG aus der O/W-Emulsion mit 5000 ppm Peptidgehalt als absoluten Anteil in % der Ausgangskonzentration in den untersuchten Proben inklusive Angabe der jeweils verwendeten Hautproben (MA = Mammahaut).....	141
Tabelle 34: Penetrationsergebnisse von GEKG aus der O/W-Emulsion mit 5000 ppm Peptidgehalt als relativen Anteil in den untersuchten Proben ohne Gaze, sowie die Ergebnisse des Dunnett's Test auf signifikante Unterschiede zwischen den Versuchszeiten, n.s. = nicht signifikant für $p > 0,05$	141
Tabelle 35: Penetrationsergebnisse von GEKG aus der O/W-Emulsion mit 5000 ppm Peptidgehalt als relativen Anteil in den untersuchten Proben inklusive Gaze, sowie die Ergebnisse des Dunnett's Test auf signifikante Unterschiede zwischen den Versuchszeiten, n.s. = nicht signifikant für $p > 0,05$	142
Tabelle 36: Penetrationsergebnisse von PKEK aus der O/W-Emulsion mit 5000 ppm Peptidgehalt als absoluten Anteil in % der Ausgangskonzentration in den untersuchten Proben inklusive Angabe der jeweils verwendeten Hautproben (MA = Mammahaut).....	142

Tabelle 37: Penetrationsergebnisse von PKEK aus der O/W-Emulsion mit 5000 ppm Peptidgehalt als relativen Anteil in den untersuchten Proben, sowie die Ergebnisse des Dunnett's Test auf signifikante Unterschiede zwischen den Versuchszeiten, n.s. = nicht signifikant für $p > 0,05$ 143

Tabelle 38: Penetrationsergebnisse von PKEK aus der O/W-Emulsion mit 40 ppm Peptidgehalt als absoluten Anteil in % der Ausgangskonzentration in den untersuchten Proben inklusive Angabe der jeweils verwendeten Hautproben (MA = Mammahaut)..... 143

Tabelle 39: Penetrationsergebnisse von PKEK aus der O/W-Emulsion mit 40 ppm Peptidgehalt als relativen Anteil in den untersuchten Proben, sowie die Ergebnisse des Dunnett's Test auf signifikante Unterschiede zwischen den Versuchszeiten, sowie zwischen der PKEK-haltigen O/W-Emulsionen mit 40 ppm und 5000 ppm Peptidanteil, n.s. = nicht signifikant für $p > 0,05$ 144

Tabelle 40: Penetrationsergebnisse von LPA, LPBG und LPT aus der BC mit 1 % Peptidgehalt als absoluten Anteil in % der Ausgangskonzentration in den untersuchten Proben inklusive Angabe der jeweils verwendeten Hautproben (OA = Oberarm) 144

Tabelle 41: Penetrationsergebnisse von Pal-GEKG aus der O/W-Emulsion mit 5000 ppm Peptidgehalt als absoluten Anteil in % der Ausgangskonzentration in den untersuchten Proben inklusive Angabe der jeweils verwendeten Hautproben (BA = Bauch, OA = Oberarm, OS = Oberschenkel) 145

Tabelle 42: Penetrationsergebnisse von Pal-GEKG aus der O/W-Emulsion mit 5000 ppm Peptidgehalt als relativen Anteil in den untersuchten Proben, sowie die Ergebnisse des Dunnett's Test auf signifikante Unterschiede zwischen den Versuchszeiten, sowie zwischen Pal-GEKG und GEKG in der O/W-Emulsion, n.s. = nicht signifikant für $p > 0,05$.. 145

Tabelle 43: Penetrationsergebnisse von Pal-PKEK aus der O/W-Emulsion mit 5000 ppm Peptidgehalt als absoluten Anteil in % der Ausgangskonzentration in den untersuchten Proben inklusive Angabe der jeweils verwendeten Hautproben (MA = Mammahaut)..... 146

Tabelle 44: Penetrationsergebnisse von Pal-PKEK aus der O/W-Emulsion mit 5000 ppm Peptidgehalt als relativen Anteil in den untersuchten Proben, sowie die Ergebnisse des Dunnett's Test auf signifikante Unterschiede zwischen den Versuchszeiten, sowie zwischen Pal-PKEK und PKEK in der O/W-Emulsion, n.s. = nicht signifikant für $p > 0,05$... 146

Tabelle 45: Penetrationsergebnisse von GEKG aus der ME1 mit 5000 ppm Peptidgehalt als absoluten Anteil in % der Ausgangskonzentration in den untersuchten Proben inklusive Angabe der jeweils verwendeten Hautproben (MA = Mammahaut)..... 147

Tabelle 46: Penetrationsergebnisse von GEKG aus der ME1 mit 5000 ppm Peptidgehalt als relativen Anteil in den untersuchten Proben inklusive Gaze, sowie die Ergebnisse des Dunnett's Test auf signifikante Unterschiede zwischen den Versuchszeiten, sowie zwischen der ME1 und O/W-Emulsion mit je 5000 ppm GEKG, n.s. = nicht signifikant für $p > 0,05$ 147

Tabelle 47: Penetrationsergebnisse von PKEK aus der ME1 mit 5000 ppm Peptidgehalt als absoluten Anteil in % der Ausgangskonzentration in den untersuchten Proben inklusive Angabe der jeweils verwendeten Hautproben (MA = Mammahaut)..... 148

Tabelle 48: Penetrationsergebnisse von PKEK aus der ME1 mit 5000 ppm Peptidgehalt als relativen Anteil in den untersuchten Proben, sowie die Ergebnisse des Dunnett's Test auf signifikante Unterschiede zwischen den Versuchszeiten, sowie zwischen der ME1 und O/W-Emulsion mit je 5000 ppm PKEK, n.s. = nicht signifikant für $p > 0,05$ 148

Tabelle 49: Penetrationsergebnisse von LPA, LPBG und LPT aus der ME1 mit 1 % Peptidgehalt als absoluten Anteil in % der Ausgangskonzentration in den untersuchten Proben inklusive Angabe der jeweils verwendeten Hautproben (OA = Oberarm)..... 149

Tabelle 50: Penetrationsergebnisse des 1. Screenings von GEKG aus der unmodifizierten O/W-Emulsionen und O/W-Emulsionen mit 5 % verschiedener Penetrationenhancer, sowie aus zwei ME mit je 50 ppm Peptidgehalt als absoluten Anteil in % der Ausgangskonzentration in den untersuchten Proben inklusive Angabe der jeweils verwendeten Hautproben (OS = Oberschenkel)..... 149

Tabelle 51: Penetrationsergebnisse des 1. Screenings von GEKG aus O/W-Emulsionen ohne (F1) und mit 5 % verschiedener Penetrationenhancer (F2-F8), sowie aus zwei ME mit je 50 ppm Peptidgehalt als relativen Anteil in den untersuchten Proben inklusive Gaze..... 150

Tabelle 52: Penetrationsergebnisse des 2. Screenings von GEKG und Pal-GEKG aus O/W-Emulsionen ohne Penetrationenhancer (F1, F5) und von GEKG aus O/W-Emulsionen mit 5 % verschiedener Penetrationenhancer (F2-F4), sowie aus ME1 (F6) mit je 50 ppm Peptidgehalt als absoluten Anteil in % der Ausgangskonzentration in den untersuchten Proben inklusive Angabe der jeweils verwendeten Hautproben (MA = Mammahaut)..... 151

Tabelle 53: Penetrationsergebnisse des 2. Screenings von GEKG und Pal-GEKG aus O/W-Emulsionen ohne Penetrationenhancer (F1, F5) und von GEKG aus O/W-Emulsionen mit 5 % verschiedener Penetrationenhancer (F2-F4), sowie aus ME1 (F6) mit je 50 ppm Peptidgehalt als relativen Anteil in den untersuchten Proben inklusive Gaze; Ergebnisse des Dunnett's Test auf signifikante Unterschiede zwischen den Formulierungen 152

Tabelle 54: Penetrationsergebnisse des 1. Screenings von PKEK aus O/W-Emulsionen ohne (F1) und mit 5 % verschiedener Penetrationenhancer (F2-F6), sowie aus zwei ME mit je 40 ppm Peptidgehalt als absoluten Anteil in % der Ausgangskonzentration in den untersuchten Proben inklusive Angabe der jeweils verwendeten Hautproben..... 153

Tabelle 55: Penetrationsergebnisse des 1. Screenings von PKEK aus O/W-Emulsionen ohne (F1) und mit 5 % verschiedener Penetrationenhancer (F2-F6), sowie aus zwei ME mit je 40 ppm Peptidgehalt als relativen Anteil in den untersuchten Proben inklusive Gaze 153

Tabelle 56: Penetrationsergebnisse des 2. Screenings von PKEK aus verschiedenen O/W-Emulsionen ohne Penetrationenhancer (F1, F4, F5), aus verschiedenen O/W-Emulsionen mit 5 % Polyglycerol-3 Caprate (F1-F3), sowie mit 5 % Soluphor P mit je

40 ppm Peptidgehalt als absoluten Anteil in % der Ausgangskonzentration in den untersuchten Proben inklusive Angabe der jeweils verwendeten Hautproben (MA = Mammahaut).....	154
Tabelle 57: Penetrationsergebnisse des 2. Screenings von PKEK aus verschiedenen O/W-Emulsionen ohne Penetrationenhancer (F1, F4, F5), aus verschiedenen O/W-Emulsionen mit 5 % Polyglycerol-3 Caprate (F1-F3), sowie mit 5 % Soluphor P mit je 40 ppm Peptidgehalt als relativen Anteil in den untersuchten Proben inklusive Gaze; Ergebnisse des Dunnett's Test auf signifikante Unterschiede zwischen den Formulierungen	155

1. Einleitung und Zielsetzung

Die therapeutische Anwendung von Peptiden gewinnt zunehmend an Bedeutung, da durch Fortschritte in der Biochemie und Biotechnologie zahlreiche peptidische Wirkstoffe zur Verfügung stehen. Auch in kosmetischen Produkten, insbesondere für den Anti-Aging-Bereich werden bioaktive Peptide als sogenannte „Cosmeceuticals“ verstärkt eingesetzt, um ein optimiertes Hautbild zu erhalten [1, 2]. Die dermale Applikation bietet als nichtinvasive Methode zahlreiche Vorteile gegenüber der oralen oder parenteralen Gabe. Einerseits kann durch Umgehung des Gastrointestinaltraktes mit dem sauren Milieu im Magen und seinen proteolytischen Enzymen, sowie des hepatischen First-Pass-Effekts, eine systemische Verfügbarkeit der Peptide realisiert werden. Andererseits ist es möglich, lokale Effekte in den verschiedenen Schichten der Haut oder den Hautanhangsgebilden zu erzielen. Fraglich ist jedoch, ob Peptide angesichts ihrer Hydrophilie und Polarität, sowie des meist hohen Molekulargewichts in der Lage sind, die äußere Hauptpenetrationsbarriere der Haut, das Stratum corneum, zu durchdringen und den Wirkort trotz ihrer metabolischen Instabilität in ausreichend hoher Konzentration zu erreichen. Vor allem im kosmetischen Bereich sind nur für wenige Peptide Daten über die dermale Absorption verfügbar [3].

Ziel dieser Arbeit ist es daher, das Penetrationsverhalten hydrophile Peptide an exzidiierter Humanhaut zu untersuchen (Kapitel 5). Dafür stehen mit Glycyl-L- α -Glutamyl-L-Lysyl-Glycin (GEKG) und L-Prolyl-L-Lysyl-L- α -Glutamyl-L-Lysin (PKEK) zwei kosmetisch angewendete Peptide der Evonik Industries AG als Modellpeptide zur Verfügung. Darüber hinaus wurden drei antientzündliche Peptide, die von der Dr. August Wolff GmbH & Co. KG entwickelt wurden, einbezogen – L-Lysyl-L-Prolyl- α -Aminoisobuttersäure, kurz: LPA; L-Lysyl-L-Prolyl-*tert*-Butylglycin, kurz: LPBG und Dimethyllysyl-D-Prolyl-N-Methylthreonin, kurz: LPT. Eine umfassende Charakterisierung der Peptide, sowie die Untersuchung ihrer chemischen Stabilität ist ein weiterer Gegenstand dieser Arbeit (Kapitel 3).

Als Ausgangspunkt der Untersuchungen werden klassische Emulsionen als Standardformulierungen für die hydrophilen Peptide verwendet. Um jedoch eine effektivere Verfügbarkeit der Peptide an ihren Wirkorten zu gewährleisten und somit die Wirksamkeit zu ermöglichen beziehungsweise zu steigern, werden verschiedene Strategien verfolgt, die zu einer verbesserten Freisetzung aus der Formulierung und zu einer optimalen Penetration in die Haut führen sollen.

Ein Ansatz besteht darin, chemisch modifizierte Peptide zu applizieren, die günstigere Eigenschaften für die Überwindung der Hautbarriere aufweisen. Neben GEKG und PKEK werden deshalb Penetrationsuntersuchungen mit den N-terminal palmitoylierten Pal-GEKG und Pal-PKEK durchgeführt und deren Penetrationsverhalten mit dem der unmodifizierten Peptide verglichen.

Das Vehikel spielt ebenfalls eine entscheidende Rolle für die dermale Verfügbarkeit von Wirkstoffen. Galenisch modifizierte Emulsionen mit verschiedenen hydrophilen Enhancern, die temporär die Barriereigenschaften des Stratum corneum reduzieren, werden daher eingesetzt, um einen verbesserten Transport der Peptide zum jeweiligen Wirkort zu ermöglichen. Als innovativer Ansatz werden zudem W/O-Mikroemulsionen als kolloidale Vehikelsysteme verwendet, die exzellente penetrationsfördernde Eigenschaften aufweisen.

Ein weiteres Aufgabengebiet dieser Arbeit besteht folglich darin, geeignete W/O-Mikroemulsionssysteme zu entwickeln (Kapitel 4). Diese sollen aus sehr gut hautverträglichen Inhaltsstoffen bestehen und die Peptide in relevanten Konzentrationen einzuarbeiten sein. Eine umfassende Charakterisierung stellt sicher, dass es sich bei den entwickelten Systemen tatsächlich um Mikroemulsionen mit den genannten Eigenschaften handelt.

2. Theoretische Grundlagen

2.1. Die menschliche Haut als Applikationsort für Peptide

2.1.1. Aufbau und Funktionen

Die menschliche Haut ist das äußere Abgrenzungsorgan gegenüber der Umwelt und weist einen komplexen, schichtweisen Aufbau auf (Abbildung 1). Die äußere Schicht, die **Epidermis**, ist ein gefäßloses, mehrschichtiges, verhornendes Plattenepithel, das von außen nach innen aus *Stratum corneum* (SC, Hornschicht), *S. granulosum* (Körnerschicht), *S. spinosum* (Stachelzellschicht) und *S. basale* (Basalschicht) besteht.

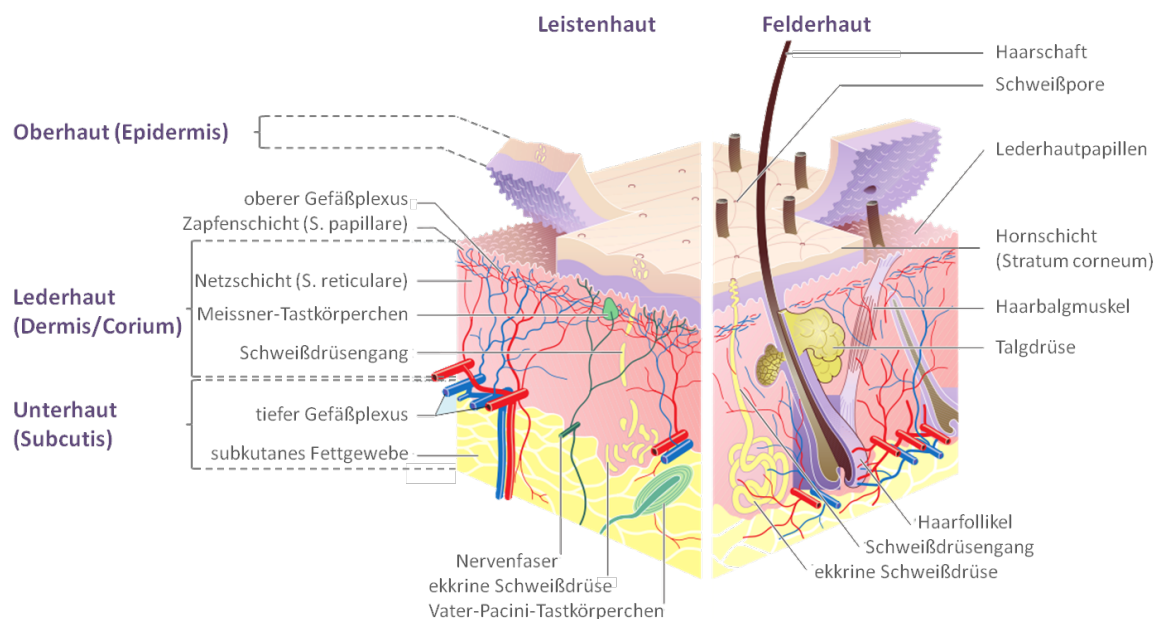


Abbildung 1: Aufbau der Haut

Neben pigmentbildenden Melanozyten im *S. basale*, Merkelzellen als Druckrezeptoren, Langerhanszellen für die periphere Immunantwort und wenigen Lymphozyten besteht die Epidermis hauptsächlich aus Keratinozyten. Diese werden durch mitotische Zellteilung im *S. basale* gebildet und wandern im Laufe des epidermalen Differenzierungsprozesses an die Hautoberfläche, um dort als keratinisierte, abgestorbene Corneozyten (Hornzellen) abzuschilfern. Die Keratinisierung und der Abbau der Zellorganellen findet beim Übergang in das SC statt, in dem die Corneozyten in eine kontinuierlich lamellare, molekular hoch geordnete Lipidmatrix aus freien, meist gesättigten Fettsäuren, Ceramiden, Cholesterol und Cholesterolderivaten eingebettet sind [4-6]. Die Corneozyten sind von einem rigiden Proteinmantel (*Cornified Envelope*) umgeben, an dessen Glutamin-Seitenketten langkettige Omegahydroxyceramide kovalent gebunden sind. Diese Lipidhülle (*Lipid envelope*) bildet die Verbindung zur lamellaren Lipidmatrix und sorgt somit für physikalische und chemische Stabilität, sowie mechanische Festigkeit [7, 8]. Corneodesmosomen, die Corneozyten miteinander verbinden, sowie hakenähnliche Corneozytenstrukturen zwischen

benachbarten Hornzellen bewirken zusätzliche mechanische Stabilität [9]. Durch den besonderen Aufbau bietet das SC dem Körper Schutz vor physikalischen, chemischen und biologischen Einflüssen, sowie Austrocknung.

Die **Dermis** enthält die Bindegewebszellen Fibrozyten und Fibroblasten, sowie verschiedene Immunzellen zum Schutz vor immunologischen Einflüssen. Der vorherrschende Zelltyp, die Fibroblasten sind für die Bildung der Interzellulärsubstanz, auch extrazelluläre Matrix (EZM) genannt, verantwortlich. Sie produzieren Kollagen, Elastin, Matrixproteine und verschiedene Enzyme. Die in eine Grundsubstanz aus Polysacchariden eingebetteten kollagenen und elastischen Fasern der EZM sorgen für Zug- und Druckfestigkeit, sowie Elastizität der Haut und somit mechanischen Schutz [10, 11]. Weiterhin sind Blut- und Lymphgefäße, Nerven und die Hautanhangsgebilde Schweißdrüsen, Talgdrüsen, Haarwurzeln und Nägel in die Dermis eingelagert [6, 12]. Über die Nerven und Nervenendkörperchen wird die Sinnesfunktion der Haut mit Tastsinn, Temperatur-, Juckreiz- und Schmerzempfinden ermöglicht. Durch Erweiterung oder Verengung der Hautgefäße, sowie Verdunstung von Schweiß erfolgt die Wärmeregulation. Absonderungen aus Talg- und Schweißdrüsen bilden den Säureschutzmantel auf der Hautoberfläche. Die **Subkutis**, bestehend aus Fettzellen, die in lockeres Bindegewebe eingebettet sind, ermöglicht Energiespeicherung, Wärmeisolation, sowie mechanischen Schutz [6].

2.1.2. Grundlagen der dermalen Wirkstoffaufnahme

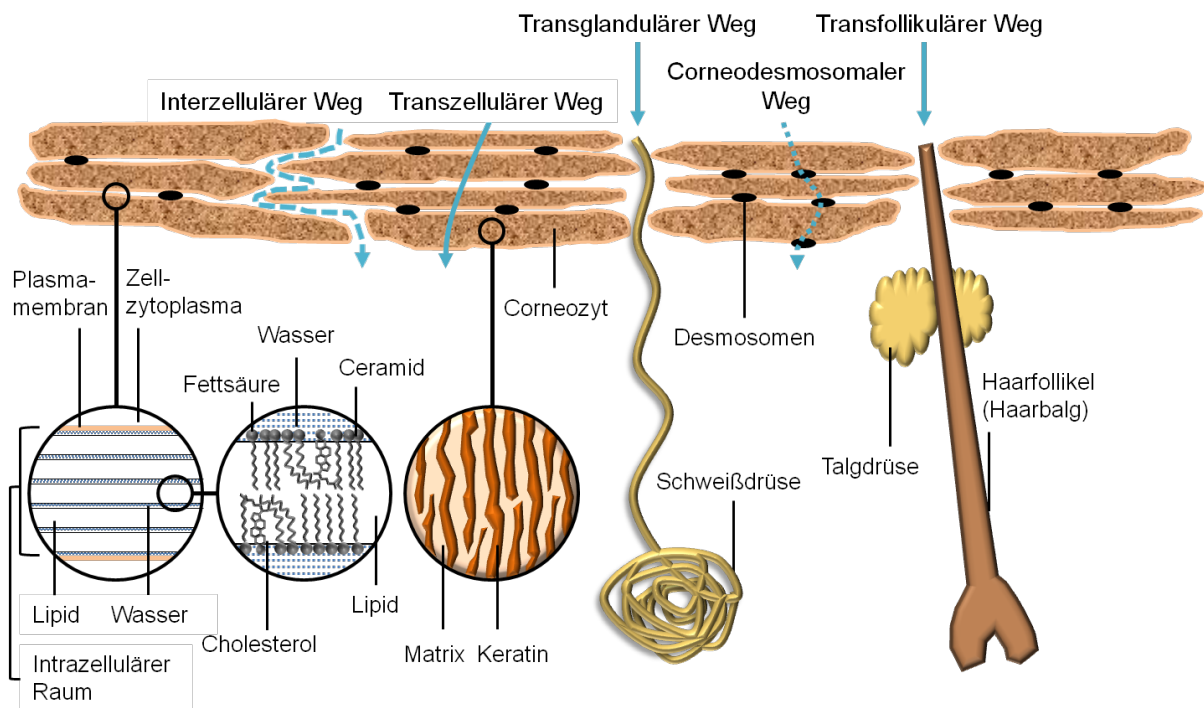


Abbildung 2: Verschiedene Wege der Wirkstoffaufnahme durch die Haut, modifiziert nach Barry und Neubert et al. [6, 13]

Die Aufnahme von Stoffen über die Haut erfolgt durch passive Diffusion. Dabei stellt das SC mit seinem speziellen Aufbau die Hauptbarriere dar [14]. Stoffe können das SC auf verschiedenen Wegen durchdringen (Abbildung 2). Eine Möglichkeit des Stoffübertritts ist die transzelluläre Route. Dieser Weg ist jedoch für die Substanzen erheblich erschwert, da sie abgestorbene, stark keratinisierte Corneozyten im Wechsel mit lipophilen Lipidschichten überwinden müssten. Eindeutige, wissenschaftliche Belege für diese Penetrationsroute stehen aus. Den bevorzugten Diffusionsweg stellt die interzelluläre Route dar. Hierbei penetriert die Substanz zwischen den Corneozyten hindurch. Lipophile Substanzen diffundieren entlang der Kohlenwasserstoffketten der lamellaren Lipidmatrix (unpolare Route), wohingegen hydrophile Substanzen den Weg entlang der hydratisierten Kopfgruppen (hydrophile Route) bevorzugen. Da der Wasseranteil im Interzellularraum gering ist und somit auch die Schichtdicke (0,16 nm), können nur kleine Moleküle diese hydrophile Route nutzen. Aufgrund der hohen Anzahl an Corneodesmosomen, die die Corneozyten miteinander verbinden (400–600 je Corneozyt), ist für größere, hydrophile Moleküle eine Penetration über corneodesmosomale Strukturen denkbar. Neben der Penetration über die Hornschicht können Substanzen auch über die Hautanhangsgebilde in die Haut gelangen, also transglandulär oder transfollikulär. Dem Transport über die Adnexe wird aufgrund des geringen Oberflächenanteils der Poren (0,1–1 %) jedoch eine eher untergeordnete Rolle zugeschrieben. Doch gerade für große, polare, langsam penetrierende Moleküle und Nanopartikel, sowie in der Initialphase scheint er von Bedeutung zu sein [6, 9, 13, 15-22].

Damit eine Substanz in die Haut penetrieren kann, muss sie bestimmte Eigenschaften aufweisen. Kleine Moleküle mit einem Verteilungskoeffizienten nahe 1 diffundieren gut in die Haut. Stärker lipophile Substanzen neigen dazu, sich in der Lipidmatrix der Hornschicht anzureichern. Hydrophile Stoffe können die Lipidbarriere nur schlecht überwinden. Auch ein hohes Molvolumen von über 500 Da wirkt sich negativ auf das Diffusionsvermögen einer Substanz aus [22, 23]. Eine erhöhte Zahl an Wasserstoffbrücken-Donatoren und -Akzeptoren im Molekül (> 10), die Wechselwirkungen mit dem SC und die Ausbildung einer stabilen Hydrathülle begünstigen, behindern die Penetration. Dabei haben Akzeptoren einen negativeren Einfluss auf die dermale Permeabilität als Donatoren und Basizität wirkt sich negativer aus als Acidität [24-27]. Auch Dipoleigenschaften erschweren die Permeation [24]. Für oral verabreichte Wirkstoffe ist bekanntlich eine große polare Oberfläche (PSA) > 120 Å² bzw. > 140 Å² hinderlich für die intestinale Absorption. Diese entspricht der Van-der-Waals-Oberfläche aller Stickstoff- und Sauerstoffatome, sowie daran gebundene Wasserstoffatome im Molekül. Für die Wirkstoffaufnahme in das Gehirn wird ein Grenzwert von 70 Å² angenommen [28-31]. Pranitha *et al.* belegten den negativen Einfluss einer großen PSA auch für die dermale Wirkstoffpermeation, bestimmten jedoch keinen Grenzwert [32]. Ates *et al.* definierten die folgenden Grenzwerte für einen gut penetrierenden Stoff: MW < 180 Da und/oder logP ≥ 0,3, Schmelzpunkt < 100 °C, PSA < 40 Å² [33]. Zudem legte der Wissenschaftliche Ausschuss für Verbrauchersicherheit

(SCCS: *Scientific Committee on Consumer Safety*) die Eigenschaften eines Stoffes mit geringem dermalen Absorptionsvermögen wie folgt fest: MW > 500 Da, hoher Grad an Ionisation, $\log P \leq -1$ oder ≥ 4 , PSA > 120 Å², Schmelzpunkt > 200 °C [34].

2.1.3. Strategien zur Optimierung der dermalen Peptidpenetration

Peptide weisen ungünstige Eigenschaften für die dermale Penetration auf, da sie naturgemäß mehrere Peptidbindungen aufweisen und bei physiologischem pH-Wert häufig geladen vorliegen. Zudem haben sie oftmals ein großes Molekulargewicht und sind anfällig gegenüber proteolytischem Abbau. Um die dermale und transdermale Verfügbarkeit von Peptiden zu ermöglichen, beziehungsweise zu optimieren, wurden zahlreiche Strategien verfolgt, die in Übersichtsartikeln zusammengefasst sind [17, 35-43]. Abbildung 3 zeigt einen Überblick über die verschiedenen Ansätze.

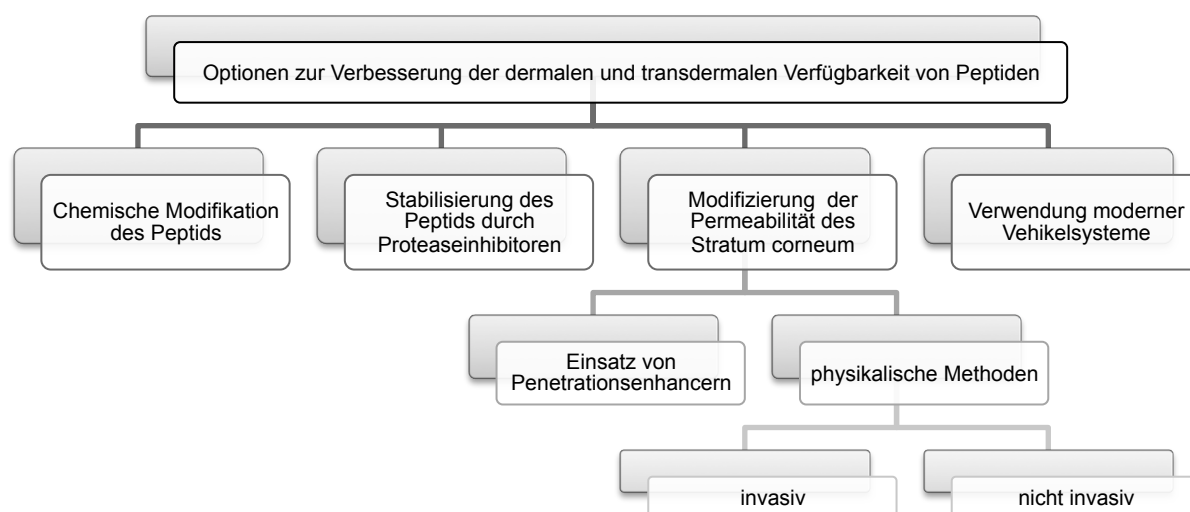


Abbildung 3: Strategien zur Optimierung der dermalen und transdermalen Verfügbarkeit von Peptiden

Die chemische Modifizierung der Peptide kann einerseits die physikochemischen Eigenschaften verbessern und somit die Penetration durch die Epidermis erleichtern. Die Derivatisierung mit Fettsäureresten (z. B. Acetyl-, Caproyl-, Undecenoyl- oder Palmitoyl-), die häufig für kosmetisch eingesetzte, aber auch für therapeutisch genutzte Peptide praktiziert wird, erhöht die Lipophilie [44-50]. Andererseits können chemische Modifizierungen zu einer besseren Stabilität des Peptids beitragen und es so beispielsweise vor dem Abbau durch Peptidasen schützen [51-56]. Dieser Effekt kann auch durch den Einsatz von Proteaseinhibitoren erzielt werden [57, 58].

Mittels sogenannter Penetrationenhancer und physikalischer Methoden wird die Permeabilität der Haut erhöht. Penetrationenhancer reduzieren temporär und reversibel die Barrierefunktion des SC, indem sie mit den interzellulären Lipiden, intrazellulärem Keratin oder Desmosomen Wechselwirkungen eingehen. Als Lösungsmittel können einige Penetrationenhancer außerdem die Wirkstoffverteilung in der Haut begünstigen [6, 15, 16,

59-62]. Sie können der Formulierung einzeln oder als Gemisch hinzugesetzt werden [63-65] und finden auch zur Vorbehandlung der Haut Verwendung [66, 67]. Tabelle 1 zeigt Beispiele einiger Penetrationsenhancer, die in der vorliegenden Arbeit eingesetzt wurden, und gibt Auskunft über die beschriebene, meist komplexe Wirkungsweise.

Tabelle 1: Beispiele von Penetrationsenhancern und deren Wirkungsweise

Penetrationsenhancer	Wirkmechanismus	Quellen
Polyole z. B. Propylenglykol, Butylenglykol, Pentylenglykol	<ul style="list-style-type: none"> - Solubilisierung des Wirkstoffs im Vehikel - penetrieren gut in die Haut, ziehen Wirkstoff mit sich (<i>solvent drag</i>) und erhöhen Lösungskapazität des SC - Wechselwirkungen mit Keratin in Diskussion → reduzierte Wirkstoffadsorption - Wechselwirkungen mit polaren Kopfgruppen der Lipidbilayer des SC in Diskussion 	[6, 16, 21, 61, 62, 68-71]
Nichtionische Emulgatoren z. B. Sucroseester, Sorbitanfettsäureester	<ul style="list-style-type: none"> - Solubilisierung des Wirkstoffs im Vehikel - Einlagerung in Lipidbilayer des SC - Wechselwirkungen mit Keratin - geringer Enhancer-Effekt 	[6, 21, 61, 62]
Fettsäureester z. B. Isopropylpalmitat, Glycerolfettsäureester	<ul style="list-style-type: none"> - Begünstigt Wirkstoffverteilung in der Haut - Einlagerung in Lipidschichten des SC → Fluidisierung 	[6, 21]
Pyrrolidone (P.) z. B. 2-Pyrrolidon, N-Methyl-2-Pyrrolidon, N-dodecyl-2-Pyrrolidon	<ul style="list-style-type: none"> - Wechselwirkungen mit interzellulären Lipiden → hydrophile P.: an polare Kopfgruppen → lipophile P.: in hydrophoben Regionen - Verändern die Lösungseigenschaften des SC → begünstigen Wirkstoffverteilung in der Haut 	[6, 16, 21, 61, 62]

Bei den physikalischen Methoden kommen nicht-invasive Methoden, wie zum Beispiel Iontophorese [72-77], Elektroporation [78, 79], Sonophorese [80-82] oder Dermaporation [83] zum Einsatz. Weiterhin finden invasive Methoden, wie Mikronadeln [84-87], verschiedene Ablationstechniken [88, 89] oder der Jet Injektor [90] Anwendung. Durch Kombination mehrerer Methoden wird eine weitere Steigerung der Penetrationsrate erzielt [91-96]. Zu besseren Penetrationsergebnissen können auch moderne Vehikelsysteme beitragen [97-99]. Kolloidale Formulierungen, beispielsweise Mikroemulsionen (ME) [100-102], Liposomen [103, 104] oder andere Vesikel (z. B. Transferosomen [105] oder biphasische Vesikel [106]) wurden für einen besseren Peptidtransport in die Haut verwendet.

2.2. Mikroemulsionen

2.2.1. Definition und Eigenschaften

ME bestehen typischerweise aus einem lipophilen Anteil, einer hydrophilen Komponente und einem Gemisch aus Tensid und Cotensid. Abhängig von der Hauptkomponente teilt man

ME in Wasser-in-Öl (W/O)- oder in Öl-in-Wasser (O/W)-Systeme ein. Bei gleichen Anteilen der Phasen bilden sich bikontinuierliche Strukturen aus, bei denen sich wässrige und ölige Bereiche gegenseitig durchdringen (Abbildung 4) [107-109].

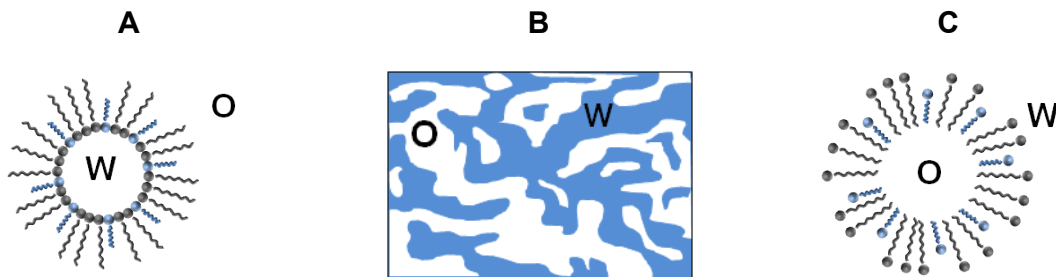


Abbildung 4: Mögliche Strukturen in ME; A: Tröpfchen in einer W/O-ME, B: bikontinuierliche Strukturen, C: Tröpfchen in einer O/W-ME (O=Öl, W=Wasser) [109]

ME, die 1943 erstmals von Hoar und Schulman beschrieben wurden, bilden sich spontan ohne Energieeintrag, wenn geeignete Mengenverhältnisse der verschiedenen Komponenten miteinander gemischt werden [110]. Daher sind sie schnell und einfach herzustellen. Aufgrund der geringen Größe der tröpfchenförmigen kolloidalen Phase (10-150 nm) handelt es sich um transparente bis leicht opaleszente Systeme. Sie sind optisch isotrop und verfügen über eine hohe thermodynamische Stabilität. Zudem besitzen sie eine geringe Viskosität, eine gegen Null tendierende Grenzflächenspannung und sie weisen Newtonsches Verhalten auf. Eine weitere besondere Eigenschaft ist die strukturelle Dynamik des Systems. Die kolloidale Phase ist nicht starr, sondern vielmehr kontinuierlich fluktuierend, sodass ständig eine spontane Reorganisation auftritt. Da ME Eigenschaften von Öl und Wasser in sich vereinen, verfügen sie in Abhängigkeit von der Art der kolloidalen Phase über ein außerordentlich gutes Solubilisierungsvermögen für sowohl hydrophile, als auch lipophile Substanzen [109, 111-117].

2.2.2. Mikroemulsionen zur dermalen Applikation

Aufgrund dieser Vielzahl positiver Eigenschaften sind ME sehr gut zur dermalen Applikation von Wirkstoffen geeignet. Die ausgezeichneten penetrationsfördernden Eigenschaften ermöglichen eine optimierte systemische Verfügbarkeit von Wirkstoffen, aber auch an den verschiedenen Zielkompartimenten in der Haut [111, 118]. Trotzdem hat sich die dermale Anwendung in der pharmazeutischen Praxis bisher nicht durchgesetzt. Im Bereich der Kosmetik sind ME sehr beliebt und werden beispielsweise zur Hautreinigung, insbesondere in Make-up Entfernern, sowie in feuchtigkeitsspendenden Körper- und Badeölen, Sonnenschutzprodukten, Haarprodukten und zur Solubilisierung von Duftstoffen und ätherischen Ölen verwendet [119-121].

Der zugrunde liegende Mechanismus des penetrationsfördernden Effekts ist nicht vollständig geklärt [118]. Je nach Zusammensetzung und Mikrostruktur werden verschiedene Faktoren diskutiert, die wahrscheinlich kombiniert auftreten:

- Bestandteile der ME (z. B. Emulgator, Co-Solvenz oder Wasser) penetrieren in die Haut, gehen Wechselwirkungen mit dem SC ein und setzen so die Barrierefunktion herab [122-125].
- Verteilungsvorgänge zwischen der fluktuierenden kolloidalen und der externen Phase der ME, sowie eine höhere Mobilität des Wirkstoffes im Vehikel führen zu einer besseren Verteilung in das SC [123, 126].
- Das gute Solubilisierungsvermögen von ME ermöglicht eine hohe Beladung. Die folglich erhöhte thermodynamische Aktivität des Wirkstoffs, sowie der größere Konzentrationsgradienten zwischen Vehikel und SC bewirkt eine optimierte Liberation und Penetration [123, 127].
- ME penetriert selbst transfollikulär in die Haut und setzt dort den Wirkstoff frei [128].

Nachteilig ist, dass die dermale Anwendung von ME häufig mit lokaler Reizung einhergeht. Hierfür ist einerseits die Toxizität der Einzelbestandteile verantwortlich, mit dem im Vergleich zu klassischen Emulsionen hohen Gehalt an Emulgatoren und Co-Emulgatoren [118]. Durch den gezielten Einsatz hautfreundlicher Emulgatoren und Co-Solventien kann die Verträglichkeit der ME verbessert werden [119]. Andererseits wird diskutiert, dass die molekulare Struktur des Systems nach dem Verdunsten von Wasser auf der Hautoberfläche das Irritationspotential bestimmt. So werden flüssigkristalline Phasen besser vertragen als Lösungen von Emulgatoren in Öl [122].

2.3.3. Mikroemulsionen als Vehikel für Peptide

ME eignen sich auch zur dermalen Applikation von Peptiden und können deren Penetration in die Haut verbessern. Übersichtsartikel bieten einen Überblick über die untersuchten Wirkstoffe [97, 129]. In Tabelle 2 sind Beispiele dargestellt.

Tabelle 2: Beispiele für peptidhaltige ME zur dermalen Anwendung

Wirkstoff	Art der ME	Quellen
Ciclosporin A	O/W bikontinuierlich	[102, 130, 131] [132]
Desmopressin	W/O	[101]
GHRP-6 (Wachstumshormon freisetzendes Peptid)	W/O	[100]
IGF-1 (Insulinähnlicher Wachstumsfaktor)	W/O	[100]
Insulin	W/O	[133]
N-acetyl-L-Carnosin	O/W	[63, 134]

2.3. Peptide als Wirkstoffe

Zahlreiche peptidische Wirkstoffe stehen für die Arzneimitteltherapie zur Verfügung, wobei Insulin, Wachstumshormone, Calcitonin, Corticotropin, Somatostatin und Vasopressin-analoga, wie Desmopressin als wichtige stoffwechselregulierende Wirkstoffe nur einige Beispiele darstellen [135-138]. Die hohe biologische Aktivität und die spezifische Wirksamkeit mit geringem Nebenwirkungspotential machen Peptide zu einer attraktiven Wirkstoffklasse [17, 139]. Allerdings müssen sie anstatt oral appliziert überwiegend parenteral verabreicht werden, da sie gegenüber enzymatischem Abbau anfällig sind und rasch über Leber und Niere eliminiert werden. Außerdem weisen sie eine schlechte Membranpermeabilität auf, die auf ihre Hydrophilie und das meist große Molekulargewicht zurückzuführen ist [41]. Nasale Arzneiformen werden für Gonadoliberin (GnRH 1), Calcitonin, Desmopressin, Buserelin eingesetzt. Zahlreiche Übersichtsartikel belegen, dass intensiv an weiteren nadelfreien Applikationsrouten für Peptide, die für eine bessere Akzeptanz beim Patienten sorgen sollen, geforscht wird [40, 135, 140-143].

2.3.1. Dermale Anwendung

Um systemische Effekte zu erzielen, ist die dermale Applikation von Peptiden eine erstrebenswerte Alternative zur parenteralen Anwendung. Der Abbau über Enzyme des Gastrointestinaltrakts oder über den hepatischen First-Pass-Effekt, wie er nach oraler Aufnahme auftritt, wird so beispielsweise vermieden. Zudem wird eine bessere Therapietreue der Patienten erreicht, da transdermale therapeutische Systeme einfacher zu handhaben sind. Weiterhin ermöglichen sie als nadelfreie Systeme eine schmerzfreie Applikation und aufgrund kontrollierter Wirkstofffreisetzung müssen sie über einen längeren Zeitraum weniger häufig angewendet werden [17, 39, 41]. In der Praxis spielt die transdermale Anwendung bisher allerdings keine Rolle, obwohl intensiv daran geforscht wird, die Permeabilität von Peptiden zu optimieren (siehe Kapitel 2.1.3. Strategien zur Optimierung der dermalen Peptidpenetration, Seite 6) [42].

Peptide können auf der Haut appliziert werden, um lokale Effekte auf ihr zu erzielen. Peptidische Antibiotika, wie Tyrothricin in Tyrosur® Gel oder Tyrosur® Puder, das bei kleinflächigen und oberflächlichen Wunden eingesetzt wird, oder das Lipoglykopeptid Telavancin in Vibativ® zur Behandlung von Hautinfektionen sind Beispiele für dieses Anwendungsgebiet [139, 144, 145]. In der Haut können Peptide antientzündliche und wundheilungsfördernde Effekte erzielen [64, 146-150]. Der rekombinante humane Wachstumsfaktor Becaplermin (Regranex®) kommt topisch auf chronischen, diabetischen Ulcera zum Einsatz, um die Wundheilung zu fördern. Allerdings trat ein erhöhtes Risiko für maligne Erkrankungen als unerwünschte Wirkung auf [151]. Laut Hersteller wurde der Vertrieb aufgrund geringer Nachfrage 2011 eingestellt [152]. Bestimmte Peptide fungieren selbst als Enhancer und tragen durch Wechselwirkungen mit Hautbestandteilen zu einer besseren Wirkstoffpenetration und -permeation bei [153-157].

2.3.2. Peptide in der Kosmetik

In kosmetischen Produkten werden synthetisch hergestellte und natürliche Oligopeptide, zum Beispiel aus Soja oder Milch verwendet [47]. Die Herstellung synthetischer Peptide ist vergleichsweise teuer. Aufgrund ihrer hohen Potenz können sie in geringen Konzentrationen (ppm-Bereich) eingesetzt werden [1, 46]. Lupo *et al.* unterteilte sie nach ihrem Wirkmechanismus in drei Gruppen – Signalpeptide, Transportpeptide und Neurotransmitter-beeinflussende Peptide [2, 158]. Als weitere Gruppen sind die antioxidativen, entzündungshemmenden Peptide bekannt, sowie enzymhemmende Peptide [3, 36, 159]. Abbildung 5 zeigt eine Übersicht der genannten Gruppen und deren Wirkungsweise [2, 3, 36, 158, 159].

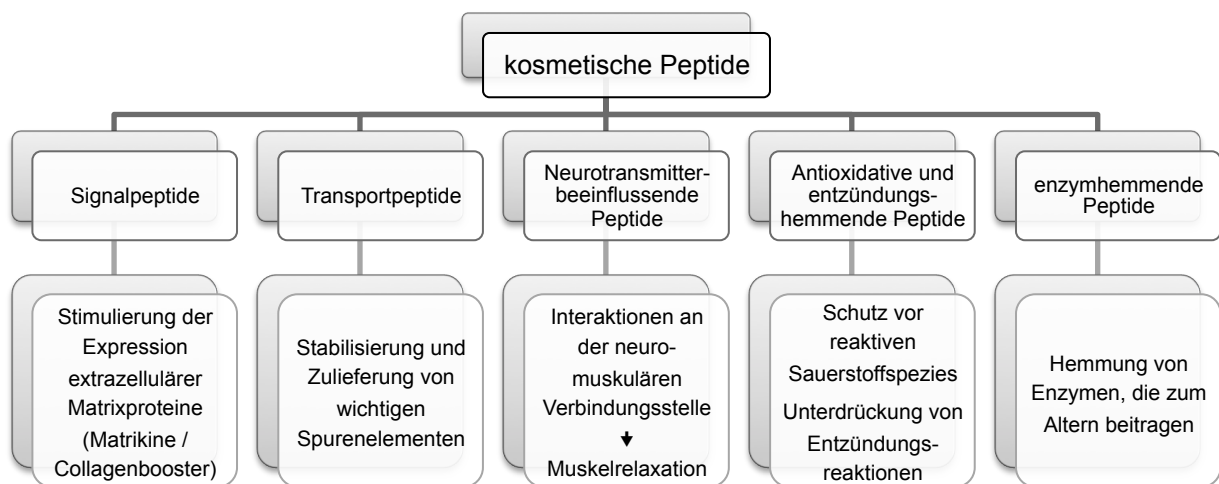


Abbildung 5: Einteilung kosmetisch verwendeter Peptide nach ihrem Wirkmechanismus

Die Einsatzmöglichkeiten sind vielfältig und die Zahl der kosmetischen Peptide wächst zunehmend [1, 47, 160, 161]. Vor allem im Anti-Aging-Segment sind Peptide sehr beliebt, da viele Vertreter in der Lage sein sollen, Falten zu reduzieren [162-167]. Der Wirksamkeitsnachweis wird häufig auf zellulärer Ebene anhand von *in vitro* Studien erbracht [46, 47, 168-174]. Für einige Peptide liegen zudem klinische Daten vor [48, 161-163, 165, 167, 175-182]. Die Aussagekraft ist meist begrenzt, da kosmetische Studien oft mit geringer Probandenzahl und teilweise ohne ausreichende Kontrollen (Placebo und Standard) durchgeführt werden. Zudem ist fraglich, ob Peptide ihre Zielkompartimente erreichen, da nur selten Informationen über deren Penetrationsvermögen vorliegen [3, 64, 66, 183, 184].

3. Eigenschaften der untersuchten Modellpeptide

Als Modellpeptide wurden zwei aus proteinogenen Aminosäuren bestehende Tetrapeptide verwendet: GEKG und PKEK (Sequenz jeweils in Einbuchstabencode). Außerdem wurden die entsprechenden N-terminal palmitoylierten Tetrapeptide Pal-GEKG und Pal-PKEK in die Untersuchungen einbezogen (Strukturformeln in Abbildung 6).

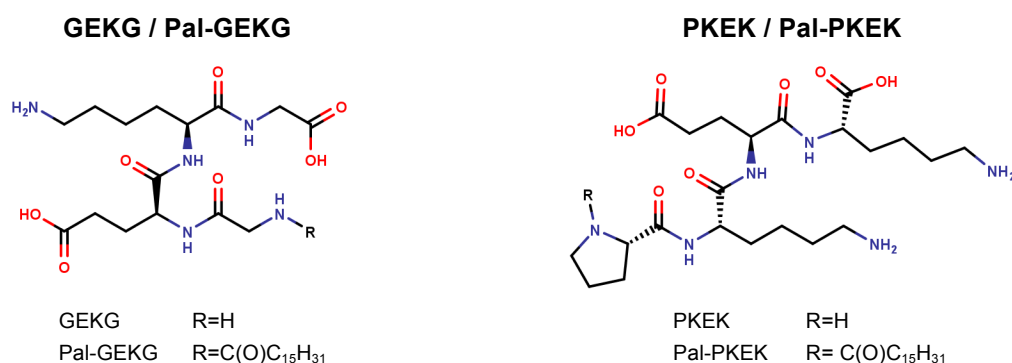


Abbildung 6: Strukturformeln der Tetrapeptide GEKG und PKEK, sowie den N-terminal palmitoylierten Peptiden Pal-GEKG und Pal-PKEK

Als weitere Modellsubstanzen dienten drei Tripeptide: LPA, LPBG und LPT (Abkürzungen entsprechen nicht dem Einbuchstabencode der Peptidsequenz, Strukturformeln in Abbildung 7). Diese enthalten im Gegensatz zu den Tetrapeptiden teilweise modifizierte, nicht-proteinogene Aminosäuren. LPA ist aus den zwei proteinogenen Aminosäuren Lysin (Lys) und Prolin (Pro), sowie der nicht-proteinogenen Aminosäure α -Aminoisobuttersäure (Aib) zusammengesetzt. LPBG besteht aus den Aminosäuren Lysin, Prolin und Glycin (Gly), wobei Glycin durch eine *tert*-Butylgruppe modifiziert ist. Bei LPT handelt es sich um ein Peptid aus Lysin modifiziert mit zwei Methylgruppen am α -Aminostickstoff, D-konfiguriertem Prolin, sowie einem N-methylierten Threonin (Thr). Die gewählten Abkürzungen entsprechen nicht den Aminosäuresequenzen in Einbuchstabencode.

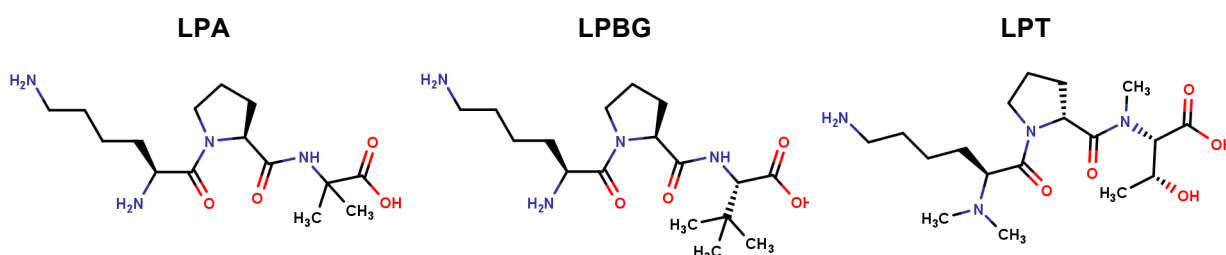


Abbildung 7: Strukturformeln der Tripeptide LPA, LPBG und LPT

3.1. Anwendungsgebiete und Zielkompartimente

GEKG (CAS: 960608-17-7) wird von der Evonik Industries AG in dem Produkt TEGO® Pep 4-17 als kosmetischer Rohstoff (INCI: Tetrapeptide-21) für Antifalten-Cremes vertrieben [185, 186]. Seine Sequenz wurde als sich wiederholende Aminosäuresequenz im Kollagen Typ IV

identifiziert [168]. *In vitro* Untersuchungen an humanen dermalen Fibroblasten ergaben, dass GEKG eine erhöhte mRNA-Expression molekularbiologischer Marker für Kollagen, Hyaluronsäure und Fibronectin bewirkt und die Bildung von Kollagen steigert. Eine vermehrte Kollagen-Typ-I-Genexpression wurde placebokontrolliert auch *in vivo* nach 8-wöchiger Anwendung einer GEKG-haltigen Creme (50 ppm) festgestellt. An Probanden wurde in weiteren Studien demonstriert, dass die Verwendung GEKG-haltiger Cremes am Unterarm und im Gesicht eine verbesserte Hautstruktur ermöglicht, sowie eine erhöhte Hautelastizität und Minimierung von Falten [163, 175, 179]. Da GEKG die Biosynthese von Peptiden in der EZM steigern soll, stellt das Zielkompartiment die Dermis dar.

PKEK (CAS: 1036207-61-0) wird von der Evonik Industries AG als kosmetischer Rohstoff (INCI: Tetrapeptide-30) in dem Produkt TEGO® Pep 4-even vertrieben [185, 187]. Als Hautaufhellungsmittel wird die Anwendung in Anti-Aging-Präparaten zur Korrektur von Altersflecken und bei Pigmentstörungen empfohlen, um ein gleichmäßigeres Hautbild zu erzielen [187, 188]. PKEK kommt als Aminosäuresequenz in dem antimikrobiellen Protein Cecropin B vor [147]. An Hautepithelzellen wurde gezeigt, dass es in der Lage ist, die UV-B-bedingte Bildung von Interleukin-6 zu minimieren [169]. Neben der antientzündlichen Aktivität wurde *in vitro* und *in vivo* eine Reduzierung der Keratinozyten-induzierten Aktivierung von Melanozyten demonstriert. Weitere Studien an kaukasischen, asiatischen und südafrikanischen Probanden belegen für PKEK einen hautaufhellenden Effekt, der durch die Kombination mit Natriumascorbylphosphat noch gesteigert werden kann [176, 178, 179]. Da PKEK auf zellulärer Ebene den Pigmentierungsprozess der Haut beeinflussen soll, ist sein Zielkompartiment in der Basalschicht der Epidermis anzusiedeln.

LPA (CAS: 1682652-97-6), LPBG (CAS: 1682652-99-8) und LPT (CAS: 1682652-87-4) wurden als antiinflammatorische Peptide von der Dr. August Wolff GmbH & Co. KG Arzneimittel entwickelt [189]. Die Strukturen wurden von dem antientzündlich wirkenden Tripeptid KdPT abgeleitet, das dem C-Terminus des α -Melanozyten-stimulierenden Hormons strukturell ähnelt. Untersuchungen an mononukleären Zellen des peripheren Blutes (*in vitro*) und an verschiedenen Mausmodellen zeigen, dass KdPT eine vielversprechende Therapieoption bei Psoriasis darstellt [190-192]. Aufgrund ungünstiger physikochemischer Eigenschaften ist es für die dermale Anwendung jedoch ungeeignet und wurde daher C- und N-terminal modifiziert. Die resultierenden Peptide sind lipophiler und besser verträglich. *In vitro* zeigten LPA, LPBG und LPT an T-Zellen von Mensch und Maus, sowie humanen Keratinozyten (HaCaT), eine stärkere antientzündliche Wirksamkeit als KdPT, da sie die Bildung inflammatorischer Zytokine stärker hemmten. Weiterhin wurde in HaCaT antientzündliches Interleukin-10 deutlich stimuliert [189]. Um diese Effekte auch *in vivo* zu erzielen, müssen die Peptide in lebende Hautschichten penetrieren. Die untere Epidermis und Dermis stellen daher die Zielkompartimente der antiinflammatorischen Peptide dar.

3.2. Physikochemische Eigenschaften der Peptide

3.2.1. Isoelektrischer Punkt

Der isoelektrische Punkt (IEP) stellt für Peptide und Proteine eine charakteristische Größe dar, da diese viele ionisierbare Gruppen aufweisen. Für GEKG und PKEK wurde er experimentell mittels Kapillarelektrophorese (CE) bestimmt. Er ist von den pK_s -Werten der funktionellen Gruppen abhängig und gibt den pH-Wert an, an dem sich negative und positive Ladungen im Molekül ausgleichen. Das Molekül ist nach außen ungeladen, was sich günstig auf das Penetrationsvermögen auswirkt. Ist der pH-Wert kleiner als der IEP, liegen die Peptide als Kationen vor und ist er größer, als Anionen.

Mit Hilfe der CE kann der IEP einfach, schnell und präzise bestimmt werden [193]. Typischerweise wird die Probe als schmales Band (5-50 nL) am anodischen Ende in eine mit Puffer gefüllte Kapillare aus amorphem Quarz mit Polyimid-Beschichtung injiziert. Die Kapillare, an die eine Spannung von bis zu 30 kV angelegt wird, hat einen Innendurchmesser von 25 bis 100 μm und eine Länge von bis zu 100 cm. Die elektrophoretische Trennung im elektrischen Feld erfolgt aufgrund der Ladung und Größe der Peptide und wird von dem sogenannten elektroosmotischen Fluss (EOF) überlagert. Dieser entsteht durch die negative Oberflächenladung der Kapillare durch Dissoziation der Silanolgruppen. An der Kapillarwand lagern sich hydratisierte Kationen des Laufmittels an, die im elektrischen Feld zur Kathode transportiert werden und die gesamte Pufferphase mit sich ziehen. Dieser passive Transportmechanismus bewirkt, dass auch negativ geladene Ionen entgegen der elektrophoretischen Migration zur Kathode wandern können. Dementsprechend werden am Detektor, der sich im Bereich der Kathode befindet, zuerst positiv geladene Analyten detektiert, anschließend neutrale und zum Schluss negativ geladene. Die Migrationsgeschwindigkeit von Neutralsubstanzen entspricht dem EOF. Für die Detektion, die durch die transparente Kapillare erfolgt (on-column), werden meist Fluoreszenz- oder UV-Detektoren verwendet [194, 195].

Zur Bestimmung des IEP wurde parallel zum Analyten sowohl eine Neutralsubstanz analysiert, als auch der pH-Wert des Laufmittels variiert (siehe 7.3.1. Experimentelle Bestimmung des isoelektrischen Punktes, Seite 96). Wurde der IEP erreicht, zeigte das Peptid die gleiche Migrationsgeschwindigkeit wie die Neutralsubstanz.

Tabelle 3: Übersicht über die IEP der Peptide

Bestimmt mit:	GEKG	Pal-GEKG	PKEK	Pal-PKEK	LPA	LPBG	LPT
CE	5,1	---	8,8	---	---	---	---
MarvinSketch	6,02	3,66	9,53	6,97	9,16	9,16	9,00

Für GEKG, das eine saure und eine basische Aminosäure, sowie zwei neutrale Glycine enthält, lag der IEP mit 5,1 im schwach sauren Bereich. Für PKEK wurde mit 8,8 ein Wert im basischen pH-Bereich ermittelt. Dies ist darauf zurückzuführen, dass das Peptid aus zwei

basischen Lysinen, sowie einer sauren und einer neutralen Aminosäure besteht (Tabelle 3). Die mittels MarvinSketch prädiktierten Werte lagen in einem ähnlichen Bereich. Grundlage der Berechnung ist die gewichtete Summe der Nettoladungen der vorliegenden Mikrospezies bei einem gegebenen pH-Wert, die am IEP 0 ist. Für Moleküle mit vielen ionisierbaren Gruppen ist die Vorhersage des IEP schwierig, da zahlreiche Mikrospezies möglich sind [196]. Dies erklärt die leichte Abweichung der berechneten Werte gegenüber den experimentell ermittelten.

Pal-GEKG und Pal-PKEK lösten sich nur schlecht in wässrigen Pufferlösungen (siehe 3.2.2. Löslichkeit). Aus Mangel an chromophoren Gruppen besitzen diese Peptide zudem ein zu schlechtes UV-Absorptionsvermögen. In Kombination mit der geringen Konzentrationsempfindlichkeit der CE infolge geringer Einspritzvolumina war die Detektion nicht möglich [195]. Für LPA, LPBG und LPT wurde aus Mangel an Substanz auf die experimentelle Bestimmung verzichtet. Für diese Peptide wurde der IEP ausschließlich mittels MarvinSketch vorhergesagt (siehe Tabelle 3). Es kann davon ausgegangen werden, dass die Prädiktion mittels MarvinSketch zuverlässige Ergebnisse liefert, da für GEKG und PKEK eine gute Übereinstimmung mit experimentell ermittelten Werten gezeigt wurde.

Pal-GEKG und Pal-PKEK besitzen geringere IEP als GEKG und PKEK, da die basische Aminogruppe des N-Terminus durch die Palmitoylierung in eine neutrale Amidgruppe überführt wird. Für LPA, LPBG und LPT wurden vergleichbare Werte im basischen pH-Bereich berechnet, da das N-terminale Lysin durch die Aminogruppe basisch ist und die übrigen Aminosäuren neutral sind.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass nur GEKG und Pal-PKEK einen IEP im leicht sauren bis neutralen pH-Bereich besitzen und unter physiologischen Bedingungen (Hautoberfläche mit pH 4–6 und obere Hautschichten mit Anstieg bis auf pH 7 [197]) nach außen ungeladen vorliegen können. Die übrigen Peptide werden vorwiegend anionisch (Pal-GEKG) oder kationisch (PKEK, LPA, LPBG und LPT) sein.

3.2.2. Löslichkeit

Für Pal-GEKG wurde die Sättigungslöslichkeit in Puffer verschiedener pH-Werte bestimmt (siehe 7.3.2. Bestimmung der Sättigungslöslichkeit, Seite 97). Gemäß Europäischem Arzneibuch (Ph. Eur.) ist es wenig löslich bei pH 7,4 ($10,29 \pm 1,47$ mg/mL) bis schwer löslich bei pH 5,4 ($3,83 \pm 0,09$ mg/mL) und pH 7,0 ($8,55 \pm 2,14$ mg/mL). Die Abnahme der Löslichkeit bei saurem pH lässt sich mit dem IEP erklären, der in diesem Bereich liegt. Bei weiterer Verdünnung der Lösungen auf 0,2 mg/mL fiel Pal-GEKG allerdings aus. Pal-GEKG war bei höheren Konzentrationen demnach vermutlich nicht molekular dispers gelöst. Vielmehr bildete es aufgrund seiner amphiphilen Molekülstruktur wahrscheinlich Aggregate, beispielsweise Mizellen oder andere lyotrope Mesophasen. Die Bestimmung der

3. Eigenschaften der untersuchten Modellpeptide

kritischen Mizellbildungskonzentration (CMC) mittels CE und UV-Detektion konnte nicht durchgeführt werden, da das UV-Absorptionsvermögen von Pal-GEKG zu gering ist.

Aufgrund der geringen Substanzenmengen, die zur Verfügung standen, wurde auf die weitere Untersuchung von Sättigungslöslichkeiten in Wasser, Puffern, Laufmitteln oder dem Akzeptormedium der Penetrationsversuche verzichtet. Die unmodifizierten Peptide GEKG, PKEK, LPA, LPBG und LPT lösen sich aufgrund ihrer hydrophilen Eigenschaften höchstwahrscheinlich sehr gut in Wasser. Lösungen dieser Peptide in Wasser mit einer Konzentration von je 1 mg/mL zeigten keinen Bodensatz. Im SciFinder® angegebene, kalkulierte Werte bestätigen dies (siehe Tabelle 4) [198-202]. Die geringste Wasserlöslichkeit wird jeweils im Bereich des IEP erreicht, da dort aufgrund der nach außen ungeladenen Substanz die Hydrophilie am schwächsten ist. Für die palmitoylierten Peptide ist eine geringere Löslichkeit in Wasser zu erwarten. Pal-PKEK löste sich optisch bei einer Konzentration von 1 mg/mL in Wasser, wobei eine Schaumbildung zu beobachten war. Eine Bildung lyotroper Mesophasen ist ebenfalls möglich. Bei einer Konzentration von 1 mg/mL löste sich Pal-GEKG nicht in Wasser, 10 µg/mL lösten sich.

Tabelle 4: Löslichkeit in wässrigem Medium berechnet mittels ACD/Labs [198-202]

Bedingungen	GEKG	PKEK	LPA	LPBG	LPT
pH 1	1000 g/L	1000 g/L	1000 g/L	1000 g/L	1000 g/L
pH 2	1000 g/L	1000 g/L	1000 g/L	1000 g/L	1000 g/L
pH 3	220 g/L	1000 g/L	1000 g/L	1000 g/L	1000 g/L
pH 4	12 g/L	1000 g/L	1000 g/L	1000 g/L	1000 g/L
pH 5	3,7 g/L	1000 g/L	1000 g/L	1000 g/L	310 g/L
pH 6	3,0 g/L	1000 g/L	1000 g/L	1000 g/L	31 g/L
pH 7	3,5 g/L	110 g/L	1000 g/L	1000 g/L	3,7 g/L
pH 8	9,3 g/L	13 g/L	1000 g/L	1000 g/L	0,93 g/L
pH 9	70 g/L	3,4 g/L	762 g/L	738 g/L	0,70 g/L
pH 10	903 g/L	3,5 g/L	857 g/L	831 g/L	0,81 g/L
Wasser (ohne Puffer)	3,0 g/L (pH 6,04)	2,9 g/L (pH 9,5)	742 g/L (pH 9,31)	720 g/L (pH 9,30)	0,66 g/L (pH 9,05)

In Methanol (MeOH) zeigte nur GEKG bei einer Konzentration von 1 mg/mL einen Niederschlag. Stammlösungen für die Analytik wurden von diesem Peptid deshalb in Wasser hergestellt. In Acetonitril (ACN) fiel PKEK bei einer Konzentration von 1 mg/mL aus. In einer ACN-Wasser-Mischung (1:1) waren 500 mg/mL löslich.

3.2.3. Kalkulierte Parameter mit Einfluss auf das Penetrationsverhalten

Weitere physikochemische Parameter der Peptide, die das Penetrationsverhalten beeinflussen (siehe 2.1.2. Grundlagen der dermalen Wirkstoffaufnahme, Seite 4), wurden mittels MarvinSketch berechnet (Tabelle 5). Beim logP handelt es sich um den logarithmierten Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizient der nichtionischen Molekülspezies. Der logD ist als logarithmierter Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizient aller vorliegenden Spezies eines Stoffes definiert. Grundlage der logP-Prädiktion mittels MarvinSketch stellte

3. Eigenschaften der untersuchten Modellpeptide

ein Datensatz von 893 Verbindungen dar [203]. Für die Vorhersage des logD-Wertes ermittelt das Programm alle vorliegenden Ionisationsspezies bei dem gegebenen pH-Wert, sowie deren Verteilung. Der logD ergibt sich dann aus der Summe der Konzentrationen aller Mikrospezies in Octanol- und Wasserphase [204]. Die Anzahl der Wasserstoffbrückendonatoren entspricht der Anzahl an elektronegativen Atomen im Molekül, an die kovalent Wasserstoffatome gebunden sind (bezeichnet als „donor count“). Die Anzahl der Akzeptoren entspricht der Anzahl an Atomen im Molekül, die freie Elektronenpaare zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen besitzen (bezeichnet als „acceptor count“).

Tabelle 5: Übersicht über die physikochemischen Eigenschaften der untersuchten Peptide berechnet mittels MarvinSketch

	GEKG	Pal-GEKG	PKEK	Pal-PKEK	LPA	LPBG	LPT
Summenformel	C ₁₅ H ₂₇ N ₅ O ₇	C ₃₁ H ₅₇ N ₅ O ₇	C ₂₂ H ₄₀ N ₆ O ₇	C ₃₈ H ₇₀ N ₆ O ₈	C ₁₅ H ₂₈ N ₄ O ₄	C ₁₇ H ₃₂ N ₄ O ₄	C ₁₈ H ₃₄ N ₄ O ₅
molare Masse [g/mol]	389,40	627,81	500,60	739,00	328,41	356,46	386,49
logP	-3,83	1,78	-2,59	2,85	-1,41	-0,24	-1,27
logD_{IEP}	-9,45	-1,42	-8,63	-2,80	-4,31	-3,14	-4,15
H-Brücken-Donatoren	7	7	8	7	4	4	3
H-Brücken-Akzeptoren	9	9	10	10	6	6	7
PSA [Å²]	213,94	217,02	225,97	234,25	138,75	138,75	127,41

GEKG und PKEK besitzen als Tetrapeptide zahlreiche ionisierbare funktionelle Gruppen (Abbildung 6, Seite 12). Sie können daher in vielen verschiedenen Ionisationsspezies vorliegen, sind hydrophil und besitzen eine sehr große PSA. Die ausgeprägte Hydrophilie zeigt sich für beide Peptide in negativen logP-Werten. Der logD ist aufgrund der vorhandenen Ladungen in den Ionisationsspezies über einen pH-Bereich von 0-14 noch kleiner als der logP. Am IEP erreicht der logD sein Maximum. Für GEKG sind die logP und logD-Werte kleiner. PKEK besitzt hingegen eine größere molare Masse. Beide Peptide weisen über 10 Wasserstoffbrückendonatoren und -akzeptoren auf.

Die N-terminal palmitoylierten Peptide Pal-GEKG und Pal-PKEK besitzen durch die Verknüpfung mit einer Fettsäure lipophilere Eigenschaften als die unmodifizierten Peptide. Dies verdeutlichen die höheren logP- und logD-Werte. Dennoch sind die logD-Werte zwischen pH 0 und 14 bei beiden Peptidarten negativ. Dies ist damit zu erklären, dass sowohl die palmitoylierten, als auch die unmodifizierten Peptide über den gesamten pH-Bereich ionisiert vorliegen. Die Anzahl der Wasserstoffbrückenakzeptoren und -donatoren veränderte sich nicht. In der unmodifizierten Variante dient das N-terminale basische Amin als Donor und Akzeptor. In der palmitoylierten Variante steht das Stickstoffatom des Amids nicht als Akzeptor zur Verfügung, jedoch das Sauerstoffatom. Die PSA ist durch das zusätzliche Sauerstoffatom der Amidbindung etwas größer. Allerdings spielt das in Hinblick auf die Zunahme des unpolaren Oberflächenanteils eine untergeordnete Rolle. Um die lipophile Barriere der Haut besser zu überwinden, ist die höhere Lipophilie wahrscheinlich

vorteilhaft. Nachteilig könnte sich dagegen das höhere Molekulargewicht auf die Penetration auswirken.

Die drei Tripeptide LPA, LPBG und LPT weisen angesichts ihrer sehr ähnlichen Struktur vergleichbare physikochemische Eigenschaften auf (Tabelle 5). Sie haben eine ähnliche Molekülgröße im Bereich zwischen 328,41-386,49 g/mol und besitzen als Tripeptide viele ionisierbare Gruppen, was die sehr hydrophilen Eigenschaften bedingt. Letzteres spiegeln die negativen logP und logD-Werte wider. Die PSA von LPA und LPBG ist gleich infolge der gleichen Anzahl an Heteroatomen im Molekül und daran gebundenen Wasserstoffatomen. Aufgrund seiner tert-Butylgruppe anstelle der Di-Methylsubstitution am α -Kohlenstoff des Glycins besitzt LPBG die etwas höhere Lipophilie. LPA besitzt in der gleichen Position zwei Methylgruppen. Zwar weist LPT mit der Hydroxylgruppe des C-terminalen Threonins eine polare Gruppe mehr im Molekül auf als LPA und LPBG. Durch die Derivatisierung mit Methylgruppen am α -Stickstoff des Lysins und des Amidstickstoffs der Peptidbindung des Threonins ist die PSA jedoch leicht niedriger. LPT ist folglich lipophiler. Es besitzt höhere logD-Werte als LPA. Aufgrund ihrer moderaten Polarität ($PSA < 140 \text{ \AA}^2$), die durch chemische Modifizierungen erzielt wurde, sowie der akzeptablen Anzahl an Wasserstoffbrückenbindungspartnern (< 10) und Molekülgrößen ($< 500 \text{ Da}$) könnten LPA, LPBG und LPT in der Lage sein, in die Haut einzudringen. Die Penetrationsversuche werden zeigen, ob die ausgeprägte Hydrophilie diesen positiven Eigenschaften entgegen wirkt.

3.3. Extraktionsverfahren

Für LPA, LPBG und LPT wurde die Extrahierbarkeit aus den verwendeten Vehikelsystemen und Haut untersucht, um ein geeignetes Lösungsmittel für die Penetrationsversuche zu bestimmen. Es sollte weiterhin herausgefunden werden, ob und in welchem Ausmaß Haut- oder Formulierungsbestandteile und das Extraktionsmittel die Analytik beeinflussen. Für die übrigen Peptide war die Bestimmung der Extrahierbarkeit nicht nötig, da der in die Haut penetrierte Anteil im Versuch über Zugabe eines radioaktiven Tracers und Flüssigkeitsszintillationsmessung bestimmt wurde.

Voruntersuchungen hatten ergeben, dass LPA, LPBG und LPT gut in MeOH löslich sind (siehe 3.2.2. Löslichkeit, Seite 15). Allerdings sind darin auch Bestandteile der Formulierungen und der Haut sehr gut löslich, die die Analytik beeinflussen können. Da die hydrophilen Peptide sich ebenfalls gut in Wasser lösen, wurden dem Extraktionsmittel verschiedene Wasseranteile hinzugesetzt, um zu sehen, ob sich dies positiv auf die Wiederfindungsrate (WFR) auswirkt. Die Inkubationszeit wurde auf 100 min begrenzt, da davon ausgegangen wurde, dass die Peptide in Gegenwart von Hautbestandteilen abgebaut werden.

Die untersuchten Blindproben ergaben keine überlagernden oder störenden Signale im Chromatogramm. Allerdings wurden für die ME, Basiscreme DAC (BC) und Haut erhebliche Matrixeffekte nachgewiesen, die in den Chromatogrammen eine Vergrößerung oder

3. Eigenschaften der untersuchten Modellpeptide

Verkleinerung der Peakflächen bewirkten. Daher wurden dem Lösungsmittel (MeOH mit internem Standard), mit denen die Kalibrierstandards für die Versuche hergestellt wurden, die entsprechende Matrix hinzugefügt. Auch der Wasseranteil der verschiedenen Extraktionsmittel zeigte einen Matrixeffekt, der je nach weiteren Matrixbestandteilen (ME, BC, Haut) unterschiedlich ausgeprägt war. Damit dieser berücksichtigt wird, wäre es eine Möglichkeit, für jedes Extraktionsmittel eine gesonderte Kalibrierung zu erstellen. Um die Probenzahl gering zu halten und die Probenaufbereitung zu vereinfachen, wurde aber anhand eines Standards mit 5 µg/mL Peptid ein Korrekturfaktor ermittelt (Tabelle 6). Wasseranteile in der Probe vergrößerten die Peakflächen meist, vermutlich durch Ionisierungseffekte.

Tabelle 6: Korrekturfaktoren für den Extraktionsversuch

MeOH/H ₂ O (V/V)	LPA			LPBG			LPT		
	ME	BC	Haut+ME	ME	BC	Haut+ME	ME	BC	Haut+ME
90/10	1,1	1,1	0,9	1,2	1,3	1,0	1,5	3,1	1,2
70/30	1,1	1,2	1,0	1,5	1,3	1,0	1,7	3,2	1,2
50/50	1,1	3,2	1,0	1,4	2,3	1,0	2,1	3,5	1,3

Um den Einfluss des Wassergehalts der Probe auf die Analytik auszugleichen, wurden die WFR des Extraktionsversuchs mit dem entsprechenden Korrekturfaktor aus Tabelle 6 korrigiert. Tabelle 7 zeigt die korrigierten WFR der Peptide nach Extraktion aus ME, BC und Haut. Teilweise wurden Werte über 100 % erhalten. Dies könnte auf das experimentelle Vorgehen zurückzuführen sein. Beispielsweise könnte Verdunstung von Wasser bei der Herstellung der Formulierung oder das Verdunsten von Extraktionsmittel ursächlich sein.

Tabelle 7: Korrigierte WFR von LPA, LPBG und LPT nach Extraktion mit MeOH-Wasser-Mischungen aus ME, BC und Haut bezogen auf die eingesetzte Dosis; n=3, MW ± SD)

MeOH/H ₂ O (V/V)	LPA			LPBG			LPT		
	ME	BC	Haut	ME	BC	Haut	ME	BC	Haut
100/0	78 ± 18	102 ± 4	84 ± 21	101 ± 5	128 ± 9	67 ± 13	117 ± 10	124 ± 14	77 ± 5
90/10	97 ± 3	102 ± 6	99 ± 14	103 ± 7	113 ± 4	98 ± 12	102 ± 6	63 ± 3	66 ± 11
70/30	89 ± 3	90 ± 2	89 ± 4	96 ± 3	110 ± 3	80 ± 19	110 ± 6	52 ± 3	65 ± 3
50/50	96 ± 3	49 ± 5	103 ± 7	111 ± 6	94 ± 13	103 ± 9	110 ± 5	89 ± 16	69 ± 10

Die ME löste sich in MeOH und den MeOH-Wasser-Gemischen (90/10 und 70/30) und eine effektive Extraktion der Peptide wurde erzielt. Das 50/50-Gemisch war nicht in der Lage die lipophilen Formulierungsbestandteile vollständig zu lösen, sodass die Proben auch nach Filtration trüb waren. Da die emulgierten Formulierungsbestandteile die HPLC-Säule verunreinigen, wurde dieses Extraktionsmittel nicht für spätere Versuche gewählt, obwohl damit sehr gute WFR erzielt wurden.

Für die BC wurden die besten Extraktionsergebnisse mit 100 % MeOH und für LPA auch mit 90 % MeOH erzielt. Enthielt das Extraktionsmittel Wasser, lösten sich die lipophilen

Bestandteile der Creme schlechter und die WFR wurde kleiner. Da sich die lipophilen Cremebestandteile (Tagat S2, Myritol 318 und Vaseline) nicht vollständig in MeOH lösen, sollten im Penetrationsversuch geeignete Maßnahmen (z. B. Zentrifugation und Filtration) ergriffen werden, um diese abzutrennen.

Im Extraktionsversuch mit Haut wurde peptidhaltige ME auf die Haut aufgetragen. Wie im Versuch mit der ME resultierten mit dem 50/50-Gemisch trübe Proben, sodass dieses Extraktionsmittel trotz guter WFR für die Penetrationsversuche ausgeschlossen wurde. Das gute Extraktionsvermögen des 50/50-Gemischs lässt sich damit erklären, dass das enthaltene Wasser zur Quellung der Haut führt und sich die hydrophilen Peptide gut in diesem lösen. Für die übrigen Extraktionsmittel wurden tendenziell ähnliche Ergebnisse wie für die ME erzielt. Ein hoher MeOH-Anteil erwies sich als günstig, da dieser die Haut- und Formulierungsbestandteile anlässt und somit die Peptidextraktion ermöglicht.

Für die Penetrationsexperimente wurden die in Tabelle 7 rot markierten Lösungsmittelgemische verwendet. Die Lösungsmittelgemische, die bei der Extraktion aus den Formulierungen die besten WFR erzielten, wurden für die Gehaltsbestimmung und Extraktion der Tupper aus den Penetrationsversuchen verwendet. Für die Hautproben wurde jeweils das MeOH-Wasser-Gemisch ausgewählt, das im Extraktionsversuch mit Haut das beste Ergebnis gezeigt hatte.

3.4. Stabilität

Die dermale Verfügbarkeit der Peptide ist neben dem Penetrationsvermögen auch von der Anfälligkeit gegenüber metabolischen Prozessen in der Haut abhängig. Ähnlich wie in der Leber unterliegen Xenobiotika in der Haut enzymatischer Biotransformation durch Phase-I-Reaktionen (Funktionalisierung durch Oxidation, Reduktion, Hydrolyse) und Phase-II-Konjugationsreaktionen (Glucuronidierung, Sulfatierung, Methylierung) [205-209]. Peptide werden überwiegend durch Peptidasen hydrolysiert. Dabei kann die Hydrolyse N-beziehungsweise C-terminal stattfinden (Exopeptidasen), aber auch innerhalb der Sequenz durch aminosäurespezifische Endopeptidasen [56, 210].

Die Peptidstabilität wirkt sich erheblich auf die Ergebnisse von *ex vivo* Penetrationsversuchen aus. So kann ein Abbau der Peptide den Nachweis des penetrierten Anteils erschweren. In den Versuchen mit radioaktivem Material, wie sie für GEKG, Pal-GEKG, PKEK und Pal-PKEK durchgeführt wurden, werden neben den intakten Molekülen auch die Metaboliten mit der entsprechenden radioaktiven Markierung detektiert. Somit kann nicht unterschieden werden, ob das Peptid intakt penetriert ist oder nur Metaboliten. Bei der Quantifizierung der Peptide mittels LC-MS im Penetrationsversuch mit LPA, LPBG und LPT können Metaboliten deutlich von dem intakten Molekül abgegrenzt werden. Entstehende Abbauprodukte weisen eine abweichende Masse auf und zeigen

möglicherweise ein verändertes chromatographisches Verhalten. Ein Peptidabbau würde sich in einer geringen WFR bemerkbar machen [63].

Die Stabilität der Peptide wurde in Gegenwart von Humanhauthomogenat (HHH) untersucht. Dieses wurde aus verschiedenen kleineren Hautstückchen (Nabel, Ohr, juvenile Vorhaut) gewonnen (siehe 7.3.5. Untersuchung der Peptidstabilität in Gegenwart von Humanhauthomogenat, Seite 98). Zudem wurden wässrige Peptidlösungen in die Stabilitätsuntersuchungen einbezogen, die keine Hautbestandteile enthielten. Hierdurch sollte untersucht werden, ob nicht-enzymatische Stabilitätseinflüsse (z. B. Hydrolyse) bestehen.

3.4.1. Stabilität von GEKG, Palmitoyl-GEKG, PKEK und Palmitoyl-PKEK

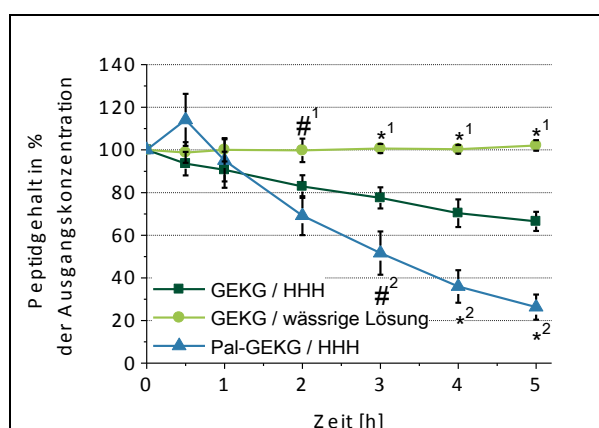


Abbildung 8: Stabilität von GEKG in wässriger Lösung mit und ohne Gegenwart von HHH und von Pal-GEKG in Gegenwart von HHH; n=3, MW ± SD, *p < 0,01, #p < 0,05, ¹GEKG: HHH vs. Lösung, ²GEKG in HHH vs. Pal-GEKG in HHH

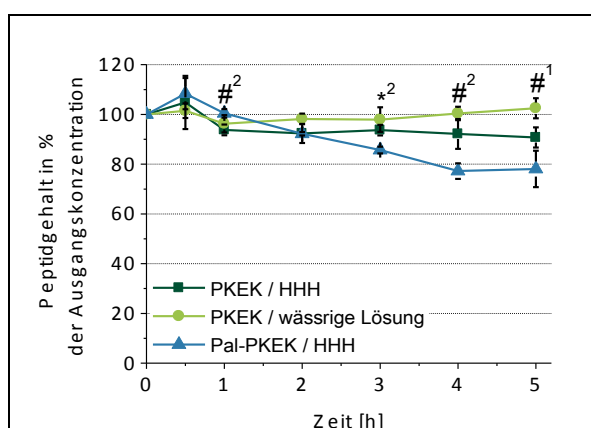


Abbildung 9: Stabilität von PKEK in wässriger Lösung mit und ohne Gegenwart von HHH und von Pal-PKEK in Gegenwart von HHH; n=3, MW ± SD, *p < 0,01, #p < 0,05, ¹PKEK: HHH vs. Lösung, ²PKEK in HHH vs. Pal-PKEK in HHH

Die Ergebnisse der Stabilitätsuntersuchungen für GEKG sind in Abbildung 8 dargestellt. Im untersuchten Zeitraum von fünf Stunden, was der längsten Versuchszeit in den geplanten Penetrationsstudien entspricht, konnte ohne Anwesenheit von Humanhaut kein Abbau von GEKG in wässriger Lösung festgestellt werden (hellgrün). In Gegenwart von Humanhaut war eine kontinuierliche Abnahme der Peptidkonzentration zu beobachten. Nach fünf Stunden betrug die Peptidkonzentration 66 % des Ausgangsgehalts (dunkelgrün). Im Vergleich dazu war bei dem palmitoylierten GEKG ein stärkerer Abbau in Gegenwart von HHH zu beobachten (blau), sodass nach fünf Stunden Versuchszeit nur noch 26 % der Ausgangskonzentration nachgewiesen werden konnten.

Die Ergebnisse der Stabilitätsuntersuchungen mit PKEK sind in Abbildung 9 dargestellt. Im untersuchten Zeitraum von fünf Stunden konnte ohne Anwesenheit von HHH analog zu GEKG keine Instabilität des Peptides in wässriger Lösung festgestellt werden (hellgrün). In Gegenwart von Humanhaut kam es lediglich zu einer leichten Konzentrationsabnahme, wobei sich der Peptidgehalt erst nach fünf Stunden signifikant von der Lösung ohne HHH

unterschied (dunkelgrün). Nach fünf Stunden betrug die Peptidkonzentration 90 % des Ausgangsgehalts. Auch das palmitoylierte Peptid wies eine bessere Stabilität als Pal-GEKG auf (blau). Jedoch war analog zu Pal-GEKG ein stärkerer Abbau erkennbar, als für das nicht-derivatisierte Peptid PKEK. Nach vier Stunden Versuchszeit konnte in Gegenwart von HHH eine Abnahme der Peptidkonzentration um 23 % beobachtet werden. Anschließend stagnierte die Abnahme, so dass die Peptidkonzentration nach fünf Stunden weiterhin bei ungefähr 77 % lag.

Das ein Abbau der Peptide lediglich in Gegenwart von Hautbestandteilen beobachtet wurde, ist auf die ausgeprägte metabolische Aktivität der Haut zurückzuführen. Welche Enzymunterklassen im Speziellen am Abbau von GEKG und PKEK beteiligt sind, kann anhand des Stabilitätsversuchs jedoch nicht abgeleitet werden, da die entstandenen Abbauprodukte nicht identifiziert wurden. PKEK wies im Versuch eine höhere Stabilität auf als GEKG. Dies kann auf die in PKEK N-terminal vorhandene Aminosäure Prolin zurückzuführen sein. Durch sterischen Einfluss wird der Angriff von Aminopeptidasen erschwert [176].

Bei der Acylierung der Tetrapeptide wurde Palmitinsäure kovalent an den α -Aminostickstoff der N-terminalen Aminosäure gebunden. Die gebildete Amidbindung ist vergleichsweise stabil [45]. Trotzdem waren die palmitoylierten Peptide im Vergleich zu den unmodifizierten jeweils instabiler. Möglicherweise wurde der Fettsäurerest enzymatisch abgespalten.

Für den Stabilitätsversuch kam HHH zum Einsatz, da Vollhaut aufgrund mangelnder Verfügbarkeit nicht verwendet werden konnte. Obwohl das HHH vermutlich eine veränderte metabolische Aktivität gegenüber der im Penetrationsexperiment eingesetzten Vollhaut aufweist [57, 211, 212], liefern die Stabilitätsexperimente wertvolle Erkenntnisse über die Abbaubarkeit der Peptide.

Das hergestellte HHH wurde bis zur weiteren Verwendung bei $-32\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Die Enzymaktivität in der Haut verringert sich jedoch nachweislich, wenn diese nach der Entnahme gekühlt aufbewahrt wird [207, 213]. Der Vergleich wässriger Peptidlösungen mit und ohne HHH belegt, dass der Peptidabbau für GEKG und PKEK auf Peptidasen der Haut zurückzuführen ist und diese trotz der tiefgekühlten Lagerung aktiv sind. Studien mit bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagerter Haut oder hitzeisolierter Epidermis von zuvor bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagerter Haut bestätigen dies [51, 83, 214]. Möglicherweise werden GEKG und PKEK in Gegenwart frischer Haut und *in vivo* schneller oder in stärkerem Ausmaß abgebaut.

Aus den Stabilitätsversuchen lässt sich schlussfolgernd ableiten, dass in Penetrationsversuchen mit dem Peptid PKEK die detektierte Radioaktivität sehr wahrscheinlich dem intakten Peptid entspricht. Für die anderen Peptide kann nicht

ausgeschlossen werden, dass Metaboliten miterfasst werden. Das Risiko dafür steigt mit zunehmender Inkubationszeit.

3.4.2. Stabilität von LPA, LPBG und LPT

LPA, LPBG und LPT sollten die im Penetrationsexperiment direkt mittels LC-MS quantifiziert werden. Weil dafür längere Inkubationszeiten als 300 min in Betracht gezogen wurden, wurde die Stabilität in Gegenwart von HHH über 1000 Minuten untersucht. Anhand der Stabilitätsdaten sind Rückschlüsse auf die WFR im Penetrationsversuch möglich. Deshalb sollten sie als Grundlage zur Festlegung der Versuchszeiten der Penetrationsexperimente herangezogen werden. Bei Peptidinstabilität sollte auf sehr lange Penetrationszeiten von 1000 min verzichtet werden.

Außerdem wurde die Stabilität der Peptidlösungen in Gegenwart von HHH mit Zusatz von 0,02 % des bakteriziden und fungiziden Natriumazids untersucht, um den Einfluss bakterieller Zersetzung durch von außen eingetragene Mikroorganismen abzuschätzen. Parallel wurde die Stabilität der wässrigen Peptidlösung ohne HHH bei 32 °C analysiert, um abzugrenzen, ob eventuell auftretende Instabilitäten im Versuch mit HHH auf die Anwesenheit der Haut zurückzuführen sind. Inwiefern die Peptidstabilität in wässriger Lösung durch die Temperatur beeinflusst wird, wurde mit gekühlt (8 °C) gelagerten Proben untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 10 zusammengefasst.

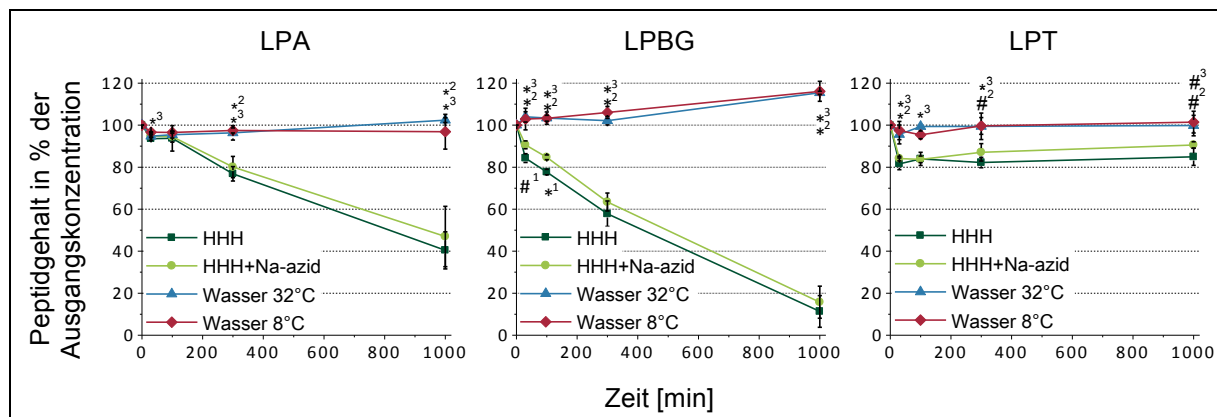


Abbildung 10: Stabilität von LPA, LPBG und LPT in wässriger Lösung in Gegenwart von HHH ohne und mit Zusatz von Natriumazid, sowie in wässriger Lösung ohne HHH bei 32 °C und 8 °C; n=3, MW ± SD, *p < 0,01 und #p < 0,05, ¹HHH vs. HHH+Na-azid, ²HHH vs. Wasser 32 °C, ³HHH vs. Wasser 8 °C

Für LPA, LPBG und LBT konnte in wässriger Lösung weder nach Inkubation bei 32 °C, noch bei Lagerung im Kühlschrank (8 °C) Peptidabbau nach 1000 min beobachtet werden. Die Zunahme des LPBG-Gehalt auf 115 % nach 1000 min ist auf experimentelle Fehler zurückzuführen, wobei Verdunstung ausgeschlossen werden kann, da Eppendorf Safe-Lock Tubes verwendet wurden.

In Gegenwart von HHH nahm die Peptidkonzentration jeweils ab. Dies weist auf einen Abbau durch Hautenzyme hin. LPBG zeigte die stärkste Konzentrationsabnahme. Nach 300 min war der LPBG-Gehalt bereits auf 58 % in der wässrigen Lösung abgesunken und bei der Natriumazid-haltigen auf 63 %. Am Ende der Versuchszeit nach 1000 min konnten nur noch 11 % von LPBG in der wässrigen und 16 % in der Natriumazid-haltigen Lösung nachgewiesen werden. Auch für LPA war eine erhebliche Konzentrationsabnahme im Stabilitätsversuch zu verzeichnen. Nach 30 und 100 min lag der LPA-Gehalt noch bei 94-95 % der Ausgangskonzentration. Anschließend folgte eine Abnahme des Gehalts bis auf 77-80 % nach 300 min. Nach 1000 min betrug der LPA-Gehalt in der wässrigen Lösung nur noch 40 % und in der Natriumazid-haltigen Lösung 47 %. Als stabilstes der drei Peptide erwies sich LPT. Auch in Gegenwart von HHH war nur ein geringfügiger Abbau nachweisbar. Zu allen Zeiten betrug der LPT-Gehalt zwischen 80 und 90 % der Ausgangskonzentration.

Für LPBG war der Gehalt in Natriumazid-haltigen Lösungen ca. 5 % höher als in den Lösungen ohne das antimikrobielle Agens. Dieser Unterschied war jedoch nur nach 30 und 100 min signifikant. Für LPA und LPT konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen der wässrigen Lösung und der Lösung mit Natriumazid nachgewiesen werden. Der Einfluss von außen eingetragener Mikroorganismen scheint demnach eher eine untergeordnete Rolle zu spielen. Eine Konservierung des Akzeptormediums mit Natriumazid, die teilweise in Penetrationsversuchen praktiziert wird [215, 216], ist somit nicht nötig.

Wie bereits für GEKG und PKEK diskutiert, liefert der Stabilitätsversuch mit HHH wertvolle Informationen über die Stabilität der Peptide LPA, LPBG und LPT. Im Penetrationsversuch mit Vollhaut, sowie *in vivo* oder bei Verwendung von frischer Haut könnte der Abbau schneller und in höherem Ausmaß stattfinden. Für die Penetrationsexperimente ist weiterhin festzuhalten, dass auf eine zu lange Versuchszeit von 1000 Minuten verzichtet werden sollte, da für LPA und LPBG mit sehr geringen WFR zu rechnen wäre. 30, 100 und 300 min sind als Versuchszeiten geeignet.

Bei der Entwicklung von LPA, LPBG und LPT wurden modifizierte Aminosäuren eingesetzt. Dies kann die Anfälligkeit gegenüber enzymatischer Metabolisierung reduzieren. LPA enthält beispielsweise die nicht-proteinogene Aminosäure Aib. Für Peptide, in denen Alanin gegen Aib ausgetauscht wurde, belegten Geotti-Bianchini *et al.* eine erhöhte Resistenz gegenüber enzymatischem Abbau [53]. In LPBG ist an das C-terminal vorhandene Glycin eine tertiäre Butylgruppe angefügt, um den Abbau durch Carboxypeptidasen zu unterbinden. LPT enthält mehrere modifizierte Aminosäuren. N-terminal befinden sich zwei Methylgruppen am Lysin und auch das C-terminale Threonin ist N-methyliert, sodass ein Abbau durch Exopeptidasen erschwert wird [54, 55]. Weiterhin wurde als zentrale Aminosäure anstelle von L-Lysin das D-Isomer verwendet, was ebenfalls nachweislich zu einer erhöhten Stabilität beitragen kann [51, 52, 56].

3. Eigenschaften der untersuchten Modellpeptide

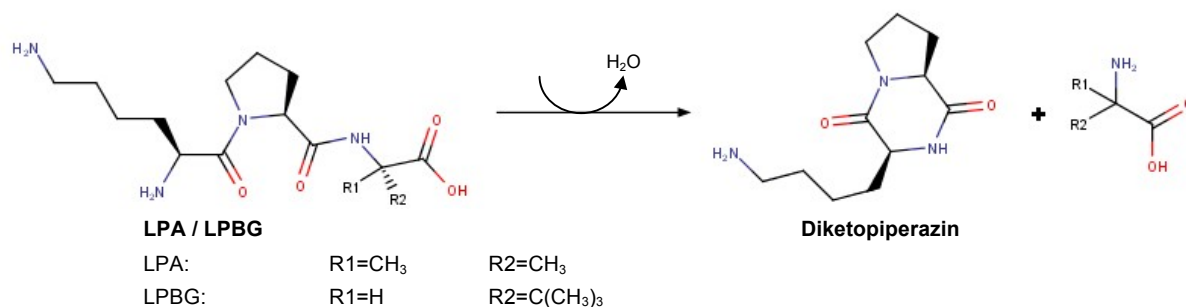


Abbildung 11: Mögliche Abbaureaktion von LPA und LPBG zum Diketopiperazin

Trotz der chemischen Modifizierungen wurden die Peptide LPA und LPBG mit der Zeit zunehmend abgebaut. Ein potentielles Abbauprodukt stellt das zyklische Diketopiperazin ($M=225 \text{ g/mol}$) dar, das durch nukleophilen Angriff des Stickstoffatoms am Carbonylkohlenstoff der Amidbindung unter Abspaltung von Wasser entstehen kann (Abbildung 11) [217]. Diese Reaktion könnte eventuell durch Einstellung und Stabilisierung eines leicht sauren pH-Wertes mittels Puffersystem verhindert werden. LPT kann dieses Abbauprodukt nicht bilden, da die zwei N-terminalen Methylgruppen die intramolekulare Cyclokondensation verhindern. Dies würde die bessere Stabilität dieses Peptids im Versuch erklären.

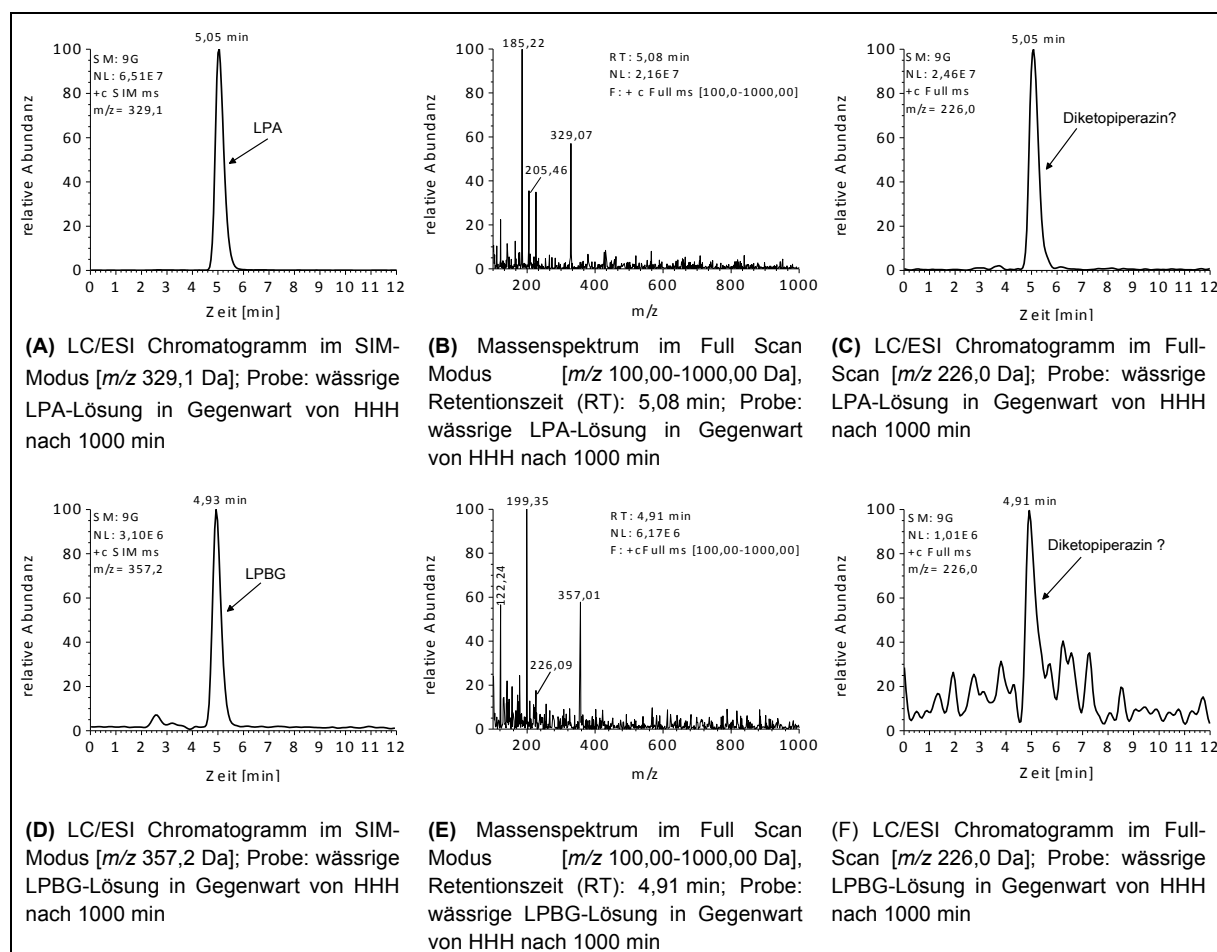


Abbildung 12: LC/ESI-MS Chromatogramme und Spektren von LPA- und LPBG-Proben der Stabilitätsversuche in Gegenwart von HHH nach 1000 min Versuchszeit

Um herauszufinden, ob Diketopiperazin tatsächlich als Abbauprodukt von LPA und LPBG entsteht, wurden Chromatogramme und Massenspektren verschiedener LPA- und LPBG-Proben des Stabilitätsversuchs auf das Vorhandensein der Diketopiperazin-Masse ($[M + H]^+$ m/z 226,0) hin untersucht. Sowohl in Lösungen, die 1000 min in Gegenwart von HHH gelagert wurden (Abbildung 12B, C, E, F), als auch in frischen Kalibrierstandards und Stabilitätsproben ohne HHH (ohne Abbildung) waren Signale für die Masse 226,0 nachweisbar. Diketopiperazin entsteht demnach möglicherweise bereits in frisch hergestellten Proben. Anhand der ausgewerteten Chromatogramme konnte nicht belegt werden, dass die Konzentrationsabnahme des Stabilitätsversuchs auf die Bildung des Cyclisierungsprodukts zurückzuführen ist. In Chromatogrammen von LPT-Proben war die Masse 226,0 erwartungsgemäß nicht nachweisbar.

In den Massenspektren von LPA und LPBG (Abbildung 12B, E) wurden neben den Massen der einfach protonierten Peptide (m/z $[LPA+H]^+$ 329,06; m/z $[LPBG+H]^+$ 357,01) und des Diketopiperazin (m/z \sim 226) weitere Massen detektiert. Diese konnten Ionisationsaddukten, die beispielsweise mit Bestandteilen des Laufmittels gebildet wurden (m/z $[LPA+ACN+2H]^{2+}$ 185,23; m/z $[LPBG+ACN+2H]^{2+}$ 199,35), zugeordnet werden. Im Fall von LPA könnte auch die Masse 226,0 auf ein Ionisationsaddukt zurückzuführen sein ($[LPA+3ACN+2H]^{2+}$) [218, 219].

Schlussendlich konnten mit der verwendeten chromatographischen Methode keine Abbauprodukte identifiziert werden, die ausschließlich in Gegenwart der Hautbestandteile gebildet werden. Es können daher keine Rückschlüsse auf am Abbau beteiligte Enzymunterklassen getroffen werden. Vermutlich sind sogar mehrere Enzymunterklassen am Metabolismus in der Haut beteiligt. Daher ist ein Zusatz von aminosäurespezifischen Peptidaseinhibitoren zu Gebrauchslösungen oder dem Akzeptormedium im Penetrationsversuch als nicht sinnvoll zu bewerten. Bestätigt wird dies beispielsweise durch die Arbeit von Abla *et al.*, bei der der Zusatz des Trypsininhibitors Benzamidin zum Akzeptormedium den Peptidabbau nicht minimierte [51]. Dagegen hat sich der Einsatz eines Chelatbildners, wie Phenanthrolin zur Hemmung von Metalloenzymen, zu denen auch Aminopeptidasen, Carboxypeptidasen und Endopeptidasen gehören, wiederholt als vorteilhaft erwiesen [214, 220, 221].

4. Mikroemulsionen zur Applikation von Peptiden auf die Haut

ME besitzen penetrationsfördernde Eigenschaften und sollten daher verwendet werden, um die Peptide trotz ihrer für die dermale Verfügbarkeit nachteiligen Eigenschaften an ihr jeweiliges Zielkompartiment zu transportieren.

4.1. Entwicklung der Mikroemulsionen

Bei der Auswahl der Hilfsstoffe stand vor allem die Hautverträglichkeit im Vordergrund. Angesichts des meist hohen Emulgatorgehalts in ME wurden deshalb möglichst nichtionische Emulgatoren für die Entwicklung neuer Systeme präferiert. Zudem wurde der Emulgatorgehalt auf 25 % begrenzt. Ethoxylierte Tenside (PEG und PEG-Derivate) wurden ausgeschlossen, da ihr Einsatz in kosmetischen Produkten kritisch betrachtet wird. Sie stehen in Verdacht bei längerer Anwendung die Haut auszutrocknen, da sie Lipidbestandteile des SC anlösen. Außerdem enthalten sie kanzerogene Verunreinigungen (Ethylenoxid und 1,4-Dioxan) [222]. Als Co-Solventien sollten Glykole anstelle toxischer kurz- und mittelkettiger Alkohole verwendet werden [118]. Der Anteil der hydrophilen Phase sollte mindestens 5 % betragen, um eine ausreichende Solubilisierung der hydrophilen Peptide zu ermöglichen.

Polyglycerolfettsäureester (PGFE) stellen eine große Substanzklasse mit breitem Spektrum an HLB-Werten dar. Durch Polymerisation können bis zu 30-Glycerol-Einheiten verknüpft werden. Die Hydroxylgruppen der Polyglyceroleinheit werden mit verschiedenen Fettsäuren in unterschiedlicher Anzahl verestert. PGFE sind bioabbaubar und physiologisch unbedenklich und finden breite Anwendung in der Lebensmittel- und Kosmetikindustrie, sowie in pharmazeutischen Produkten [223-226]. Sie bildeten daher in dieser Arbeit die Grundlage für die Entwicklung neuer ME.

Tabelle 8: Emulgatorkombinationen die mit 5 % Wasser und 70 % IPM klare Mischungen ergeben

Emulgatoren: Handelsname, chemische Bezeichnung/Zusammensetzung (HLB-Wert)		Mischungsverhältnis (m/m)
Tego [®] SMO V / Span 80, Sorbitanmonooleat (~ 4)	Tego [®] Care PL4, Polyglyceryl-4-laurat (11)	1:2
Isolan [®] GPS, Polyglyceryl-4-diisostearat / - polyhydroxystearat/-sebacat (5)	Phosal [®] 50 SA+ (4 / 7 / 9), 50% Phosphatidylcholin aus Soja mit Distelöl	1:2
Isolan [®] GPS, Polyglyceryl-4-diisostearat / -polyhydroxystearat/-sebacat (5)	Phosal [®] 53 MCT (4 / 7 / 9), 53 % Phosphatidylcholin aus Soja mit Mittelkettigen Triglyceriden	1:2
Isolan [®] GPS, Polyglyceryl-4-diisostearat / -polyhydroxystearat/-sebacat (5)	Phospholipon [®] 90 G (4 / 7 / 9), Phosphatidylcholin aus Soja, min. 90 %	3:2

Für die Herstellung von ME wurden PGFE häufig mit ethoxylierten Tensiden kombiniert. Dabei wurden O/W- und W/O-Systeme erhalten [123, 126, 227-237]. Einige Arbeiten verzichteten darauf und kombinierten die PGFE miteinander oder mit Co-Solventien, Lecithin, Sucroseestern und Sorbitanfettsäureestern [238-244]. Dieser Weg wurde auch in der vorliegenden Arbeit verfolgt. Gemische aus PGFE und nichtionischen Emulgatoren, beispielsweise Sorbitanfettsäureestern und Betainen, wurden in unterschiedlichen Verhältnissen (2:1, 3:2, 1:1, 2:3, 1:2) hergestellt. Lecithine, die zu den amphoteren Tensiden gehören, kamen aufgrund ihrer natürlichen Herkunft und günstigen toxikologischen Eigenschaften ebenfalls zum Einsatz. Anschließend wurde Wasser als hydrophile Komponente hinzugesetzt und schrittweise Isopropylpalmitat (IPP), Isopropylmyristat (IPM) oder TEGOSOFT® CI (INCI: Cetearyl Isononanoate) als lipophiler Bestandteil hinzugefügt. Auf diese Weise wurden 54 Emulgatorkombinationen getestet. Fünf ergaben mit je 5 % Wasser, 25 % Emulgatorgemisch und 70 % IPM klare, stabile Formulierungen (Tabelle 8). Die erste Mischung mit dem Emulgatorsystem Sorbitanmonooleat/Polyglyceryl-4-laurat (1:2), die im Folgenden mit prä-ME1 bezeichnet wird, ergab auch mit IPP und TEGOSOFT® CI klare, stabile Systeme. Sie wurde für weitere Untersuchungen priorisiert.

In die ME sollen bis zu 1 % der verschiedenen Peptide eingearbeitet werden. Dabei ist eine Anreicherung der Peptide in der kolloidalen Phase gewünscht. Um eine ausreichende Solubilisierungskapazität auch für die lipophileren palmitoylierten Peptide zu gewährleisten, wurden der hydrophilen Komponente der prä-ME1 verschiedene Glykole hinzugesetzt. Mit dem Zusatz eines Glykols zur wässrigen Phase einer ME kann auch ein größerer isotroper Bereich im Phasendiagramm des Systems erreicht werden [245, 246]. Glykole besitzen zudem penetrationsfördernde und antimikrobielle Eigenschaften und fungieren somit gleichzeitig als Konservierungsmittel [70, 247].

Gemische verschiedener Verhältnisse (2:1, 1:1, 1:2) aus Wasser und Propylenglykol (PrG), 1,3-Butylenglykol (BuG) oder 1,2-Pentylenglykol (PeG) wurden als hydrophile Phase für die prä-ME1 eingesetzt. Dabei entstanden mit PeG teilweise trübe Mischungen. Möglicherweise lagerte sich das längerkettige Glykol in die emulgatorreiche Grenzfläche und führte so zum Brechen der Mischungen. Favorisiert wurde BuG, weil dies ebenso Bestandteil des Standardvehikels war, das für die Peptide GEKG, PKEK, Pal-GEKG und Pal-PKEK verwendet wurde. Die optimierte prä-ME1 mit Wasser/BuG (1:1) als hydrophile Phase und IPP als lipophile Phase wird nachfolgend ME1 genannt.

Zusätzlich zur ME1 wurden weitere Emulgatorkombinationen ausfindig gemacht, die mit 10 % Wasser-Glykol-Gemisch als hydrophile Komponente, 25 % Emulgatorgemisch und 65 % Öl klare Mischungen ergaben. Wie bereits Constantinides *et al.* festgestellt hatten, erwies sich die Kombination von Emulgatoren mit geringem und hohem HLB als günstig, um W/O-ME zu erhalten [248]. Eine Übersicht über alle entwickelten Systeme ist in Tabelle 9 dargestellt. Für die weiteren Untersuchungen wurden die ME1 und ME2 ausgewählt. Die

4. Mikroemulsionen zur Applikation von Peptiden auf die Haut

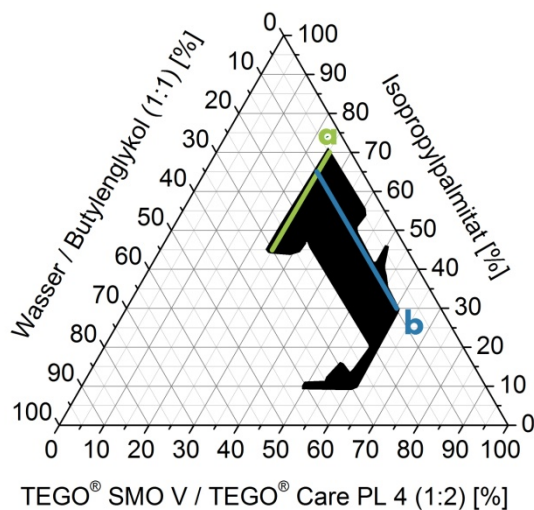
Eigenschaften der Bestandteile dieser ME werden in Anhang A: Eigenschaften der Mikroemulsionsbestandteile ab Seite 131 beschrieben.

Tabelle 9: Emulgatorkombinationen die mit 10 % Wasser-Glykol-Gemisch und 65 % Öl klare Mischungen ergeben

Emulgatoren (HLB-Wert) und deren Mischungsverhältnis (m/m)			hydrophile Phase (10 %)	lipophile Phase (65 %)
ME1	Tego® SMO V / Span 80, Sorbitanmonooleat (4)	Tego® Care PL4, Polyglyceryl-4-laurat (11)	1:2 H ₂ O/BuG (1:1)	TEGOSOFT® P IPP
ME2	Isolan® GO 33, Polyglyceryl-3-oleat (~5)	Hydriol® PGC.3, Polyglyceryl-3-caprat (14)	2:3 H ₂ O/PeG (2:1)	
ME3	Isolan® GPS, Polyglyceryl-4-diisostearat/-polyhydroxystearat/-sebacat (5)	Tego® Care PL4, Polyglyceryl-4-laurat (11)	2:3 H ₂ O/PeG (2:1)	
ME4	Isolan® GPS, Polyglyceryl-4-diisostearat/-polyhydroxystearat/-sebacat (5)	Tego® Care PL4, Polyglyceryl-4-laurat (11)	2:3 H ₂ O/BuG (1:1)	
ME5	Hydriol® PGO, Polyglyceryl-4-oleat (3)	Tego® Care PL4, Polyglyceryl-4-laurat (11)	1:1 H ₂ O/PrG (1:2)	
ME6	Hydriol® PGO, Polyglyceryl-4-oleat (3)	Tego® Care PL4, Polyglyceryl-4-laurat (11)	1:2, 2:3, 1:1, 3:2 H ₂ O/PeG (2:1)	
ME7	Isolan® PDI, Diisostearoyl Polyglyceryl-3 Dimer Dilinoleat (5)	Tego® Care PL4, Polyglyceryl-4-laurat (11)	2:1 H ₂ O/PeG (2:1)	TEGOSOFT® DC Decylcocoat
ME8	Isolan® PDI, Diisostearoyl Polyglyceryl-3 Dimer Dilinoleat (5)	Hydriol® PGCH.4, Polyglyceryl-4-caprat (16)	2:1 H ₂ O/PeG (2:1)	
ME9	Isolan® PDI, Diisostearoyl Polyglyceryl-3 Dimer Dilinoleat (5)	Hydriol® PGC.3, Polyglyceryl-3-caprat (14)	1:1 H ₂ O/PeG (2:1)	

4.2. Phasendiagramme

A



B

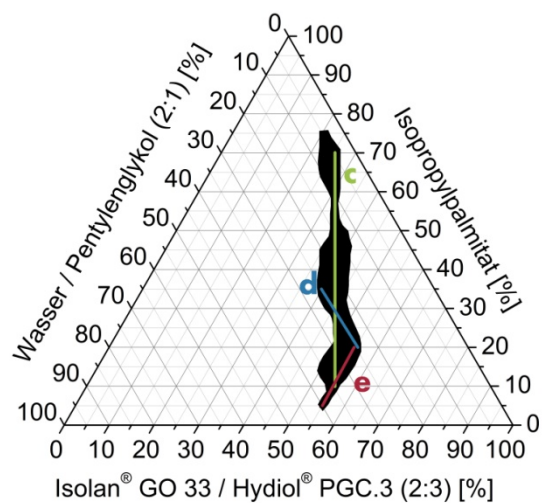


Abbildung 13: Pseudoternäre Phasendiagramme der ME1 (A) und ME2 (B) mit Markierung des isotropen Bereichs (schwarz) und der Dilutionsreihen a-e (a, c: grün; b, d: blau; e: rot), die zur weiteren Charakterisierung genutzt wurden; Mengenangaben in % (m/m)

In einem pseudoternären Phasendiagramm wird die Konzentration des Emulgatorgemisches gegen die Konzentration der hydrophilen und lipophilen Phase dargestellt. Durch Markierung der Mischungsverhältnisse, die einphasige, niedrigviskose, optisch isotrope Zubereitungen ergaben, ist eine Beurteilung der Lage und Größe des Mikroemulsionsgebiets möglich.

Dem pseudoternären Phasendiagramm für ME1 in Abbildung 13A ist zu entnehmen, dass das isotrope Gebiet eine weite Ausdehnung aufweist. Dies ist von Vorteil, da die ME bei Anwendung auf der Haut physikalischen Einflüssen wie beispielsweise Verdunstung des Wassers oder Vermischung mit Bestandteilen der Hautoberfläche und Hautlipiden ausgesetzt ist. Mit einem großen Phasengebiet ist es dennoch möglich, dass die ME-Struktur erhalten bleibt. Im Bereich zwischen 25-60 % Emulgatorkonzentration entstanden MEs mit einem Gehalt der hydrophilen Komponente zwischen 5 und 20 % und teilweise sogar bis 40 %. Bei einer Emulgatorkonzentration über 60 % entstanden hochviskose klare Mischungen, bei denen es sich vermutlich um flüssigkristalline Phasen handelte.

Das isotrope Gebiet der ME2 in Abbildung 13B ist zwar schmal, erstreckt sich jedoch über einen weiten Emulgatorkonzentrationsbereich zwischen 20–55 %. Mit geringem Emulgatorgehalt entstanden ME in Kombination mit hoher Ölkonzentration und wenig hydrophiler Phase. Bei höherer Emulgatorkonzentration enthielten die klaren Mischungen etwas mehr hydrophile Komponente als Öl.

Eine Vergrößerung des Phasengebiets, vor allem eine Reduzierung der Emulgatorkonzentration, kann durch die Erhöhung der Glykolkonzentration erreicht werden [245, 246, 249]. Dieses wirkt nicht nur solubilisierend auf die Öl- und Wasserphase, sondern kann sich als Co-Emulgator auch in die Grenzfläche einlagern und dort die Fluidität erhöhen [246, 249]. Des Weiteren wäre der Einsatz eines alternativen Glykols oder Öls möglich. Mehrfach wurde gezeigt, dass tendenziell länger-kettige Glykole zu einem vergrößerten Mikroemulsionsgebiet im pseudoternären Phasendiagramm führen [246, 250, 251]. Für W/O-Systeme können vergrößerte Mikroemulsionsgebiete resultieren, wenn Öle mit kleiner Molekülmasse verwendet werden [252].

In den pseudoternären Phasendiagrammen der ME 1 und ME 2 sind Dilutionsreihen (a-e) eingezeichnet (Abbildung 13). Mischungen wurden entlang dieser Dilutionsreihen hergestellt und zur weiteren Charakterisierung des isotropen Phasengebiets verwendet. Die prozentuale Zusammensetzung dieser Mischungen ist in Tabelle 24 in Anhang B: Zusammensetzung der Mikroemulsionen für die physikochemische Charakterisierung, Seite 134 aufgeführt.

4.3. Physikochemische Charakterisierung

Üblicherweise werden zur physikochemischen Charakterisierung von ME verschiedene, komplementäre Methoden kombiniert, um fehlerhafte Interpretationen gemessener Artefakte, die infolge methodischer oder präparativer Fehler auftreten können, zu vermeiden. Die erhaltenen Informationen geben umfassende Einblicke in die Mikrostruktur der Systeme. Außerdem kann festgestellt werden, ob es sich bei optisch klaren Systemen der Phasendiagramme zweifelsfrei um ME handelt. Eine Abgrenzung gegenüber mizellaren Lösungen oder anderen flüssigkristallinen Strukturen soll so zuverlässig sichergestellt werden [108, 114, 253].

4.3.1. Polarisationsmikroskopie

Mit Hilfe der Polarisationsmikroskopie kann belegt werden, dass es sich bei klaren Mischungen tatsächlich um ME handelt. Diese sind optisch isotrop, zeigen daher keine Doppelbrechung und ergeben ein schwarzes Bild im polarisationsmikroskopischen Betrachtungsfeld. Eine Abgrenzung gegenüber anisotropen, optisch doppelbrechenden, flüssigkristallinen Phasen, für die charakteristische, bunte Texturen resultieren, ist somit gegeben. Alle klaren Mischungen des Phasendiagramms der ME1 und ME2 wurden mittels Polarisationsmikroskop untersucht. Optisch isotrope Formulierungen wurden im pseudoternären Phasendiagramm dem Mikroemulsionsgebiet zugeordnet (siehe 4.2. Phasendiagramme, Seite 29). Für das System der ME1 wurden bei Emulgatorkonzentrationen ab 65 % runde Strukturen im polarisationsmikroskopischen Bild erhalten. Diese wurden nicht weiter charakterisiert. Es könnte sich um ungelöste Emulgatorbestandteile oder flüssigkristalline Phasen handeln. Letzteres würde die Viskositätszunahme in diesen Gemischen erklären.

4.3.2. Rheologische Eigenschaften

Durch rheologische Untersuchungen ist es möglich, einen Einblick in den strukturellen Aufbau von ME zu gewinnen. Die dynamische Viskosität (auch Scherviskosität) stellt dabei ein Maß für die innere Reibung im System dar und ist abhängig von Art und Menge der Bestandteile der ME. ME besitzen im Allgemeinen eine geringe dynamische Viskosität weit unter 300 mPa·s [112]. Somit ist eine Abgrenzung gegenüber flüssigkristallinen Phasen möglich, die aufgrund ihrer Anisotropie eine höhere Viskosität aufweisen. ME zeigen zudem in der Regel Newtonsches Fließverhalten [108, 254-258]. Bei bikontinuierlichen Systemen, sowie bei sehr hohen Scherraten kann auch strukturviskoses Verhalten (auch: pseudoplastisches Fließverhalten oder Scherverdünnung) vorkommen [259].

Die Rheogramme der untersuchten ME1 sind in Abbildung 14 dargestellt. Für die Proben a¹-a⁶ mit 25 % Emulgatorgehalt, sowie die Mischungen b¹-b⁵ mit 10 % hydrophilem Anteil ist die dynamische Viskosität bei steigender Scherrate konstant. Es handelt sich um

idealviskoses Verhalten, das für newtonsche Systeme charakteristisch ist. Lediglich bei der Mischung b^0 mit 20 % Emulgatorgehalt war eine leichte Abnahme der dynamischen Viskosität mit zunehmender Scherrate, also Scherverdünnung zu beobachten (Abbildung 14B). Dieses Gemisch befindet sich an der Grenze zum Mikroemulsionsgebiet und stellt keine ME dar.

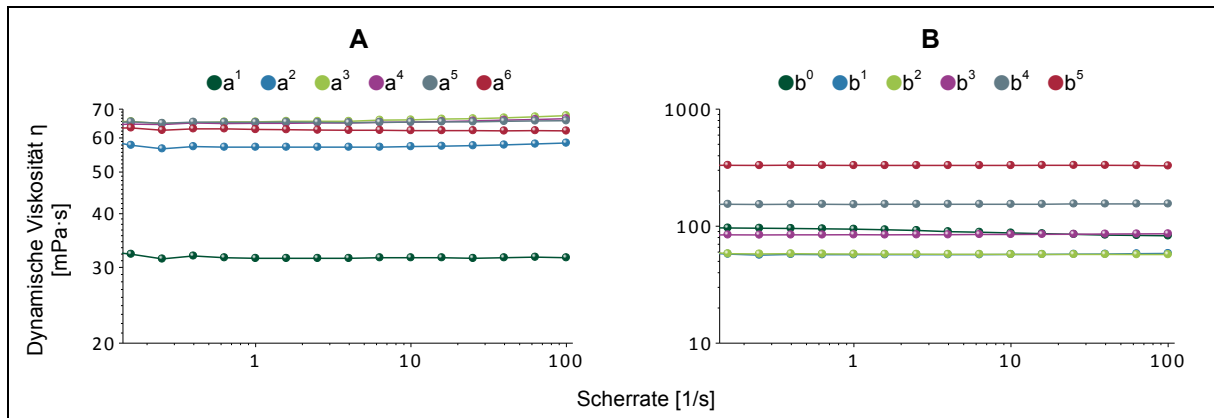


Abbildung 14: Dynamische Viskosität der ME1 entlang A) der Reihe a und B) der Reihe b in Abhängigkeit von der Scherrate

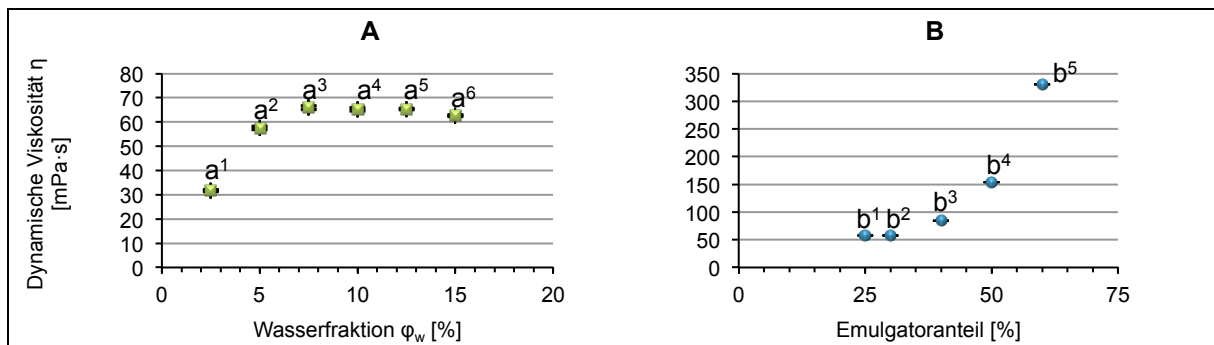


Abbildung 15: Dynamische Viskosität der ME1 entlang Reihe a in Abhängigkeit vom Wassergehalt (A) und Reihe b in Abhängigkeit vom Emulgatorgehalt (B) (n=16, MW \pm SD)

Abbildung 15 zeigt die dynamische Viskosität der isotropen Mischungen entlang der Verdünnungsreihen a und b in Abhängigkeit von der Wasser- und Emulgatorkonzentration. Die dynamische Viskosität der ME mit 25 % Emulgatorgehalt (a^1 – a^6) war mit 32–66 mPa·s gering (Abbildung 15A). Mit zunehmendem Wassergehalt nahm für die Mischungen a^1 bis a^3 die Viskosität zu. Eine weitere Zunahme der hydrophilen Phase in a^4 bis a^6 beeinflusste die Viskosität des Systems nicht mehr. Das Erreichen dieses Viskositätsmaximums weist auf einen Übergang von einer W/O-ME zu einem bikontinuierlichen System hin [254, 259-262].

Entlang Verdünnungsreihe b (Abbildung 15B) mit konstantem Anteil der hydrophilen Phase von 10 % zeigten die Mischungen b^1 und b^2 mit geringem Emulgatorgehalt ähnlich geringe Viskositätswerte von 57 mPa·s. Durch Erhöhung der Emulgatorkonzentration kam es zu einem starken Anstieg der dynamischen Viskosität auf 330 mPa·s bei b^5 mit 60 % Emulgatorgehalt. Dies kann darauf zurückgeführt werden, dass in b^1 und b^2 mit 10 % hydrophiler Phase eine ausreichend große Menge Lösungsmittel zur Hydratisierung und

4. Mikroemulsionen zur Applikation von Peptiden auf die Haut

Solubilisierung der enthaltenen Emulgatoren zur Verfügung stand. Ab b^3 mit 40 % Tensidanteil dominiert der Einfluss der enthaltenen Emulgatoren, die selbst eine hohe dynamische Viskosität aufweisen. Sie beträgt für TEGO® SMO V 800–1200 mPa·s und für TEGO® Care PL 4 ca. 38000 mPa·s [263, 264]. Die hohe dynamische Viskosität von b^5 weist daraufhin, dass es sich nicht mehr um eine ME handelt [259]. Vielmehr könnte es sich aufgrund der hohen Emulgatorkonzentration um eine flüssigkristalline Phase handeln. Diese zeigen normalerweise nichtnewtonsches Fließverhalten [254, 258, 265]. Für das vorliegende System sind eventuell höhere Scherraten nötig, um dies nachzuweisen.

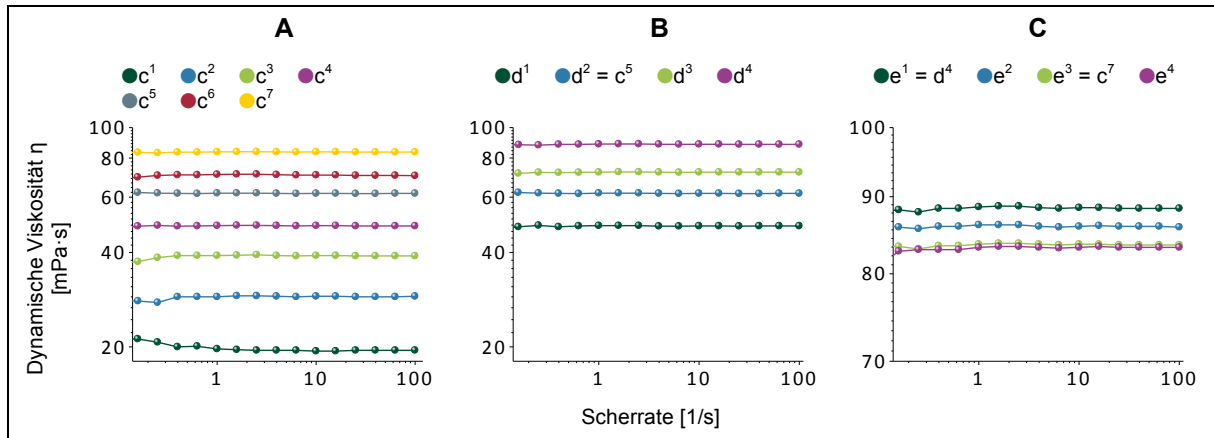


Abbildung 16: Dynamische Viskosität der ME2 entlang der A) Reihen c, B) Reihe d und C) Reihe e in Abhängigkeit von der Scherrate

Abbildung 16 zeigt die Rheogramme der ME2. Idealviskoses Verhalten wurde für die Mischungen c^2 – c^7 mit steigendem Anteil an Emulgator und hydrophiler Phase, d^1 – d^4 mit 25 % hydrophilem Anteil und e^1 – e^4 mit 55 % Emulgatorgemisch nachgewiesen. Die dynamische Viskosität war von der Scherrate unabhängig. Eine Tendenz zur Scherverdünnung war für Mischung c^1 zu beobachten, da die Viskosität mit steigender Scherrate leicht abnahm (Abbildung 16 A). Dieses System befindet sich am Rand des isotropen Gebiets und könnte folglich keine ME sein.

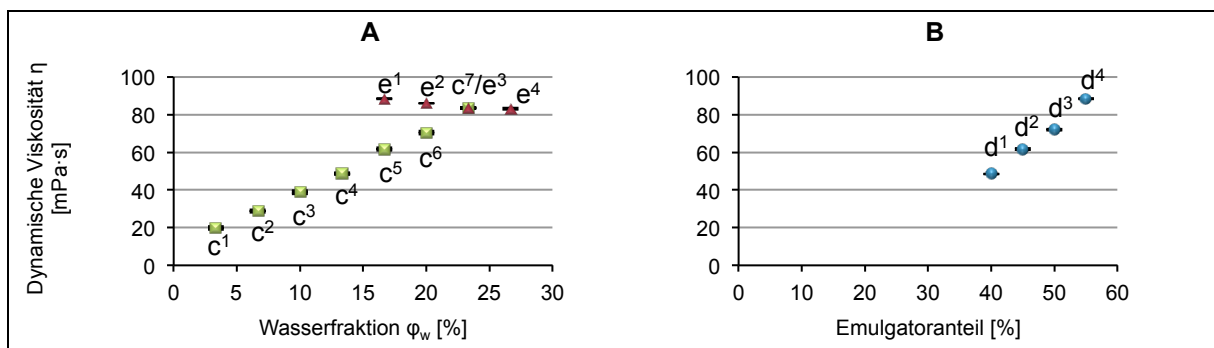


Abbildung 17: Dynamische Viskosität der ME2 entlang Reihe c und e in Abhängigkeit vom Wassergehalt (A) und Reihe d in Abhängigkeit vom Emulgatorgehalt (B) (n=16, MW ± SD)

Abbildung 17 zeigt die dynamische Viskosität der untersuchten Systeme der ME2 in Abhängigkeit Wasser- und Emulgatorkonzentration. Für Verdünnungsreihe c nahm die

Viskosität mit steigendem hydrophilen Anteil, sowie zunehmender Tensidmenge zu (Abbildung 17A). Der zunehmende Wasseranteil wird benötigt, um die Emulgatoren zu solubilisieren. Der Viskositätsanstieg lässt sich mit der steigenden Zahl wassergefüllter Tröpfchen und dem Übergang zu wassergefüllten Röhren in bikontinuierlichen Strukturen erklären, die die innere Reibung im System erhöhen [260]. Bei geringem Ölgehalt in c^6 (20 %) und c^7 (10 %) wird zudem ein Übergang von W/O- zu O/W-ME erwartet. Dieser wäre durch ein lokales Maximum in der Viskositätskurve erkennbar [260-262]. Da die Viskosität entlang Reihe c linear ansteigt, kann die Perkolationschwelle für den Übergang zu bikontinuierlichen Systemen und O/W-ME nicht bestimmt werden.

Bei konstantem Anteil der hydrophilen Phase (25 %) in Reihe d nahm die Viskosität mit steigender Emulgatorkonzentration ebenfalls zu (Abbildung 17B). Dies kann auf die hohe dynamische Viskosität der Emulgatoren zurückgeführt werden. Diese beträgt für Polyglycerol-3-caprat 3100–4100 mPa·s (bei 25 °C) [266]. Für Polyglycerol-3-oleat liegt kein genauer Wert vor. Aufgrund des gleichen Polymerisationsgrades dürfte die Viskosität in einem ähnlichen Bereich liegen, wie die von Polyglycerol-3-caprat. Die hohe Viskosität der Mischungen in Reihe d kann außerdem auf bikontinuierliche Systeme hinweisen. Dies wäre plausibel, da sie ähnliche Anteile an lipophiler und hydrophiler Phase enthalten. In Reihe e mit konstantem Emulgatorgehalt von 55 % resultierte mit zunehmendem hydrophilen Anteil nur noch eine leichte Abnahme der Viskosität von 88,4 mPa·s für e^1 auf 83,5 mPa·s bzw. 83,0 mPa·s für e^3 und e^4 (Abbildung 17A). Dies bestätigt, dass die Viskosität bei hohem Tensidgehalt hauptsächlich von der Viskosität der Emulgatoren bestimmt wird und weniger von der hydrophilen und lipophilen Phase. Auch in diesem Fall könnten bikontinuierliche Strukturen aufgrund der hohen Viskosität vorliegen. Ein Übergang zu O/W-ME wäre für e^3 mit 10 % und e^4 mit 5 % Ölanteil denkbar und würde erklären, dass diese Mischungen eine vergleichbare Viskosität aufweisen.

Zusammenfassend wurde mit Hilfe der rheologischen Untersuchungen festgestellt, dass es sich bei den Systemen b_0 , b_5 und c_1 nicht um ME handelt. Die übrigen Systeme zeigten idealviskoses Verhalten und eine geringe dynamische Viskosität – vor allem bei geringem Emulgatorgehalt. Ergebnisse der Reihe a weisen auf einen Übergang von W/O- zu bikontinuierlichen Strukturen hin. Für Reihe b wird angenommen, dass diskontinuierliche Systeme mit sphärischer, kolloidaler Phase vorliegen. Bei Mischungen der Reihen c werden Übergänge von W/O-ME zu bikontinuierlichen Strukturen und O/W-ME vermutet. Entlang Reihe d und e könnte es sich ebenfalls um bikontinuierliche Systeme mit Übergang zu O/W-Systemen für Reihe e handeln. Weitere Untersuchungen sind nötig, um Perkolationschwellen zu bestimmen und zwischen W/O- und O/W-ME zu unterscheiden.

4.3.3. Konduktivitätsmessungen

Auch mit Hilfe von Leitfähigkeitsmessungen ist es möglich eine Aussage über die Struktur und den Aufbau der ME zu erhalten. So weisen O/W-ME aufgrund der wässrigen dispersen

Phase eine hohe elektrische Leitfähigkeit auf. Im Gegensatz dazu ist die Konduktivität in W/O-Systemen sehr gering, da Wasser als kolloidale Phase isoliert in die disperse Phase eingebettet ist [267]. Mit zunehmendem Anteil der hydrophilen Phase vergrößert sich die kolloidale Phase und Wassertröpfchen fließen zusammen. An der Perkolationschwelle beim Übergang zu einem bikontinuierlichen System und O/W-ME treten dann durchgehende wasserhaltige Bereiche auf. Deshalb kommt es zum drastischen Anstieg der Leitfähigkeit [108, 256, 257, 261, 268, 269]. Dieser Übergang ist durch ein Maximum der ersten Ableitung von κ ($d \log \kappa / d \varphi_w$) gegen die Wasserfraktion φ_w gekennzeichnet [254, 262]. Nimmt der hydrophile Anteil im System weiter zu, kommt es zum Übergang zu O/W-ME. Die Leitfähigkeit kann sich in den O/W-ME unterschiedlich verhalten. Meist bleibt sie unverändert, da wie im bikontinuierlichen System freies Wasser zur Verfügung steht. Wird die Leitfähigkeit gegen die Wasserfraktion aufgetragen, resultiert ein sigmoidaler Kurvenverlauf [256, 270]. Andere Arbeiten beschreiben einen noch steileren Anstieg der Leitfähigkeitskurve mit zunehmendem Wassergehalt [271, 272] oder auch eine Abnahme der Leitfähigkeit für O/W-ME [268].

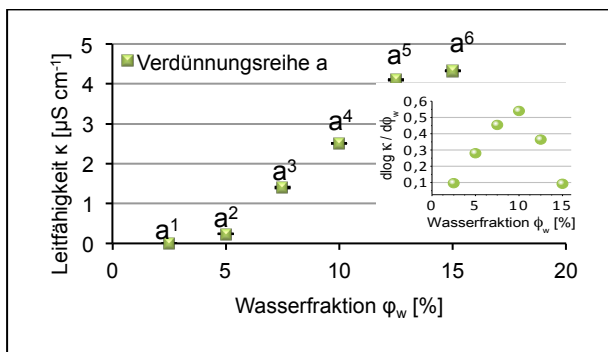


Abbildung 18: Elektrische Leitfähigkeit κ der ME1 entlang Reihe a ($n = 5$, $MW \pm SD$), klein: erste Ableitung der elektrischen Leitfähigkeit gegen die Wasserfraktion φ_w

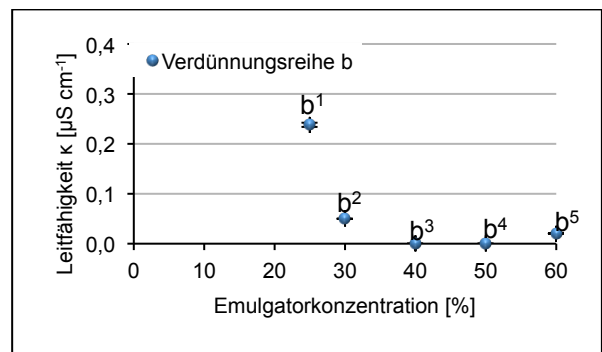


Abbildung 19: Elektrische Leitfähigkeit κ der ME1 entlang Reihe b ($n = 5$, $MW \pm SD$)

Von der ME1 wurde die Konduktivität entlang Verdünnungsreihe a (Abbildung 18) mit zunehmendem Wassergehalt, sowie entlang Dilutionsreihe b (Abbildung 19) mit steigender Emulgatormenge und konstanter Wasserkonzentration von 5 % gemessen. Mit zunehmendem Anteil φ_w ist in Verdünnungsreihe a ein Anstieg der Leitfähigkeit zu verzeichnen. In der ersten Ableitung (Abbildung 18 - klein) resultierte ein Maximum bei 20 % Wasser-BuG-Gehalt ($\hat{=} 10$ % φ_w) für die Mischung a⁴. Ein Übergang zu einem bikontinuierlichen System ist hier also denkbar.

Die geringe Leitfähigkeit der Systeme mit Werten unter $5 \mu\text{S cm}^{-1}$ ist auf das Fehlen von Elektrolyten in der wässrigen Phase zurückzuführen. Auf den Zusatz von Salzen wurde verzichtet, um eine Änderung der Mikrostruktur des nichtionischen Systems und somit des Phasenverhaltens der ME zu vermeiden [273]. Bei konstant geringem Gehalt der hydrophilen Phase (10 %) in Reihe b ist auch die Leitfähigkeit niedrig (Abbildung 19). Eine

Abnahme ist mit steigender Tensidkonzentration zu beobachten, da die leitfähige disperse Phase in der W/O-ME zunehmend von Emulgatormolekülen abgeschirmt wird.

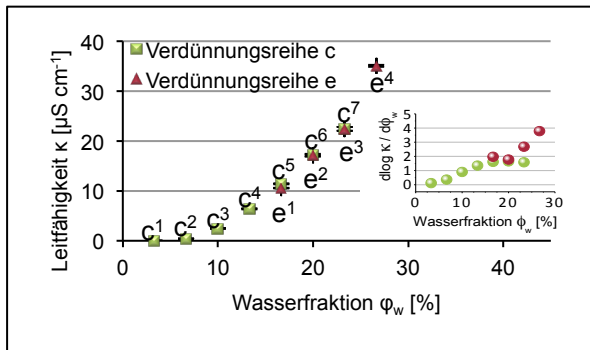


Abbildung 20: Elektrische Leitfähigkeit κ der ME2 entlang Reihe c und e ($n = 3$, $MW \pm SD$), klein: erste Ableitung der elektrischen Leitfähigkeit gegen die Wasserfraktion ϕ_w

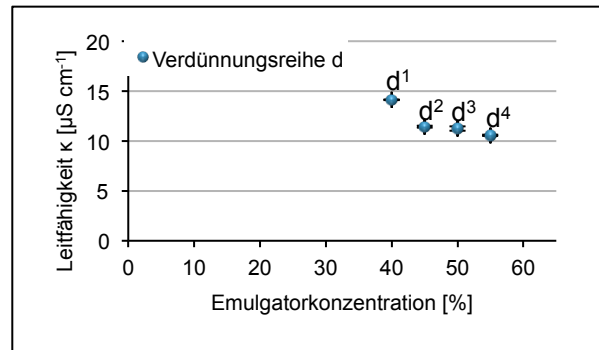


Abbildung 21: Elektrische Leitfähigkeit κ der ME2 entlang Reihe d ($n = 3$, $MW \pm SD$)

Für die ME2 sind die Ergebnisse der Konduktivitätsmessung entlang Verdünnungsreihe c mit steigender Tensidkonzentration und Verdünnungsreihe e mit konstantem Emulgatorgehalt von 55 % in Abbildung 20 dargestellt. Mit zunehmendem Wassergehalt stieg auch die Leitfähigkeit der Systeme an. In Reihe c war ab Mischung c^3 mit 15 % hydrophilem Anteil ($\cong 10,0 \% \phi_w$) ein starker Anstieg zu erkennen. Wasser wurde demnach nicht vollständig von den zunehmenden Emulgatormolekülen gebunden. Es lag zunehmend frei vor. In der ersten Ableitung (Abbildung 20 – klein) wurde ab c^4 mit 20 % ($\cong 13,3 \% \phi_w$) hydrophilem Anteil ein Maximum erreicht, das auf einen Übergang zu bikontinuierlichen Strukturen hinweist. Ein Übergang zu einem wasserkontinuierlichen System für c^7 konnte anhand der Ergebnisse nicht abgeleitet werden. Es war weder ein steilerer Anstieg, noch ein Abflachen oder Abfallen der Kurve erkennbar. In Reihe e war die Leitfähigkeit für alle Mischungen hoch ($> 10 \mu S cm^{-1}$), da kontinuierliche Wasserbereiche zur Verfügung stehen. Für die Mischung e^4 nimmt die Leitfähigkeit steiler zu. Es könnte sich bei diesem System mit nur 5 % Ölanteil um eine ME vom O/W-Typ handeln. Die übrigen Mischungen mit 10 % (e^3) bis 20 % (e^1) Öl bilden wahrscheinlich bikontinuierliche Systeme.

Abbildung 21 zeigt die Leitfähigkeitsdaten für Verdünnungsreihe d der ME2. Die Leitfähigkeit war für alle Mischungen mit über $10 \mu S cm^{-1}$ hoch, da diese 25 % hydrophile Komponente ($\cong 16,7 \% \phi_w$) enthielten. In den Systemen liegen ähnliche Mengen an lipophiler (d^1 : 35 % bis d^4 : 20 %) und hydrophiler Phase vor. Es ist anzunehmen, dass es sich daher um bikontinuierliche Systeme handelt, in denen kontinuierliche Wasserbereiche den Strom leiten. Wie für Reihe b der ME1 ist eine Abnahme der Leitfähigkeit mit zunehmender Emulgatorkonzentration beobachtbar, die auf die zunehmende Abschirmung der leitfähigen dispersen Wasserphase durch Tensidmoleküle zurückzuführen ist.

Die Ergebnisse der Konduktivitätsmessungen stützen die Erkenntnisse der Viskositätsbestimmung. In Dilutionsreihe a wurde der Übergang von W/O-ME zu bikontinuierlichen Systemen bestätigt, genau wie das durchgehende Vorliegen von W/O-ME in Reihe b und bikontinuierlichen Systemen in Reihe d. Für Dilutionsreihe c wurde ein Übergang von O/W-ME zu bikontinuierliche Strukturen belegt. Der Nachweis für eine O/W-ME (c⁷) steht weiterhin aus. Für Reihe e wurden Hinweise geliefert, dass bikontinuierliche Strukturen in ein O/W-System übergehen.

4.3.4. Dynamische Differenzkalorimetrie

Erste Untersuchungen an ME mittels Dynamischer Differenzkalorimetrie (DSC) wurden von Senatra *et al.* durchgeführt [274]. Durch die Ermittlung von Energiedifferenzen zwischen einem probehaltigen und einem leeren Tiegel als Referenz beim Aufheizen bzw. Abkühlen ist es möglich, Aggregatzustandsänderungen in der Probe zu detektieren. In der vorliegenden Arbeit kam die dynamische Leistungsdifferenzkalorimetrie zum Einsatz, bei der sich Probe und Referenz in verschiedenen, thermisch isolierten Öfen befinden. Bei dieser Methode werden die Unterschiede in der Heizleistung beider Öfen gemessen, um in Proben- und Vergleichstiegel die gleiche Temperatur zu erzeugen.

Von Wasser können drei Arten in ME durch DSC unterschieden werden: freies Bulkwasser (Schmelzpunkt $\theta = 0\text{ °C}$), Grenzflächenwasser an den Wassertröpfchen von W/O-ME ($\theta = -10\text{ °C}$) und an die hydrophilen Gruppen von amphiphilen Molekülen gebundenes Wasser ($\theta < -10\text{ °C}$). Phasenübergänge im eingesetzten Öl sind ebenfalls detektierbar [272, 273, 275-280]. Mittels DSC-Untersuchungen kann man somit Informationen über den Zustand der hydrophilen und lipophilen Phase der ME erhalten und Einblicke in die Mikrostruktur des Systems gewinnen.

Das thermische Verhalten der ME1 wurde entlang Verdünnungsreihe a und b (Abbildung 23), sowie der ME2 entlang Verdünnungsreihe c, d und e (Abbildung 24) analysiert. Außerdem wurden die Einzelkomponenten der Systeme in die DSC-Untersuchungen einbezogen, um auftretende Peaks in den DSC-Kurven der ME diesen zuordnen zu können (Abbildung 22). In den resultierenden DSC-Kühlkurven ist die Wärmemenge in Abhängigkeit von der Temperatur dargestellt. Einfrierprozesse wurden durch exotherme Peaks sichtbar. Die Heizkurven lieferten vergleichbare Aussagen und wurden daher nicht dargestellt.

Für reines, wechselwirkungsfreies Wasser wurde ein großer Peak bei -23 °C detektiert, der das Einfrieren von unterkühltem Wasser anzeigt (Abbildung 22) [273]. Gemischt mit Glykolen, war für Wasser eine Gefrierpunktserniedrigung beobachtbar, da es bekanntlich starke Wechselwirkungen über Wasserstoffbrücken mit Glykolen eingeht und diese hydratisiert. Yagmur *et al.* zeigten, dass in einem binären Wasser-PrG-Gemisch ab 30 % Glykolgehalt kein freies Wasser mehr detektierbar ist [272, 281]. Je höher der Glykolanteil

war, desto kleiner war die Phasenübergangstemperatur (H₂O/BuG [1:1]: -38 °C, H₂O/PeG [2:1]: -34 °C). Für die reinen Komponenten BuG, Tego® SMO V und Isolan® GO 33 konnte keine Signale im Messbereich detektiert werden. Hydriol® PGC.3 zeigte einen Erstarrungspeak bei -11 °C und Tego® Care PL 4 bei 6 °C. Das kleinere Signal bei -13 °C in der Kühlkurve von Tego® Care PL 4 weist auf Verunreinigungen durch Glycerol hin [282]. Gemischt mit Isolan® GO 33 erstarrte Hydriol® PGC.3 bei geringerer Temperatur (-27 °C), da beide Emulgatoren miteinander interagieren. IPP zeigte einen Phasenübergang bei 4,5 °C und ein kleineres Signal bei -13 °C. Das kleinere Signal kann auf Verunreinigungen zurückzuführen sein [283]. Laut Hersteller beträgt die Reinheit des Produkts mindestens 90 % [284].

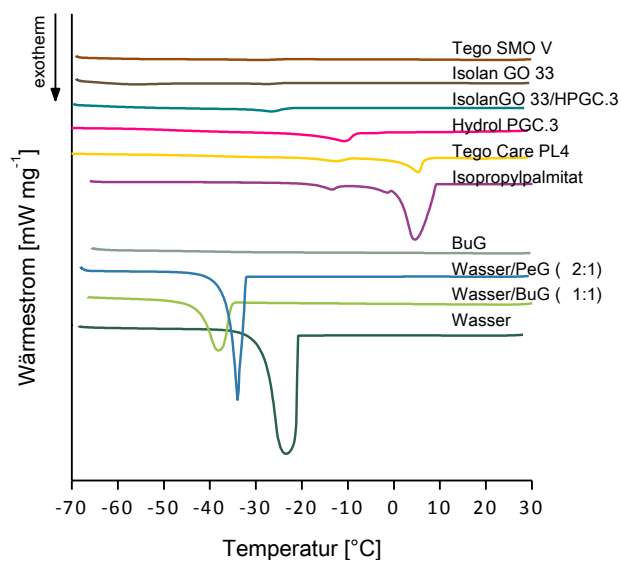


Abbildung 22: DSC-Kühlkurven der einzelnen Bestandteile der ME1 und ME2; HPGC.3 = Hydriol PGC.3

Wie Abbildung 23 zu entnehmen ist, resultierten für die untersuchten ME entlang Verdünnungsreihe a und b jeweils Phasenübergangspeaks zwischen 2 und 3 °C. Bei einigen Mischungen war auch ein kleines Signal bei -15 °C erkennbar. Damit zeigten sie im untersuchten Bereich ein ähnliches thermisches Verhalten wie die reine Ölkomponente IPP. Zudem wurde mit Abnahme des Ölgehalts eine Abnahme der Peakflächen beobachtet. Dies ist typisch für W/O-ME, bei denen Öl die äußere kontinuierliche Phase bildet, in die Wasser als disperse Phase eingebettet ist [133]. Ein Phasenübergangspeak für Wasser war aufgrund starker Wechselwirkungen mit den Emulgatoren und BuG nicht im Messbereich detektierbar. Es lag vermutlich nicht gefrierfähig vor [272, 273, 276, 277]. Auch bei zunehmendem Wasseranteil war kein freies Wasser in den Systemen nachweisbar, da in gleichem Maß auch der Glykolanteil zunahm. Ein Übergang zu bikontinuierlichen Systemen bei zunehmendem Wassergehalt ist dennoch möglich. Freies Tego® Care PL4 war in den DSC-Kurven der ME nicht sichtbar, da dessen Signal vermutlich von dem Phasenübergangspeak des Öls verdeckt wurde. Es könnte aber auch außerhalb des Messbereiches liegen, da der Emulgator mit anderen Bestandteilen der ME wechselwirkt.

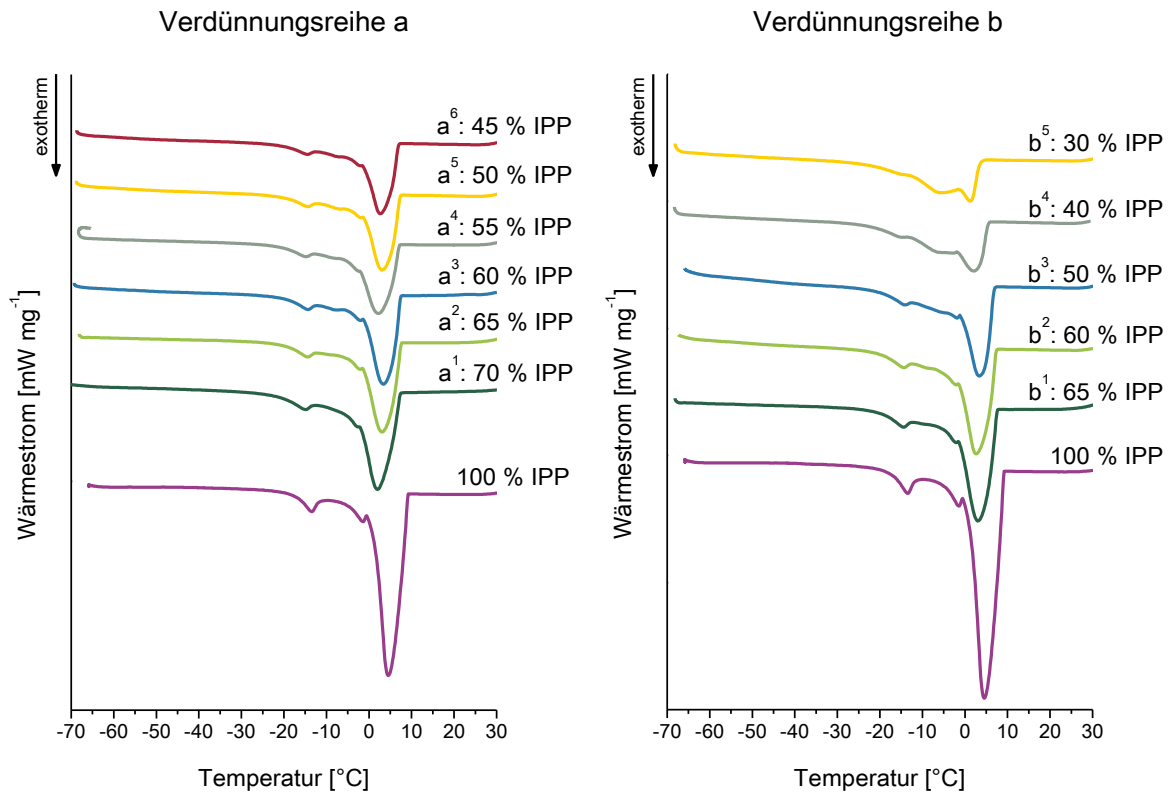


Abbildung 23: DSC-Kühlkurven der ME1 entlang der Verdünnungsreihen a (Mischungen a¹-a⁶) und b (Mischungen b¹-b⁵) sowie von 100 % IPP

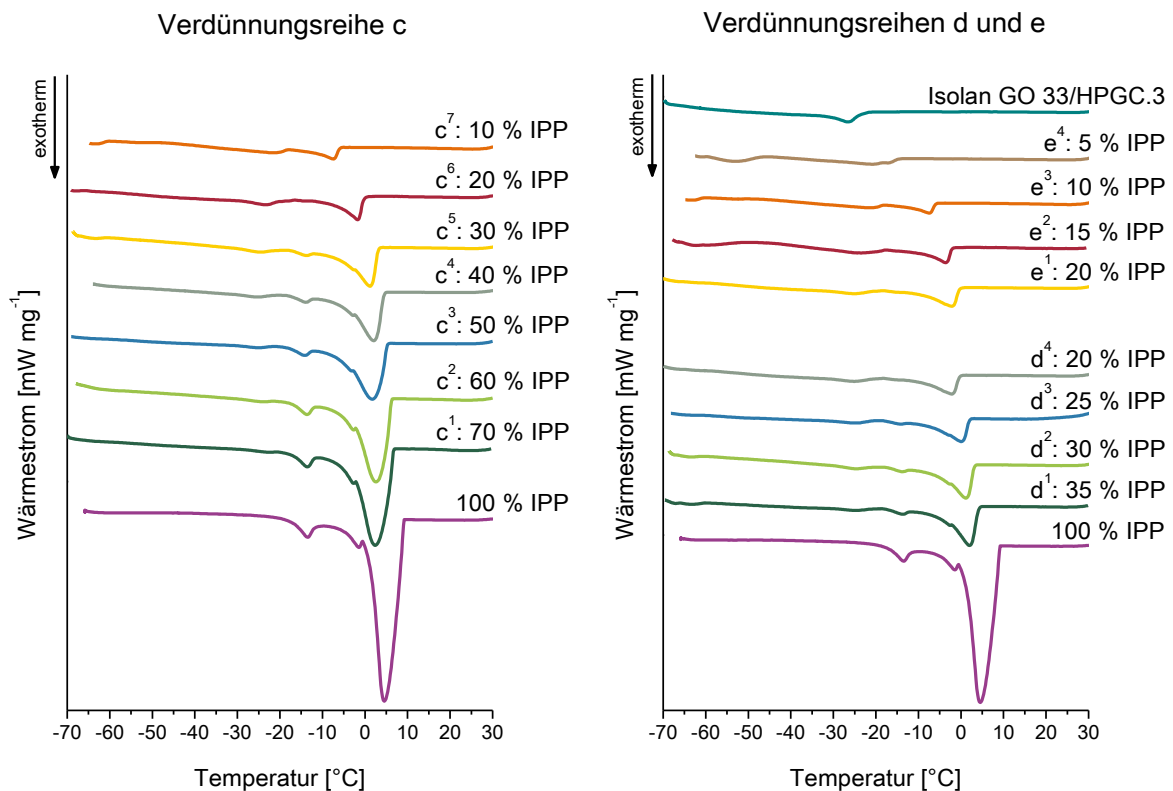


Abbildung 24: DSC-Kühlkurven der ME2 entlang der Verdünnungsreihen c (Mischungen c¹-c⁷), d (Mischungen d¹-d⁴) und e (Mischungen e¹-e⁴) sowie von 100 % IPP und dem Emulgatormischung Isolan® GO 33/Hydriol PGC.3 (2:3)

Analog zu den Proben der ME1 wurden für Reihen c, d und die Proben e¹ bis e³ DSC-Kurven erhalten, die der von IPP glichen (Abbildung 24). In diesen Systemen liegt das Öl frei vor. Es handelt sich demnach bei den Mischungen um W/O-ME oder bikontinuierliche Systeme. Bis zu einem Ölgehalt von 40 % waren beide Phasenübergangssignale (-14 °C und 2–3 °C) erkennbar. Bei abnehmender Ölkonzentration konnte nur der Phasenübergang bei 2–3 °C detektiert werden. Das Signal wurde zunehmend kleiner und zu tieferen Temperaturen verschoben, da das Öl verstärkt mit den Emulgatormolekülen wechselwirkte. Dies wurde wiederholt für W/O-ME und bikontinuierliche Systeme mit IPM oder IPP als lipophile Phase beobachtet [133, 241, 242]. Der DSC-Kurve von Mischung e⁴ war kein Phasenübergangssignal zu entnehmen, da es sich vermutlich um eine O/W-ME handelt. IPP ist als kolloidale Phase in die hydrophile Phase eingebettet und wird von Emulgatormolekülen an der Grenzfläche abgeschirmt, sodass das Erstarren des Öls nicht detektiert werden konnte. Bei keiner Mischung der ME2 wurden Phasenübergangsspeaks für das enthaltene Emulgatormisch festgestellt. Die Tensidmoleküle stehen wahrscheinlich in Wechselwirkung mit anderen Bestandteilen der ME und das Signal liegt daher außerhalb des Messbereichs. Phasenübergangssignale von Wasser wurden ebenfalls in keinem Thermogramm der ME2 detektiert. Wie in Mischungen der ME1 lag der Phasenübergang des Wassers aufgrund von Wechselwirkungen mit PeG und den Emulgatoren vermutlich außerhalb des Messbereichs. Der Phasenübergang von W/O-ME zu bikontinuierlichen Systemen ist somit nicht nachweisbar.

Schlussendlich wurde mit Hilfe der DSC bestätigt, dass in Reihe e der ME2 bikontinuierliche Strukturen in ein O/W-System übergehen. Zwischen W/O-ME und bikontinuierlichen Strukturen konnte weder für ME1, noch für ME2 unterschieden werden, da Wasser mit Glykolen und Emulgatoren so stark wechselwirkte, dass der Phasenübergang außerhalb des Messbereichs lag.

4.3.5. Dynamische Lichtstreuung

Häufig werden Streuverfahren wie statische oder dynamische Lichtstreuung (SLS/DLS), Kleinwinkelneutronenstreuung (SANS) und Kleinwinkelröntgenstreuung (SAXS) eingesetzt, um einen Eindruck von der Größe der kolloidalen Phase von ME zu gewinnen [109, 253]. Die DLS wird auch Photonenkorrelationsspektroskopie oder Quasielastische Lichtstreuung genannt. Sie erfasst zeitabhängig Intensitätsänderungen des Streulichts, die entstehen, wenn ein Laserlichtstrahl auf einen Partikel in einem Dispersionsmedium trifft. Verursacht werden diese Intensitätsänderungen durch die Brownsche Bewegung der Partikel, die je nach Größe unterschiedlich schnell im Dispersionsmedium diffundieren. Anhand der erhaltenen Autokorrelationsfunktion wird der effektive Diffusionskoeffizient D_{eff} unter der Annahme ermittelt, dass im System harte Partikel mit Kugelform vorliegen. Der hydrodynamische Radius R_h dieser sphärischen Partikel kann dann mit Hilfe der STOKES-EINSTEIN-Gleichung (Gleichung 1) berechnet werden.

$$R_h = \frac{kT}{6\pi\eta D_{eff}}$$

R_h = hydrodynamischer Radius [m]
 D_{eff} = effektiver Diffusionskoeffizient [$m^2 s^{-1}$]
 η = Viskosität [Pa·s]
 k = Boltzmann Konstante [$J K^{-1}$]
 T = absolute Temperatur [K]

Gleichung 1: STOKES-EINSTEIN-Gleichung

Shukla *et al.* wiesen nach, dass R_h dem Radius der reinen kolloidalen Phase mit daran gebundenen Emulgatormolekülen entspricht. Es wird angenommen, dass diese Partikel wechselwirkungsfrei sind, auch wenn die übliche Verdünnung der Probe unterlassen wurde, um ein Brechen der Systeme zu vermeiden [285-287]. Durch die Auswertung der Autokorrelationsfunktion mittels CONTIN Algorithmus für polydisperse Systeme wird eine Partikelgrößenverteilung erhalten und klar zwischen monomodaler und multimodaler Größenverteilung unterschieden [288-290].

ME sind dynamische Systeme, in denen kontinuierlich Umstrukturierungen stattfinden. Tröpfchen der kolloidalen Phase kollidieren, fließen zusammen und trennen sich wieder. Auch die Emulgatormoleküle fluktuieren im System und ein ständiger Ein- und Ausbau in die Grenzfläche findet statt [108, 116, 117]. Es wird dennoch davon ausgegangen, dass die mittels DLS gemessenen Radien die Größe dieser dynamischen kolloidalen Phase widerspiegeln, da die Messung aus 13 verschiedenen Winkeln überwiegend vergleichbare Werte lieferte. Die Ergebnisse sind als Mittelwert und Standardabweichung dieser 13 Messungen dargestellt (Abbildung 25 und Abbildung 26).

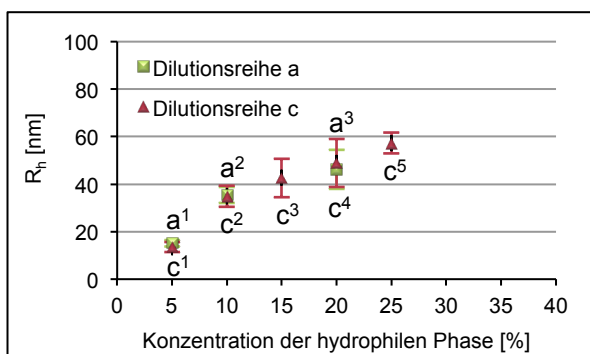


Abbildung 25: Hydrodynamische Radien R_h der untersuchten MEs entlang Dilutionsreihe a und c (13 Messwinkel, MW \pm SD)

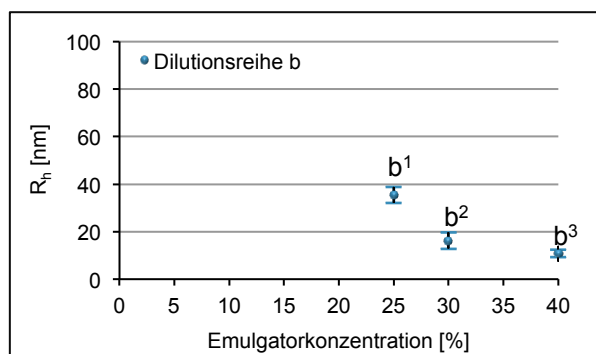


Abbildung 26: Hydrodynamische Radien R_h der untersuchten MEs entlang Dilutionsreihe b (13 Messwinkel, MW \pm SD)

ME des Systems ME1 (Dilutionsreihe a) und ME2 (Dilutionsreihe c) zeigten bei gleichem Anteil an hydrophiler Phase vergleichbare hydrodynamische Radien der sphärischen Wassertröpfchen (Abbildung 25). Die Mengenanteile an Emulgator und Öl unterschieden sich in den Systemen (siehe Tabelle 24, Seite 134). Vermutlich wird die Größe der kolloidalen Phase in den W/O-Systemen vom Mengenanteil der hydrophilen Phase bestimmt. Wie erwartet, nahm mit zunehmendem Anteil der hydrophilen Phase auch der

hydrodynamische Radius zu – von $15,09 \pm 1,39$ nm für a^1 und $13,47 \pm 2,05$ nm für c^1 mit 5 % hydrophiler Phase bis $57,25 \pm 4,32$ nm für c^5 mit 25 % hydrophilem Anteil [291, 292].

In Dilutionsreihe b mit 10 % hydrophilem Anteil wurden für die Mischungen b^1 bis b^3 sphärische Partikel der W/O-ME detektiert (Abbildung 26). Mit zunehmendem Emulgatoranteil nimmt die Größe der Grenzfläche zwischen hydrophiler und lipophiler Phase zu. Es entstehen folglich zunehmend mehr kleinere Tröpfchen. Dies spiegelte auch das Ergebnis der Lichtstreuung wider. Mit zunehmendem Emulgatoranteil nahm der hydrodynamische Radius von $35,37 \pm 3,37$ nm in b^1 auf $10,78 \pm 1,50$ nm in b^3 ab. In Mischung b^4 konnten keine Wassertröpfchen dieser Größenordnung ermittelt werden, da die Ergebnisse der winkelabhängigen Messung stark schwankten. Es wurden kontinuierlich Partikel mit einem Radius von 4 nm detektiert. Aufgrund des hohen Emulgatoranteils von 50 % könnte bereits eine mizellare Lösung vorliegen. Ein gestrecktes Polyglycerol-4-laurat-Molekül besitzt eine Länge von 2,84 nm (hydrophiler Anteil 1,58 nm; lipophiler Anteil 1,26 nm) [293]. Insofern ist die Größe entsprechender Mizellen vermutlich größer als 4 nm. Bei den detektierten Strukturen könnte es sich alternativ um hydratisierte Emulgatormoleküle handeln.

In den Proben c^6 , c^7 ($\cong e^3$) und e^2 wurden sehr große Lichtstreuungen > 1500 kHz detektiert. Die winkelabhängigen Messungen ergaben schwankende Resultate. Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass einige große Strukturen kleine Partikel überdeckten und keine sphärischen Strukturen vorliegen. Es könnte sich bei diesen Mischungen um bikontinuierliche Systeme handeln.

Mit der Messung bei 13 verschiedenen Messwinkeln wurde belegt, dass die hydrophile, kolloidale Phase der Mischungen a^1 – a^3 , c^1 – c^5 und b^1 – b^3 sphärischen Charakter besitzt. Die erhaltenen hydrodynamischen Radien liegen in einem für ME typischen Größenbereich [112]. Bikontinuierliche Systeme konnten nicht näher charakterisiert werden, da die DLS-Messung ausschließlich sphärische Partikel erfasst.

4.3.6. pH-Wert

Der pH-Wert der Formulierung kann erheblichen Einfluss auf die Stabilität der Peptide haben und sich auf das Penetrationsvermögen des Wirkstoffs auswirken [294, 295]. Liegt der pH nahe am IEP des enthaltenen Peptids, weist dieses eine geringere Polarität auf und penetriert damit vermutlich besser in die Haut. Da es Ziel dieser Arbeit war, ME mit guter Hautverträglichkeit zu entwickeln, sollten die pH-Werte im leicht sauren Bereich der Hautoberfläche liegen [197]. Mischung a^2 ($\cong b^1$) des ME1-Systems wurde für spätere Penetrationsversuche verwendet. Der pH-Wert dieser Formulierung betrug $6,56 \pm 0,13$. Die reine hydrophile Komponente dieses Systems (Wasser/BuG, 1:1) hatte einen pH von $5,80 \pm 0,03$, sodass auch die übrigen ME im Phasendiagramm der ME1 einen leicht sauren pH-Wert besitzen sollten. Für das ME2-System wurden die pH-Werte für alle Mischungen

entlang der Dilutionsreihen c–e bestimmt. Sie betragen zwischen 6,32 und 6,85 und lagen damit im gleichen Bereich wie der pH-Wert der Mischung a² und entsprechen damit der gesetzten Anforderung.

4.4. Einarbeitung der Peptide in die Mikroemulsionen

Die Peptiden GEKG, PKEK, LPA, LPBG und LPT wurden in Konzentrationen bis zu 1 % in die ME1, sowie GEKG und PKEK in die ME2 eingearbeitet. Es traten keine Sättigungseffekte auf und die ME blieben klar. Folglich wurde die Struktur der ME von den Peptiden nicht beeinflusst. Aufgrund des hydrophilen Charakters der Peptide, werden diese in der kolloidalen Phase der W/O-ME gelöst vorliegen. Auf die Bestimmung der genauen Sättigungskonzentrationen in den Vehikeln wurde verzichtet, da von den Peptiden nur begrenzte Mengen zur Verfügung standen.

Von den palmitoylierten Peptiden wurden 0,5 % in die ME1 eingearbeitet. Zwar lösten sich Pal-GEKG und Pal-PKEK, die Mischungen wurden jedoch trüb. Vermutlich lagerten sich die Peptide aufgrund ihres amphiphilen Charakters in die Grenzschicht zwischen hydrophiler und lipophiler Phase ein und störten somit die Anordnung der Emulgatoren. Dies führte zum Brechen der Systeme.

4.5. Bewertung der Verträglichkeit der Mikroemulsionen

4.5.1. Toxikologische Eigenschaften der Bestandteile der Mikroemulsionen

Um die Verträglichkeit der ME abschätzen zu können, sollten wichtige toxikologische Parameter derer Inhaltsstoffe bekannt sein. Die akute Toxizität beschreibt schädigende Effekte nach einer Einzelapplikation eines Stoffes. Der toxikologische Endpunkt ist der LD₅₀-Wert, der die Dosis beschreibt, bei der 50 % der Versuchstiere sterben. Üblicherweise werden die Versuche an Nagetieren durchgeführt. Leitlinien der Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung (OECD: *Organisation for Economic Co-operation and Development*) beschreiben das genaue Vorgehen (oral: OECD 401, 420, 423, 425; dermal: OECD 434). Zur Ermittlung der subchronischen Toxizität werden Versuchstiere mindestens 28 Tage, besser 90 Tage der Testsubstanz ausgesetzt. Als toxikologischer Endpunkt gilt der sogenannte NOAEL (engl.: *no observed adverse effect level*), die Dosis in mg/kg Körpergewicht/d, die keine schädigenden Effekte am Tier hervorruft. Dieser Wert wird zur Beurteilung der systemischen Exposition gegenüber chemischen Substanzen verwendet. Reizung am Auge wurde in der Vergangenheit meist am Kaninchenauge getestet (OECD 405). Da Tierversuche für kosmetische Produkte gemäß aktueller Kosmetikverordnung verboten sind, werden heute Ersatzmethoden wie beispielsweise der Hühneri-Test an der Chorion-Allantois-Membran (HET-CAM) verwendet. Reizung der Haut wurde ebenfalls am Kaninchen untersucht (OECD 404). *In vitro*-Methoden beruhen auf rekonstruierten Modellen menschlicher Epidermis (OECD

4. Mikroemulsionen zur Applikation von Peptiden auf die Haut

439), zum Beispiel EpiSkin™ oder EpiDerm™. Das Sensibilisierungspotential wurde meist an Meerschweinchen (OECD 406) oder mittels lokalem Lymphknotentest an Mäusen bestimmt (OECD 429). Die klinische Testung der Hautverträglichkeit und Sensibilisierung erfolgt mittels einfachem bzw. wiederholtem Epikutantest (hSIPT: human single insult patch test, hRIPT: human repeated insult patch test). Für die Testung auf Phototoxizität, Mutagenität, Kanzerogenität und Reproduktionstoxizität sind Tierversuche ebenfalls veraltet und es werden *in vitro*-Methoden wie beispielsweise der Rückmutationstest an Bakterien (OECD 471) eingesetzt [34].

Tabelle 10: Toxikologische Parameter der Mikroemulsionsbestandteile

	Sorbitan-oleat	PG-4-laurat	PG-3-oleat	PG-3-caprat	BuG	PeG	IPP
Akute orale Toxizität, LD₅₀	>39,8 g/kg	k. A.	>5 g/kg	OECD 401 >2 g/kg	Ratte 23 g/kg	Ratte/Maus 12,7 g/kg / 7,4 g/kg	Ratte >64 mL/kg
Akute dermale Toxizität, LD₅₀	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	Kaninchen >2 g/kg	k. A.	Kaninchen >2,0 mL/kg
Subchronische Toxizität, NOAEL	kein Effekt bis 10 % in Diät	k. A.	k. A.	k. A.	2 Jahre: 5 g/kg/d	28 Wochen: 2,45 g/kg/d	–
Reizung der Haut	5 %/ 100 % + minimal	SkinEthic™: –	Kaninchen: + mäßig	OECD 404 –	100 %: + minimal 24 %: – hSIPT: –/ + minimal	hRIPT, 0,112 %: –	Kaninchen: –/+ leicht hSIPT: –
Reizung am Auge	Kaninchen: –	HET-CAM: –	Kaninchen: + leicht	OECD 405 –	505 g: + 0,1 mL: – 40 %: – Mensch: +	HET-CAM: + mäßig <i>in vitro</i> : + leicht	Draize-Test: –/+ leicht
Sensibilisierungspotential	hRIPT: –	k. A.	k. A.	OECD 406 –	hRIPT: – Fallbericht: +	hRIPT: – Fallbericht: +	RIPT: –
Phototoxizität	–	k. A.	k. A.	k. A.	–	k. A.	–
Mutagenität	k. A.	k. A.	k. A.	OECD 471 –	k. A.	k. A.	k. A.
Kanzerogenität	+/-	k. A.	k. A.	k. A.	NOAEL: 5 g/kg/d	k. A.	k. A.
Reproduktionstoxizität	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	NOAEL: 5 g/kg/d	k. A.	k. A.
Quellen	[296]	[223]	[223]	[223]	[297-299]	[300]	[283, 301]

k. A.: keine Angaben; +: positives Testergebnis; -: negatives Testergebnis; NOAEL: No observed adverse effect level; hSIPT: Epikutantest am Menschen (engl.: *human single insult patch test*); hRIPT: wiederholter Epikutantest am Menschen (engl.: *human repeated insult patch test*); HET-CAM: Hühnerei-Tests an der Chorion-Allantois-Membran

Tabelle 10 zeigt wichtige toxikologische Parameter für die Inhaltsstoffe der ME soweit diese verfügbar waren. Insbesondere für die neuere Emulgatorklasse der PGFE sind nur begrenzte Informationen vorhanden. Trotzdem wird anhand der akuten Toxizitätsdaten deutlich, dass die verwendeten Substanzen nicht akut toxisch sind (LD₅₀ > 2000 mg/kg) [302]. Es sind minimale bis mäßige Reizungen der Haut und Augen möglich. Für BuG und PeG wurde in Einzelfällen von allergischen Reaktionen berichtet. Soweit bekannt, besitzt keiner der

4. Mikroemulsionen zur Applikation von Peptiden auf die Haut

Inhaltsstoffe der ME phototoxisches, mutagenes, kanzerogenes oder reproduktionstoxisches Potential. Um auszuschließen, dass ME1 und ME2 die Haut reizen, sollten weitere Untersuchungen, beispielsweise ein HET-CAM, mit den Formulierungen durchgeführt werden.

Tabelle 11: Anwendungs- und Expositionsinformationen für kosmetische Produkte gemäß SCCS [34]

Art der Formulierung	Applikationsfläche	Frequenz der Anwendung	Exposition	geschätzte relative Exposition, A
Bodylotion	15670 cm ²	2,28 /d	7,82 g/d	123,20 mg/kg/d
Gesichtscreme	565 cm ²	2,14 /d	1,54 g/d	24,14 mg/kg/d
Handcreme	860 cm ²	2,00 /d	2,16 g/d	32,70 mg/kg/d

Werden die ME auf die Haut aufgetragen, penetrieren deren Inhaltsstoffe in die Haut und gelangen so auch in den systemischen Kreislauf. Daher wurde zur Einschätzung der Verträglichkeit auch die systemische Exposition gegenüber den Bestandteilen der ME näher beleuchtet. Die Peptid-haltigen ME sollen bei Psoriasis oder als kosmetische Produkte mit Anti-Aging-Effekten eingesetzt werden. Eine Anwendung auf dem Gesicht, den Händen oder dem gesamten Körper ist damit denkbar. Der SCCS definiert für die Anwendung auf diesen Körperarealen die in Tabelle 11 aufgeführten Applikationsflächen, Anwendungsfrequenzen und Expositionsmengen.

Mit Hilfe von Gleichung 2 kann aus der geschätzten täglichen Exposition gegenüber der Formulierung A, die systemische Expositionsdosis gegenüber jeder Einzelsubstanz der ME (SED) bestimmt werden. Zur Bewertung der systemischen Exposition wird als Quotient aus NOAEL-Wert und SED eine Sicherheitsspanne (MoS: *Margin of Safety*) berechnet. Diese sollte mindestens 100 betragen [34].

$$SED = A \times C / 100 \times DA_p / 100$$

SED = Systemische Expositionsdosis [mg/kg KG/d]

A = Geschätzte tägliche Exposition gegenüber der Formulierung pro kg Körpergewicht [mg/kg KG/d]

C = Konzentration der Einzelsubstanz in der Formulierung [%]

DA_p = Dermale Absorption der Einzelsubstanz [%]

Gleichung 2: Berechnung der systemischen Expositionsdosis gegenüber einzelner Formulierungsbestandteile [34]

Unter der Annahme, dass die Formulierungsbestandteile vollständig in die systemische Zirkulation übergehen (Worst-Case-Szenario), wurden mit Hilfe von Gleichung 2 systemische Expositionsdosen für die Anwendung der ME1 und ME2 an Hand, Gesicht und Körper ermittelt (Tabelle 12). Es wurde jeweils die Mischung mit 10 % hydrophiler Phase, 25 % Emulgator und 65 % Öl bewertet, die für die Penetrationsuntersuchungen verwendet wurden. Wasser wurde nicht in die Berechnung einbezogen, weil es untoxisch ist. Da nicht für alle Inhaltsstoffe der ME NOAEL-Werte zur Verfügung standen, wurden ersatzweise

Werte chemisch vergleichbarer Substanzen für die Berechnung der Sicherheitsspanne herangezogen.

Tabelle 12: Berechnung der systemischen Expositionsdosis (SED) und Sicherheitsspanne (MoS) für die Anwendung der ME1 und ME2 an Hand, Gesicht und Körper; C: Konzentration im Vehikel

	Formulierungsbestandteile	C [%]	SED (Hand) [mg/kg/d]	SED (Gesicht) [mg/kg/d]	SED (Körper) [mg/kg/d]	NOAEL [mg/kg/d]	MoS (Hand)	MoS (Gesicht)	MoS (Körper)
ME1	Soorbitanoleat	8,33	2,73	2,01	10,27	5000 ¹	1835	2486	487
	PG-4-laurat	16,67	5,45	4,02	20,53	845 ²	155	210	41
	BuG	5,00	1,64	1,21	6,16	5000	3058	4143	812
	IPP	65,00	21,26	15,69	80,08	5500 ³	259	351	69
ME2	PG-3-oleat	10,00	3,27	2,41	12,32	845 ²	258	350	69
	PG-3-caprat	15,00	4,91	3,62	18,48	845 ²	172	233	46
	PeG	3,33	1,09	0,80	4,11	2450	2248	3045	597
	IPP	65,00	21,26	15,69	80,08	5500 ³	259	351	69

¹NOAEL für Sorbitanstearat [296], ²NOAEL für Polyglycerol-2-diisostearat [223], ³NOAEL für Ethyloleat [303]

Für die Applikation auf Hand und Gesicht wurden Ergebnisse über 100 ermittelt. Der Grenzwert wurde bei Anwendung am ganzen Körper für die PGFE und das Öl nicht eingehalten. Die entsprechenden Daten sind in Tabelle 12 rot markiert. Werden die ME als Hand- und Gesichtspflege angewendet, bestehen hinsichtlich der systemischen Exposition gegenüber den Einzelbestandteilen der Formulierungen keine Sicherheitsbedenken. Auf dem gesamten Körper sollten ME1 und ME2 in der benannten Zusammensetzung aufgrund der erhaltenen Ergebnisse nicht appliziert werden.

4.5.2 HET-CAM

Mit Hilfe des von Lüpke entwickelten HET-CAM, der eine Alternative zum kontrovers diskutierten Irritationstest am Kaninchenaugen (Draize-Test) darstellt, wird die Schleimhautverträglichkeit von Chemikalien abgeschätzt [304]. Auch für kosmetische Formulierungen kann das reizende Potential überprüft werden [305]. Der HET-CAM ist ein vergleichsweise einfacher und schnell durchführbarer Test, der zudem preisgünstig ist. Er weist eine hohe Empfindlichkeit auf und liefert zuverlässige, reproduzierbare Daten [306, 307].

$$IS = \left(\frac{301 - t_H[s]}{300} \times 5 \right) + \left(\frac{301 - t_L[s]}{300} \times 7 \right) + \left(\frac{301 - t_C[s]}{300} \times 9 \right)$$

Gleichung 3: Gleichung zur Berechnung des Irritationsscores (IS) unter Einbeziehung der Zeit (t) in Sekunden (s) bis zum Beginn der Ereignisse Hämorrhagie (H), Gefäßlyse (L) und Koagulation (C) gemäß ICCVAM [307, 308]

Die von Blutgefäßen durchzogene Chorion-Allantois-Membran (CAM) ist die Aderhaut des Eies und schmerzempfindlich, da das Nervensystem des Hühnerembryos vor dem 10. Bebrütungstag noch unentwickelt ist. Für den Versuch wird die zu testende Formulierung auf die CAM appliziert. Reizende Effekte der aufgetragenen Substanz führen zu Reaktionen der Membran in Form von Blutungen und Extravasation von Erythrozyten (Hämorrhagie),

Transparentwerden von kleinen Gefäßen (Gefäßlyse), sowie Stagnieren des Blutflusses und Zeichen intra- oder extravasaler Gerinnung (Koagulation). Diese können beobachtet und zeitlich erfasst werden (Reaktions-Zeit-Methode). Anhand der Zeit (t) bis zum Eintritt dieser Ereignisse wird gemäß ICCVAM-Kriterien (ICCVAM: Koordinierungsausschuss für die Validierung alternativer Methoden) ein Irritationsscore (IS) ermittelt, um die Schwere des reizenden Potentials zu bewerten (Gleichung 3) [304, 307, 308].

Die Ergebnisse des HET-CAM sind in Tabelle 13 dargestellt. Der Schweregrad der möglichen Ereignisse resultiert als Mittelwert der Sechsfachbestimmung. Die zugrunde liegenden Teilergebnisse mit den Sekunden, die bis zum Auftreten der irritativen Ereignisse vergangen sind, befinden sich in Anhang C: HET-CAM-Ergebnisse, Seite 135. Trat nach Applikation der Formulierung das jeweilige irritierende Ereignis nicht auf, resultiert der Schweregrad 0. Traten keine Ereignisse auf, resultierte insgesamt ein IS von 0 und somit kein reizendes Potential.

Tabelle 13: HET-CAM-Ergebnisse aller untersuchten Formulierungen – ermittelter Irritationsscore, Schweregrad der Ereignisse Hämorrhagie (H), Gefäßlyse (L) und Koagulation (C), sowie Bewertung des reizenden Potentials nach ICCVAM; Wdh.: Wiederholungsversuch [307]

Prüfsubstanz	Irritationsscore (IS)	Schweregrad			irritatives Potential nach ICCVAM
		H	L	C	
ME1 (wirkstofffrei)	0	0	0	0	kein
ME1 (wirkstofffrei), Wdh.	0,3	0,3	0	0	kein
ME2 (wirkstofffrei)	0	0	0	0	kein
BC (wirkstofffrei)	0	0	0	0	kein
1 % GEKG in ME1	0	0	0	0	kein
1 % PKEK in ME1	0	0	0	0	kein
1 % LPA in BC	0	0	0	0	kein
1 % LPA in ME1	0	0	0	0	kein
1 % LPBG in BC	0	0	0	0	kein
1 % LPBG in ME1	0	0	0	0	kein
1 % LPT in BC	0	0	0	0	kein
1 % LPT in ME1	1,7	1,7	0	0	leicht
1 % LPT in ME1, Wdh.	3,8	3,8	0	0	leicht

In Kapitel 4.5.1. Toxikologische Eigenschaften der Bestandteile der Mikroemulsionen (ab Seite 43) wurde berichtet, dass die Inhaltsstoffe der ME1 und ME2 Haut und Augen minimal bis mäßig reizen können. Zudem besitzen die Systeme mit 25 % einen hohen Emulgatorgehalt, weswegen mit einem positiven Ergebnis im HET-CAM gerechnet wurde [309]. Entgegen dieser Annahme zeigten ME1 und ME2 (wirkstofffrei) gemäß ICCVAM-Definition kein reizendes Potential an der CAM. Für ME1 resultierte im ersten Versuch ein IS von 0,3, da an zwei Eiern nach 241 s bzw. 245 s leichte Hämorrhagie auftrat. Dieses Ergebnis wurde im Wiederholungsversuch nicht bestätigt, da an keinem der Eier irritative Ereignisse beobachtet wurden. Es resultierte ein IS von 0. ME2 wirkte mit einem IS von 0 ebenfalls nicht reizend an der CAM. Dies ist vermutlich auf den nichtionogenen Charakter

der Emulgatoren zurückzuführen. Vorangegangene Arbeiten von Fitsum Sahle belegten bereits die gute Verträglichkeit einer O/W-ME mit bis zu 40 % Polyglycerol-4-laurat [242]. Auch die Basiscreme DAC wurde gut vertragen und zeigte keine Anzeichen von Hämorrhagie, Lyse oder Koagulation, sodass ein IS von 0 erhalten wurde.

Weiterhin wurden peptidhaltige Formulierungen mit je 1 % Peptid in die Untersuchungen einbezogen. Anhand dieser Formulierungen sollte herausgefunden werden, inwiefern die Peptide reizend sind und ob mit einem Gehalt von 1 % bereits der Irritationsgrenzwert überschritten wird. Auf die Bestimmung des genauen Irritationsgrenzwertes der Peptide wurde verzichtet, da hierfür eine zu große Menge Peptid nötig gewesen wäre. Für die peptidhaltigen BC waren keine irritativen Ereignisse an der CAM erfassbar und es wurden IS von 0 erhalten. Gleiches galt für die ME1 mit 1 % LPA und LPBG. Für die ME1 mit 1 % LPT wurde in zwei Versuchen leichte Hämorrhagie an drei bzw. fünf von sechs Eiern beobachtet. Die erhaltenen IS von 1,7 und 3,8 weisen auf ein leicht reizendes Potential hin. Da der HET-CAM ein Modell zur Testung der Schleimhautverträglichkeit bzw. Verträglichkeit am Auge darstellt, ist nicht zwingend davon auszugehen, dass auch nach dermalen Anwendung Reizungen auftreten.

Die Ergebnisse des HET-CAM weisen auf eine gute Verträglichkeit der ME und BC mit und ohne Peptid bei Anwendung auf der Haut hin. Um reizende Effekte vollständig auszuschließen, sollten weitere Untersuchungen, beispielsweise ein einfacher Epikutantest an Probanden durchgeführt werden.

5. Penetrationsuntersuchungen an peptidhaltigen Formulierungen

Mit Hilfe von Penetrationsversuchen an der Diffusionszelle nach Franz [310] wurde untersucht, ob und inwieweit verschiedene Peptide in der Lage sind, in die menschliche Haut zu penetrieren und ihr jeweiliges Zielkompartiment zu erreichen. Weiterhin wurde beleuchtet, ob sich chemische Modifizierungen auf das Penetrationsvermögen von Peptiden auswirken und inwiefern verschiedene Vehikel die Verfügbarkeit am Wirkort optimieren.

Für *in vitro* Penetrationsversuche wird die Anwendung von *finite-dose*-Bedingungen (begrenzte Wirkstoffmenge im Donor) gegenüber der überschüssigen Dosis (*infinite dose* mit $c_{\text{Donor}} \gg c_{\text{Akzeptor}}$) bevorzugt und wurde auch für die vorliegende Arbeit verwendet, da so realistische Anwendungsbedingungen nachgeahmt werden [311, 312]. Allerdings wird folglich kein *steady state* mit konstantem Flux erreicht und der penetrierte Anteil wird mit zunehmender Zeit geringer.

In der Praxis werden meist weniger als 1 mg/cm² eines kosmetischen Produkts auf die Haut aufgetragen [34]. Im Penetrationsversuch werden 20 mg Formulierung pro Hautstück (3,1416 cm², entspricht 6,37 mg/cm²) appliziert. Dies gewährleistet sowohl eine

gleichmäßige Verteilung der Formulierung auf der Haut, als auch die Quantifizierbarkeit des Analyten und somit reproduzierbare, zuverlässige Ergebnisse.

Für die Penetrationsversuche wird Humanhaut verwendet. Diese wird für *in vitro* Penetrationsversuche bevorzugt, da die Haut tierischer Spezies, insbesondere von Nagetieren, eine höhere Permeabilität aufweist [66, 128, 313-317]. Auch die Körperregion beeinflusst die Permeabilitätseigenschaften der Haut, beispielsweise aufgrund der unterschiedlichen Dicken der Epidermis. Möchte man Penetrationsprofile verschiedener Formulierungen miteinander vergleichen, sollte daher Haut der gleichen Körperregion verwendet werden [316]. In den durchgeführten Experimenten wurde dies überwiegend berücksichtigt und, soweit verfügbar, Mammahaut eingesetzt, die im Rahmen chirurgischer Eingriffe (Mammareduktionsplastiken) von lebenden Spendern gewonnen wurde. Aufgrund mangelnder Verfügbarkeit musste in einigen Versuchen auf Leichenhaut anderer Körperregionen zurückgegriffen werden (siehe Anhang F: Übersicht über die Penetrationsdaten ab Seite 141). Diese weist wahrscheinlich eine veränderte metabolische Aktivität gegenüber Hautproben lebender Spender auf [318].

Nach Entnahme und Präparation wurde die Haut schockgefrostet und bei -20 °C gelagert. Wie in Kapitel 3.4. Stabilität (ab Seite 20) beschrieben, wird hierdurch die Enzymaktivität reduziert [51, 83, 207, 213, 214]. Inwiefern die Permeabilität der Haut, sowie die Barriereigenschaften des abgestorbenen SC durch den Gefrier- und Auftauprozess beeinträchtigt werden, ist umstritten. In einigen Studien wurde kein Einfluss auf die Penetration gezeigt [319-321], andere belegen mit zunehmender Dauer der Lagerung im gefrorenen Zustand einen erhöhten Flux [317, 322-324]. Untersuchungen von Sintov *et al.* ergaben, dass bei unterschiedlichen Hautzuständen die Permeabilität auch von der Art des Vehikels beeinflusst wird [128]. Um falsche Schlussfolgerungen aus den Penetrationsstudien zu vermeiden, wurden für die Versuche deren Ergebnisse miteinander verglichen werden sollten, überwiegend Hautstücke des gleichen Spenders verwendet, die unter gleichen Bedingungen gelagert wurden.

Als Akzeptorlösung werden üblicherweise Puffersysteme mit einem pH-Wert von 7,4 verwendet, um physiologische Verhältnisse nachzuempfinden [311, 316]. Für die Versuche mit radioaktivem Tracer wurde daher phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) pH 7,4 als Medium ausgewählt. Da Puffersalze die Analytik mittels LC-MS beeinträchtigen, kam in den Versuchen mit LPA, LPBG und LPT Wasser als Akzeptormedium zum Einsatz. Weiterhin sollte sich der Analyt gut im verwendeten Akzeptormedium lösen, damit sink-Bedingungen vorliegen [311]. Sink-Bedingungen herrschen, wenn die Akzeptorkonzentration (c_A) wesentlich geringer als die Sättigungskonzentration (c_s) ist, wobei ein Grenzwert bisher nicht festgelegt wurde ($c_A < 0,1 c_s$ bis $c_A < 0,3 c_s$) [325]. Die unmodifizierten Peptide GEKG, PKEK, LPA, LPBG und LPT sind sehr gut in Wasser löslich, sodass diese Voraussetzung gegeben sein sollte (siehe 3.2.2. Löslichkeit, Seite 15). Pal-GEKG und Pal-PKEK weisen eine

begrenzte Löslichkeit in wässrigen Medien auf, sodass Sättigungseffekte die Penetration beeinflussen könnten.

Die Penetrationsergebnisse sind in Form von Penetrationsprofilen dargestellt, die jeweils den Peptidanteil in den untersuchten Proben zeigen. Auf der Ordinate sind die Proben in der Reihenfolge angeordnet, in der die Peptide im Versuch mit dem jeweiligen Kompartiment in Kontakt kamen. Mit dem Tupfer wurde der nicht penetrierte Teil am Versuchsende von der Hautoberfläche entfernt. Er repräsentiert daher den nicht-penetrierten Anteil. Danach folgen die Hautproben des SC, der lebenden Epidermis, Dermis und das übrige Hautstück Stumpf. Schnitte der lebenden Epidermis, Dermis und Stumpf sind auch als lebende Hautschichten zusammengefasst. Das Hautstück liegt im Penetrationsversuch auf einer Gaze, deren Peptidgehalt jedoch nicht in allen Versuchen bestimmt wurde. Darunter befindet sich der Akzeptor. In Gaze und Akzeptor wurde der permeierte Peptidanteil nachgewiesen.

Profile der Penetrationsversuche, bei denen das Peptid direkt mittels LC-MS in den Proben quantifiziert wurde (LPA, LPBG, LPT), zeigen den absoluten Peptidanteil. Für Versuche mit radioaktivem Peptidmaterial (GEKG, Pal-GEKG; PKEK und Pal-PKEK) ist der relative Peptidanteil bezogen auf die mittlere WFR des Versuchs in den Penetrationsprofilen abgebildet. Dies ist möglich, da alle Medien (Tupfer, Haut inklusive Stumpf, Gaze und Akzeptormedium), die mit dem Analyten in Kontakt kommen, analysiert werden. Grund für dieses Vorgehen ist, dass in Versuchen mit radioaktivem Material in vorangegangenen Studien der Abteilung Experimentelle Dermatologie (Universitätsklinik und Poliklinik für Dermatologie und Venerologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg) schwankende WFR beobachtet wurden. Eine eindeutige Ursache für diese Schwankungen konnte nicht aufgedeckt werden. Möglicherweise wird die Reaktion der Szintillatoren durch Matrixbestandteile beeinflusst. Auch durch das experimentelle Vorgehen können Schwankungen der WFR entstehen. So wurde die Eichgerade mit einer Mischung aus 2,5-Diphenyloxazol (PPO) und 1,4-bis-2-(5-Phenyloxazolyl)-benzen (POPOP) als Szintillator erstellt (siehe 7.1.2. Flüssigkeitsszintillationsmessung, Seite 94). Für die wässrige Akzeptorlösung sowie den Gazeextrakt wurde jedoch Hionic-Fluor als Szintillator verwendet (siehe 7.5.1. Penetrationsuntersuchungen mit radioaktiv markiertem Peptidmaterial, Seite 102). Die Darstellung der Ergebnisse als relative Anteile soll eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse gewährleisten.

Die statistische Auswertung relativer Daten ist nicht üblich. Anhand der geringen Versuchszahl ($n=3$) kann zudem nicht belegt werden, ob die Daten normalverteilt sind. Dennoch werden die erhaltenen Daten mittels einfaktorieller Varianzanalyse (one-way ANOVA) statistisch ausgewertet und zum Vergleich der Dunnett's Test als Post-Hoc Analyse durchgeführt (siehe 7.6. Auswertung und Statistik, Seite 104). Dies soll verdeutlichen, ob Unterschiede zwischen den Versuchszeiten und Formulierungen statistisch relevant sind.

Weiterhin ist jeweils ein Tiefenprofil dargestellt, in dem die absolute Peptidmenge pro Volumen der Hautschnitte in μM gegen die Hauttiefe aufgetragen ist und das die jeweilige Schichtdicke der Hautprobe einbezieht.

5.1. Untersuchung der Penetration aus Standardvehikeln

Als Standardvehikel für die Peptide GEKG, PKEK, Pal-GEKG und Pal-PKEK wurde eine O/W-Emulsion verwendet, die von der Evonik Industries AG entwickelt wurde. Die Zusammensetzung ist in Tabelle 29 (Formulierung 1, Seite 137) angegeben. Für die Tripeptide LPA, LPBG und LPT wurde die BC als Standardvehikel eingesetzt.

5.1.1. GEKG

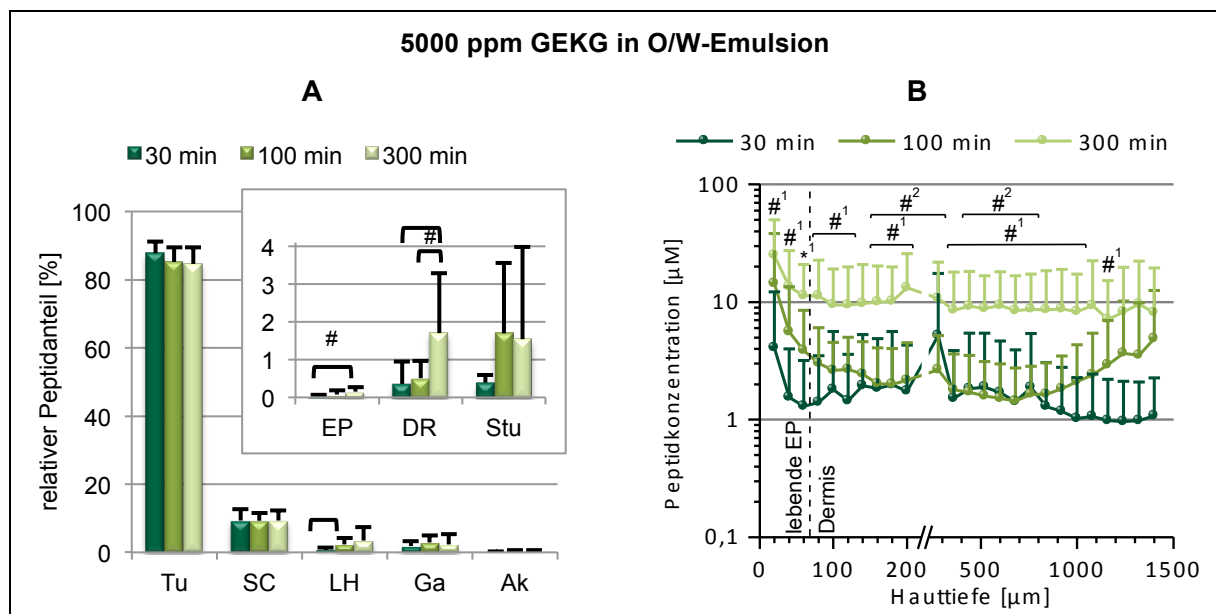


Abbildung 27: (A) Penetrationsergebnisse von GEKG aus der O/W-Emulsion mit 5000 ppm Peptidgehalt als relativer Anteil in den untersuchten Proben Tupper (Tu), SC, lebende Hautschichten (LH = Summe aus vitaler Epidermis (EP), Dermis (DR) und Stumpf (Stu)), Gaze (Ga) und Akzeptormedium (Ak); MW \pm SD; n = 3 für Tu, SC, Ga, Ak; n = 9 für LH, EP, DR, Stu und (B) das dazugehörige Tiefenprofil (TP) ohne SC; MW \pm SD; n = 9; *p < 0,01; #p < 0,05 für Unterschiede zwischen den Versuchszeiten, TP: ¹30 min vs. 300 min, ²100 min vs. 300 min

In Abbildung 27A ist das Penetrationsprofil von GEKG nach Applikation der O/W-Emulsion dargestellt. Es wird deutlich, dass zu allen Versuchszeiten der überwiegende Teil (>84 %) des GEKG nicht in die Haut penetrierte. Ein relativer Anteil von ca. 9,4 % war in der Lage, aus der Standardcreme in das SC einzudringen. In den lebenden Hautschichten wurde eine relative Peptidmenge von 0,8–3,4 % nachgewiesen. Der permeierte Peptidanteil in Gaze und Akzeptor betrug in der Summe zwischen 2 % und 3 %. Die einzelne Darstellung der Ergebnisse für Epidermis, Dermis und Stumpf zeigen, wie die Summe der lebenden Hautschichten, tendenziell einen Anstieg des relativen Peptidanteils bei längeren Versuchszeiten. Die größeren Peptidanteile in der Dermis und im Stumpf lassen sich mit der größeren Dicke dieser Hautproben erklären.

Das Tiefenprofil in Abbildung 27B verdeutlicht, dass die GEKG-Konzentration in der Haut zwischen 1 μM und 25 μM betrug. Im Zielkompartiment Dermis lag die Peptidkonzentration unter 14 μM und längere Versuchszeiten resultierten tendenziell in höheren Peptidkonzentrationen. In den Schnitten der lebenden Epidermis nahm die Konzentration mit zunehmender Tiefe ab, in der Dermis lag GEKG überwiegend gleichmäßig verteilt vor.

Die relativen Peptidanteile und auch die Peptidkonzentrationen in den lebenden Hautschichten weisen zum Teil erhebliche Standardabweichungen auf (Variationskoeffizient $VK > 100\%$). Dies liegt darin begründet, dass die menschliche Haut eine sehr heterogene Oberflächenbeschaffenheit aufweist. Hautanhangsgebilde, wie Haarfollikel, Talk- und Schweißdrüsen sind ungleichmäßig verteilt. Zudem wird zur Konzentrationsbestimmung in den verschiedenen Hautschichten nur ein sehr kleines Hautstück mit einem Durchmesser von 0,6 cm entnommen. Befindet sich innerhalb dieser Stanze eine Hautpore, ist die Penetration und Permeation in diesem Bereich begünstigt. Somit wird in dieser Probe mehr Peptid in tieferen Hautschichten nachzuweisen sein als in den übrigen analysierten Stanzen. Dennoch lassen sich aus den erhaltenen Ergebnissen Erkenntnisse über das Penetrationsvermögen von GEKG ableiten. Wiederholt wurde beschrieben, dass *in vivo* und *in vitro* Daten gut korrelieren [310, 312, 326-329]. Schlussfolgerungen auf absolute Konzentrationen im Zielkompartiment Dermis bei *in vivo* Anwendung sind jedoch nicht möglich.

Aus der Literatur ist bekannt, dass hydrophile Peptide bei Applikation von Standardvehikeln (Lösung, Emulsionen, Gel) häufig in geringem Ausmaß oder gar nicht in der Lage sind, in intakte Haut zu penetrieren bzw. durch diese zu permeieren [14, 63, 83, 97]. Obwohl nur wenig GEKG das Zielkompartiment Dermis erreichte, könnte es aufgrund seiner Potenz trotzdem biologische Effekte erzielen. Darauf lassen geringe Einsatzkonzentrationen in *in vivo* (10–100 ppm) und *in vitro* Studien (1–10 ppm) schließen [163, 175, 179]. Trotzdem wäre eine Optimierung des Penetrationsverhaltens wünschenswert, da so die Konzentration im kosmetischen Produkt und damit Kosten reduziert werden könnten.

GEKG besitzt aus Mangel an chromophoren Gruppen ein schlechtes Absorptionsvermögen, sodass bei der Quantifizierung mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie mit UV-Detektion (HPLC-UV) sehr hohe Bestimmungsgrenzen (LOQ) von 1,0 $\mu\text{g/mL}$ und 2,0 $\mu\text{g/mL}$ erhalten wurden (siehe 7.1.1. Chromatographische Methoden (LC-MS und HPLC-UV), Seite 94). Proben aus Penetrationsversuchen, in denen geringe Peptidkonzentrationen erwartet werden, sind damit nicht analysierbar. Eine massenspektroskopische Detektion (LC-MS) war nicht möglich, da GEKG nicht ausreichend gut ionisierte. Daher wurde radioaktiv markiertes GEKG eingesetzt und mittels Flüssigkeitsszintillationsmessung quantifiziert. Da GEKG in Gegenwart von Hautbestandteilen instabil ist (siehe 3.4.1. Stabilität von GEKG, Palmitoyl-GEKG, PKEK und Palmitoyl-PKEK, Seite 21), wurde bei längeren Versuchszeiten neben dem intakten Peptid auch der radioaktiv markierte Metabolit miterfasst.

Die mittleren WFR der Versuche lagen in einem vergleichbaren Bereich zwischen 78 und 81 % (siehe Tabelle 35, Seite 142 in Anhang F: Übersicht über die Penetrationsdaten).

5.1.2. PKEK

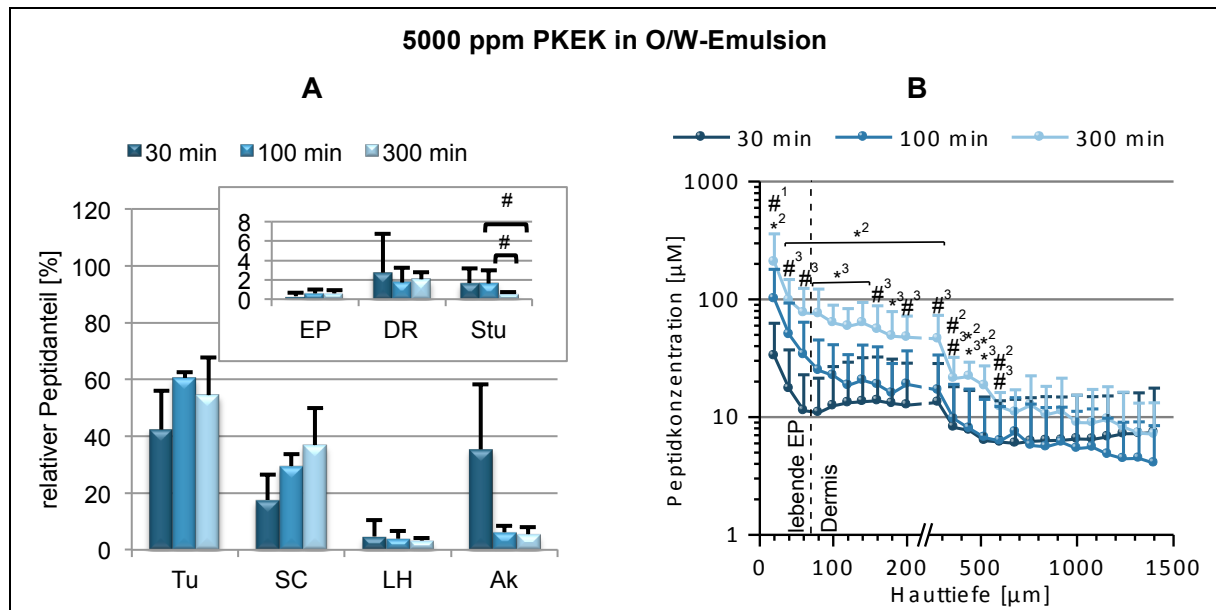


Abbildung 28: (A) Penetrationsergebnisse von PKEK aus der O/W-Emulsion mit 5000 ppm Peptidgehalt als relativer Anteil in den untersuchten Proben Tupfer (Tu), SC, lebende Hautschichten (LH = Summe aus vitaler Epidermis (EP), Dermis (DR) und Stumpf (Stu)) und Akzeptormedium (Ak); MW \pm SD; n = 3 für Tu, SC, Ak; n = 9 für LH, EP, DR, Stu und (B) das dazugehörige Tiefenprofil (TP) ohne SC; MW \pm SD; n = 9; *p < 0,01; #p < 0,05 für Unterschiede zwischen den Versuchszeiten, TP: ¹30 min vs. ²100 min, ²30 min vs. ³300 min, ³100 min vs. ³300 min

Das Penetrationsprofil für PKEK nach Anwendung der O/W-Emulsion mit einem Peptidgehalt von 5000 ppm in Abbildung 28A zeigt, dass dieses Peptid bereits nach kurzer Versuchszeit von 30 Minuten zu 18 % in das SC penetrierte. Mit steigender Versuchszeit stieg die Peptidmenge in der Hornschicht weiter auf bis zu 37 % nach 300 Minuten an. Der größte Peptidanteil (42–60 %) wurde zu allen Versuchszeiten auf der Hautoberfläche wiedergefunden. In den lebenden Hautschichten betrug der Peptidanteil weniger als 5 %. Im Akzeptor war zu allen Versuchszeiten PKEK nachweisbar, wobei nach 30 Minuten mit 35 % der größte Anteil detektiert wurde. Dieser Wert unterlag allerdings großen Schwankungen (VK: 65 %) und korreliert mit einem geringeren, ebenfalls stark schwankendem Peptidanteil im Tupfer (VK: 32 %). Wie bereits für GEKG diskutiert, könnte dies auf ein erhöhtes Vorkommen von Poren auf den Hautstücken zurückzuführen sein, die eine verstärkte transglanduläre und transfollikuläre Penetration bewirken. Eine weitere Möglichkeit ist, dass bei einzelnen Versuchen Anteile der Formulierung aufgrund von Kapillarkräften über die Filtergaze, auf der die Haut lag, direkt in den Akzeptor gezogen wurde. Die gesonderte Darstellung von Epidermis, Dermis und Stumpf in Abbildung 28A sowie das Tiefenprofil (Abbildung 28B) zeigen, dass bei längeren Versuchszeiten die Peptidmenge in der lebenden Epidermis tendenziell zunahm. Dies konnte für die tieferen Hautschichten nicht beobachtet

werden. In der Grenzregion zwischen lebender Epidermis und Dermis, die das Zielkompartiment für PKEK darstellt, lag die Peptidkonzentration zwischen 11 und 77 μM .

PKEK war im Vergleich zu GEKG besser in der Lage in die Haut zu penetrieren. Möglicherweise liegt dies an der geringer ausgeprägten Hydrophilie, die sich in höheren logP- und logD-Werten bemerkbar machte (siehe Kapitel 3.2.3. Kalkulierte Parameter mit Einfluss auf das Penetrationsverhalten ab Seite 16). Der größte Anteil verblieb nach 100 und 300 min jedoch im SC und gelangte nicht in die lebenden Hautschichten. Im seinem Zielkompartiment erreichte PKEK gegenüber GEKG eine dreifach höhere Konzentration.

PKEK wurde wie GEKG als radioaktiver Tracer im Penetrationsversuch eingesetzt, da die HPLC-UV Methode aufgrund der hohen Bestimmungsgrenze von 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ nicht geeignet war, um Penetrationproben zu analysieren (siehe 7.1.1. Chromatographische Methoden (LC-MS und HPLC-UV), Seite 94). Da PKEK in Gegenwart von Hautbestandteilen vergleichsweise stabil ist, entspricht die detektierte Radioaktivität sehr wahrscheinlich dem intakten Peptid (siehe 3.4.1. Stabilität von GEKG, Palmitoyl-GEKG, PKEK und Palmitoyl-PKEK, Seite 21).

Auffällig war, dass die WFR zwischen den Versuchszeiten stark fluktuierten (30 min: $89 \pm 39\%$; 100 min: $101 \pm 18\%$, 300 min: $202 \pm 25\%$) (siehe Tabelle 37, Seite 143 in Anhang F: Übersicht über die Penetrationsdaten). Mögliche Ursachen dafür wurden bereits beleuchtet und können im experimentellen Vorgehen (Verwendung verschiedener Szintillatoren) und der Beeinflussung der Reaktion der Szintillatoren durch Matrixeffekte zu finden sein.

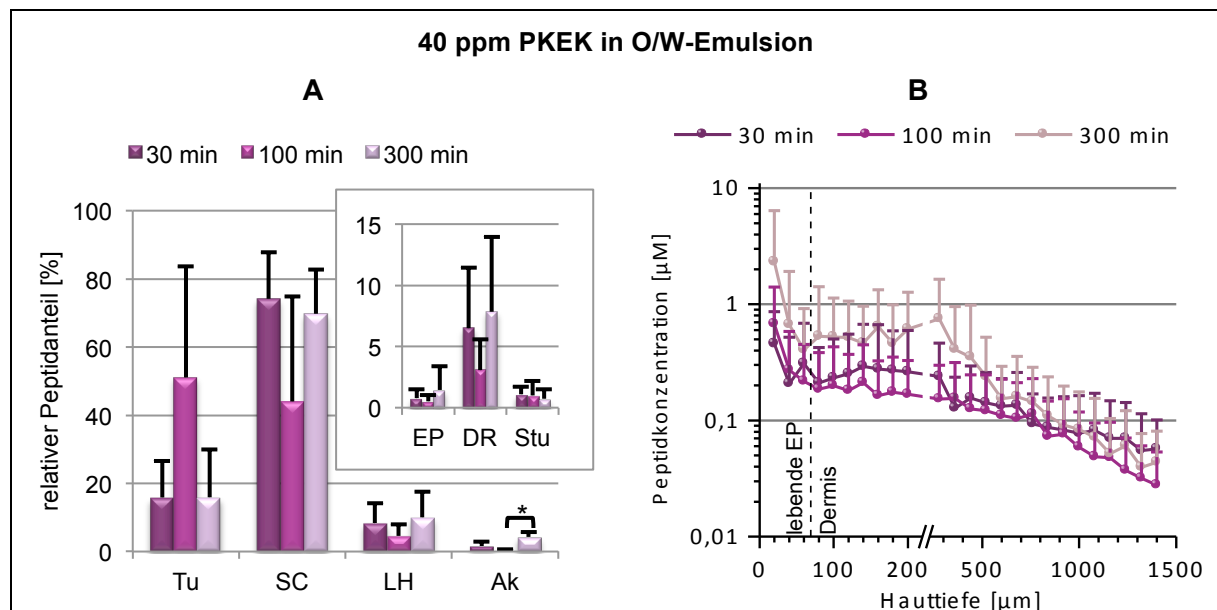


Abbildung 29: (A) Penetrationsergebnis von PKEK aus der O/W-Emulsion mit 40 ppm Peptidgehalt als relativer Anteil in den untersuchten Proben Tupfer (Tu), SC, lebende Hautschichten (LH = Summe aus vitaler Epidermis (EP), Dermis (DR) und Stumpf (Stu)) und Akzeptormedium (Ak); MW \pm SD; n = 3 für Tu, SC, Ak; n = 9 für LH, EP, DR, Stu und (B) das dazugehörige Tiefenprofil ohne SC; MW \pm SD; *p < 0,01; #p < 0,05 für Unterschiede zwischen den Versuchszeiten

Weiterhin wurde die PKEK-haltige O/W-Emulsion mit einem geringeren Peptidanteil von 40 ppm untersucht, um zu sehen, wie sich die Konzentrationsänderung auf das Penetrationsvermögen auswirkt. Die Konzentration 40 ppm entspricht außerdem der in *in vivo* Studien verwendeten Konzentration sowie dem empfohlenen Konzentrationsbereich in kosmetischen Produkten [178, 179, 187].

Das Penetrationsprofil in Abbildung 29A zeigt, dass sich die Ergebnisse für 30 und 300 min Versuchszeit glichen. Mit 74 % beziehungsweise 70 % wurde der größte relative Peptidanteil im SC nachgewiesen. Auf der Hautoberfläche waren mit jeweils 16 % relativem Anteil wenig Peptid verblieben. Rund 2 % beziehungsweise 4 % PKEK permeierten durch die Haut hindurch und wurden im Akzeptor detektiert. In den lebenden Hautschichten betrug der relative Peptidanteil 8 % und 10 %. Nach 100 min Versuchszeit war der nicht-penetrierte Anteil im Tupfer mit 51 % tendenziell höher als nach 30 und 300 min. Im Gegenzug war der Anteil im SC und den lebenden Hautschichten tendenziell geringer, wobei die Werte der Parallelversuche stark voneinander abwichen (VK: 64–75%). Wie bereits erläutert, können hierfür Poren von Haarfollikel, Talk- und Schweißdrüsen verantwortlich sein.

Dem Tiefenprofil in Abbildung 29B ist zu entnehmen, dass die absolute Peptidkonzentration mit zunehmender Hauttiefe abnahm, wobei nach der längsten Versuchszeit von 300 min tendenziell mehr PKEK in die oberen Hautschichten gelangte. Die PKEK-Konzentration betrug im Bereich des Zielkompartiments zwischen 0,2 und 0,5 μM , was mit der geringeren Konzentration des Peptids im Vehikel zu begründen ist.

Tabelle 14: Ergebnisse des Vergleichs der Penetrationsprofile von 40 ppm PKEK in O/W-Emulsion und 5000 ppm PKEK in O/W-Emulsion; #p < 0,05, *p < 0,01 für Unterschiede zwischen den Formulierungen

	Tupfer	SC	Lebende Haut	Akzeptor	Vitale Epidermis	Dermis	Stumpf
30 min	n.s.	*40 > 5000	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
100 min	n.s.	n.s.	n.s.	#40 < 5000	n.s.	n.s.	n.s.
300 min	#40 < 5000	#40 > 5000	#40 > 5000	n.s.	n.s.	#40 > 5000	n.s.

n.s.: nicht signifikant

Bei der vergleichenden Betrachtung der relativen Peptidanteile in den verschiedenen Proben nach Anwendung der O/W-Emulsionen mit 5000 ppm beziehungsweise 40 ppm PKEK (Abbildung 28A und Abbildung 29A) ergeben sich signifikante Unterschiede überwiegend für die längste Versuchszeit von 300 min (Tabelle 14). Bei der Formulierung mit 40 ppm PKEK erreichten größere relative Anteile das SC und die Dermis. Der Peptidanteil in der Epidermis war nur tendenziell erhöht. Studien von Alvarez-Figueroa *et al.*, die zeigten, dass die Anwendung einer Methotrexat-haltigen ME mit geringerer Konzentration zu höheren Wirkstoffmengen in der Haut führt, bestätigen diese Beobachtung [330]. Bei der Formulierung mit 5000 ppm Peptid war der Anteil größer, der auf der

Hautoberfläche verblieben ist. Auch der in den Akzeptor permeierte Peptidanteil war bei dieser Formulierung größer (bei 100 min signifikant). Möglicherweise besitzt das SC nur eine begrenzte Kapazität für das hydrophile PKEK. Deshalb konnte aus der höher konzentrierten Formulierung prozentual gesehen weniger Peptid in die Haut penetrieren und der penetrierte Anteil ging bevorzugt in den Akzeptor über. Dennoch führte die höhere thermodynamische Aktivität von PKEK und der damit verbundene höhere Konzentrationsgradient zwischen Vehikel und Haut zu ungefähr 100-fach höheren absoluten Peptidkonzentrationen in der Haut. Dieser Unterschied war aufgrund hoher Standardabweichungen jedoch nicht signifikant.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Konzentration in der Formulierung durchaus das Penetrationsvermögen von PKEK beeinflusst. Sie sollte so festgelegt werden, dass mit dem entsprechenden Vehikel wirksame Konzentrationen im Zielkompartiment erreicht werden.

Die mittleren WFR in den Versuchen mit 40 ppm PKEK in der Formulierung war mit 55–66 % geringer als im Versuch mit 5000 ppm (siehe Tabelle 39, Seite 144). Die Schwankungen zwischen den Versuchszeiten waren vergleichsweise gering. Der Versuch mit 40 ppm erfolgte etwa 1 Jahr nach dem Versuch mit 5000 ppm Peptidgehalt in der Creme. Einen Aktivitätsverlust des radioaktiven Materials durch die Lagerung ist daher durchaus möglich. Allerdings wird für jeden Versuch eine Kalibrierung durchgeführt, sodass dies nicht die Ursache für die geringere WFR darstellen sollte. Weitere Ursachen (Verwendung verschiedener Szintillatoren, Matrixeffekte) wurden bereits erläutert.

5.1.3. LPA, LPBG und LPT

Die Penetrationsversuche mit den Tripeptiden LPA, LPBG und LPT unterschieden sich von den anderen durch die für die Quantifizierung verwendete Methode (LC-MS), das Schnittschema zur Gewinnung der Hautproben, sowie die Anzahl der Versuche und Versuchszeiten. Für LPA, LPBG und LPT wurden Einzelversuche (n=1) zu einer Versuchszeit von 300 min durchgeführt. Da eine statistische Auswertung somit nicht möglich ist, haben die Ergebnisse begrenzte Aussagekraft. Sie liefern einen ersten Ausblick auf das Penetrationsvermögen von LPA, LPBG und LPT. Für zuverlässige Ergebnisse sollten, wie für GEKG, PKEK, Pal-GEKG und Pal-PKEK, Versuche mit Dreifachbestimmung durchgeführt werden. Die SC-Probe wurde durch einen 10 µm-Schnitt gewonnen und nicht durch Klebestreifenabrisse. Da die Dicke der Probe bekannt ist, ist eine Darstellung im Tiefenprofil möglich.

Abbildung 30 zeigt die Penetrationsergebnisse von LPA, LPBG und LPT nach Applikation der BC mit einem Peptidgehalt von jeweils 1,0 %. Bei den Hautproben sind jeweils die Mittelwerte und die Standardabweichungen der Peptidanteile aus den drei Stanzen des einen Hautstückes aus dem Einzelversuch dargestellt.

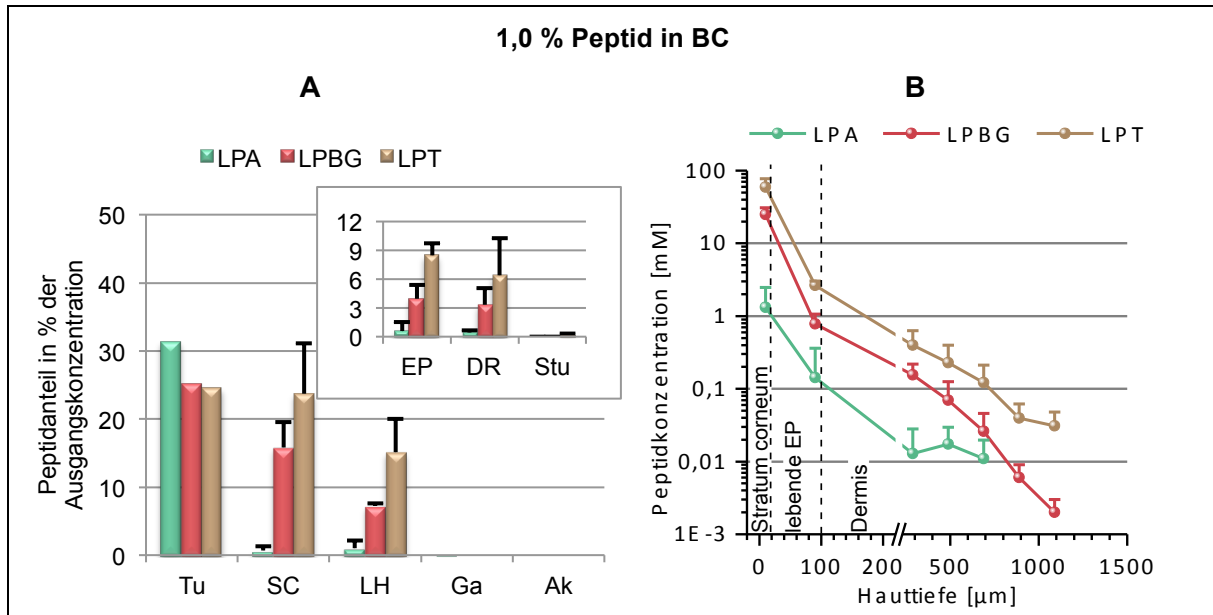


Abbildung 30: (A) Penetrationsergebnis von LPA, LPBG und LPT aus der BC mit 1,0 % Peptidgehalt als Anteil der applizierten Dosis in den untersuchten Proben Tupfer (Tu), SC, lebende Hautschichten (LH = Summe aus vitaler Epidermis (EP), Dermis (DR) und Stumpf (Stu)), Gaze (Ga) und Akzeptormedium (Ak); MW \pm SD; n = 1 für Tu, Ga, Ak; n = 3 für SC, LH, EP, DR, Stu und (B) die dazugehörigen Tiefenprofile mit SC; MW \pm SD; n = 3 nach einer Versuchszeit von 300 min

Deutlich ist zu erkennen, dass sich die Peptide trotz ähnlicher Struktur in ihrem Penetrationsverhalten unterschieden. Der größte Teil von LPA (31 %) verblieb auf der Hautoberfläche und wurde im Tupfer wiedergefunden. In die verschiedenen Hautschichten SC, Epidermis, sowie die obere Dermis gelangte nur wenig Peptid (<0,7 %). In tieferen Hautschichten (DR4–5 und Stumpf) war kein LPA mehr nachweisbar (Messwerte \leq LOD oder 0) und im Gazeextrakt lag die Konzentration unter der LOQ (ca. 0,04 % der applizierten Dosis). Im Akzeptor konnte auch nach Aufkonzentrierung kein LPA detektiert werden.

LPBG penetrierte nach Anwendung der BC besser in obere Hautschichten als LPA. 16 % waren in der Hornschicht nachweisbar und 3,3 % in der Dermis. Trotzdem verblieb der größte Peptidanteil mit 25 % wieder auf der Hautoberfläche. Im untersten Schnitt der Dermis (DR5), sowie Stumpf und Gaze lag die LPBG-Konzentration in den Proben teilweise unterhalb der LOQ und im aufkonzentrierten Akzeptor war das Peptid nicht detektierbar. Bei LPT wurden vergleichbare Peptidmengen (25 und 24 %) im Tupfer und im SC wiedergefunden. 8,5 % penetrierten in die vitale Epidermis und 6,4 % wurden in der Dermis nachgewiesen, sowie 0,3 % im Stumpf. Im Gazeextrakt lag die LPT-Konzentration wiederum trotz Aufkonzentrierung unterhalb der LOQ und im Akzeptor wurde kein LPT detektiert.

In den Tiefenprofile in Abbildung 30B ist zu erkennen, dass die Peptidkonzentration jeweils mit zunehmender Hauttiefe abnahm. LPA erreichte die lebenden Hautschichten in geringstem Ausmaß zwischen 0,14 mM in der vitalen Epidermis und 0,01–0,02 mM in der oberen Dermis. In tieferen Dermischnitten (DR4–5) war kein LPA detektierbar, was in der logarithmischen Skalierung nicht darstellbar ist. Die geringere Masse von LPA wirkte sich

demnach nicht vorteilhaft auf das Penetrationsvermögen aus. LPBG erreichte die Haut in größerem Ausmaß, was auf seine größere Lipophilie zurückzuführen sein kann. In der vitalen Epidermis betrug die Konzentration 0,78 mM und in den Dermischnitten zwischen 0,16 und 0,002 mM (Zielkompartimente). LPT penetrierte am besten in die Haut. In das SC gelangten 59 mM und in die vitale Epidermis 2,6 mM. In der Dermis betrug die Konzentration zwischen 0,4 und 0,03 mM. Diese Tendenz ist aufgrund analytischer Schwierigkeiten, die nachfolgend erläutert werden, jedoch mit Vorbehalt zu betrachten. Erklärbar ist das bessere Penetrationsverhalten von LPT mit seinen leichten strukturellen Vorteilen gegenüber LPA und LPBG. Es besitzt eine geringere polare Oberfläche und einen Wasserstoffbrückendonator weniger.

LPA, LPBG und LPT wurden mittels LC-MS mit den unter 7.1.1. Chromatographische Methoden (LC-MS und HPLC-UV) (Seite 93) beschriebenen Parametern analysiert. In den Versuchen mit LPA und LPBG lagen die Konzentrationen vieler Proben (untere Dermischnitte und Gaze) unterhalb der LOQ der Methode und eine valide Quantifizierung war somit nicht möglich. Trotzdem wurden diese Proben mit in die Auswertung einbezogen und die Konzentration nicht Null gesetzt, um das Ergebnis nicht zu verfälschen. Bei der Analyse von LPT in den Dermisproben des Versuchs mit der BC traten in den Chromatogrammen Doppelpeaks auf. Da die Proben nach einem Analysenlauf mit Dreifachbestimmung aufgebraucht waren, konnten die Messungen nicht wiederholt werden. Die Signale wurden daher ausgewertet, indem die Flächen des gesamten Doppelpeaks bestimmt wurden, auch wenn die so erhaltenen Ergebnisse nicht valide sind. Für ein gesichertes Ergebnis sollte der Versuch wiederholt werden. Zuvor muss der Ursache für die Doppelpeaks weiter auf den Grund gegangen werden. Gegebenenfalls muss die analytische Methode optimiert werden.

Während der Methodenentwicklung wurden Blindextrakte von Haut und den Formulierungen zur Sicherstellung der Selektivität untersucht. Daher kann ausgeschlossen werden, dass Haut- oder Cremebestandteile für die Doppelpeaks verantwortlich waren. Weitere mögliche Ursachen für Doppelpeaks sind Überladung der Säule, Verschleppung aus dem vorangegangenen Messlauf, falsche Probeninjektion, Abnahme der Trennleistung der Säule oder Kontamination des Laufmittels. Diese können jedoch ebenfalls ausgeschlossen werden, da nicht alle Messungen betroffen waren und Chromatogramme von zwischen den Dermisproben analysierte Standardlösungen oder Tupferproben keine Doppelpeaks zeigten. Anhand von Vorversuchen wurde zudem sichergestellt, dass die Methode ein ausreichendes Elutionsvermögen aufweist und keine Verschleppungseffekte auftreten. Es wurde versucht, Matrixeffekte auszugleichen, indem zu den Kalibrierlösungen Creme- bzw. Hautextrakte hinzugegeben wurden. Denkbar ist jedoch, dass LPT mit Hautbestandteilen in Wechselwirkung trat und deshalb teilweise verzögert eluierte. Da in den Dermisproben der Hautanteil mit 200 µm Schnittdicke größer ist als beim SC (10 µm) oder der Epidermis (40 µm) und zudem ein geringeres Extraktionsvolumen gewählt wurde, kam der

Retentionseffekt erst bei diesen Proben zum Tragen. Durch ein größeres Extraktionsvolumen könnte dem Effekt entgegengewirkt werden. Allerdings wäre die Peptidkonzentration in den Proben dann zu gering, um eine zuverlässige Quantifizierung zu gewährleisten. Die Verwendung von radioaktiv markiertem LPT wäre eine Alternative, um die Quantifizierung in Hautproben zu ermöglichen.

Die WFR der Versuche waren gering (LPA: 33 %, LPBG: 48 %, LPT: 64 %). Sie korrelierten nicht vollständig mit den Ergebnissen des Stabilitätsversuchs (siehe Seite 23), in dem LPBG am wenigsten stabil war, gefolgt von LPA. Übereinstimmend war, dass LPT als stabilstes der drei Peptide auch die höchste WFR zeigte. Allerdings waren die nach 300 min wiedergefundenen Peptidanteile im Stabilitätsversuch um 18–44 % größer als die WFR des Penetrationsversuchs. Dafür ist möglicherweise die unterschiedliche Art der Haut verantwortlich, da in den Stabilitätsversuchen ein HHH aus Ohr-, Nabel- und juveniler Vorhaut verwendet wurde und für die Penetrationsversuche Vollhaut vom Oberarm [57, 211]. Weiterhin können die oben beschriebenen analytischen Schwierigkeiten im Penetrationsversuch zu einer geringeren WFR geführt haben oder auch Verluste durch das Extraktionsverfahren oder Peptidabbau während der Probenlagerung.

Zusammenfassend kann den Ergebnissen entnommen werden, dass die Peptide LPBG und LPT nach Anwendung der BC mit je 1 % Peptid trotz ihrer Hydrophilie in der Lage waren, die Penetrationsbarriere zu überwinden. Sie penetrierten sehr gut in die Haut und erreichten ihr Zielkompartiment in hoher Konzentration. LPA penetrierte nur in sehr geringem Ausmaß aus der BC in die Haut. In tieferen Hautschnitten war es nicht mehr nachweisbar. Keines der drei Peptide war im Akzeptormedium nachweisbar. Die Konzentration in der Gaze lag für LPA, LPBG und LPT trotz Aufkonzentrierung der Probe unterhalb der LOQ, im Stumpf waren sie nicht oder nur in geringem Ausmaß nachweisbar. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass auch *in vivo* nur geringe Mengen von LPA, LPBG und LPT in den Blutkreislauf gelangen. Das Risiko systemischer, unerwünschter Effekte ist somit minimal. Um es vollständig auszuschließen, sind klinische Untersuchungen nötig.

5.2. Optimierung der Penetration durch chemische Modifizierung der Peptide

Studien von Caccetta *et al.* und Foldvari *et al.* zeigten, dass sich eine Lipophilisierung von Peptiden durch Kopplung an Fettsäuren oder kurzkettige Lipoaminoacidsäuren positiv auf das Penetrationsvermögen auswirken kann [44, 45]. Daher wurden N-terminal palmitoylierte Varianten von GEKG und PKEK in die Untersuchungen einbezogen.

5.2.1. Palmitoyl-GEKG

Dem Penetrationsprofil des N-terminal palmitoylierten GEKG in Abbildung 31A ist zu entnehmen, dass das Peptid zu allen Versuchszeiten mit über 88 % überwiegend nicht in die Haut penetrierte. Zwischen 6 % und 8 % penetrierten in die Hornschicht. Der relative

Peptidanteil in den lebenden Hautschichten lag unter 1,6 %. Die gesonderte Darstellung der Ergebnisse für Epidermis, Dermis und Stumpf zeigen, dass der penetrierte Peptidanteil in diesen Schichten zudem stark schwankte (VK: 62–136 %). Dies ist auf die geringen Peptidanteile in diesen Proben zurückzuführen, sowie die bereits erläuterte heterogene Beschaffenheit der Haut. Eine längere Applikationszeit führte nicht zu höheren Peptidkonzentrationen in der Haut. Auch das Tiefenprofil in Abbildung 31B bestätigt dies. Zu allen Versuchszeiten war die Peptidkonzentration in der Haut gering. Im Zielkompartiment Dermis betrug sie zwischen 12 μM und 0,8 μM . Mit zunehmender Hauttiefe nahm die Konzentration ab. Trotz der sehr geringen Peptidanteile in der Haut wurden bis zu 3 % Pal-GEKG auch im Akzeptor wiedergefunden (Abbildung 31A). Allerdings könnte dies zum Teil auf Kapillarkräfte zurückzuführen sein, die geringe Anteile der Formulierung über die Gaze, auf der die Haut lag, direkt in den Akzeptor gezogen haben.

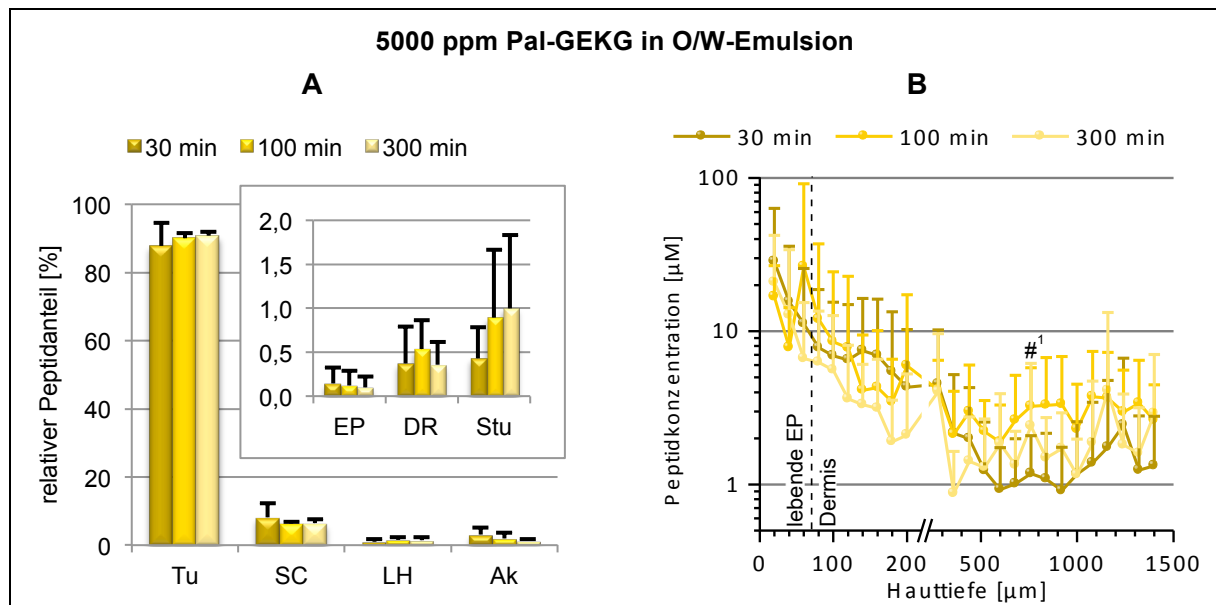


Abbildung 31: (A) Penetrationsergebnis von Pal-GEKG aus der O/W-Emulsion mit 5000 ppm Peptidgehalt als relativer Anteil in den untersuchten Proben Tupfer (Tu), SC, lebende Hautschichten (LH = Summe aus vitaler Epidermis (EP), Dermis (DR) und Stumpf (Stu)) und Akzeptormedium (Ak); MW \pm SD; n = 3 für Tu, SC, Ak; n = 9 für LH, EP, DR, Stu und (B) das dazugehörige Tiefenprofil (TP) ohne SC; MW \pm SD; *p < 0,01; #p < 0,05 für Unterschiede zwischen den Versuchszeiten, TP: 30 min vs. 100 min

Die mittleren WFR der Versuche lagen in einem vergleichbaren Bereich zwischen 157 % und 169 %. Möglicherweise war die Konzentration der radioaktiven Gebrauchslösung durch Verdunstung des Lösungsmittels Ethanol höher als vom Hersteller angegeben, sodass Werte über 100 % resultierten (siehe Tabelle 28: Eigenschaften des radioaktiven Materials, Seite 136 im Anhang).

Die Gegenüberstellung der Ergebnisse des unmodifizierten GEKG und des palmitoylierten Peptids in Abbildung 32 zeigt, dass die N-terminale Palmitoylierung das Penetrationsverhalten des Peptids kaum beeinflusste. Beide Peptide waren nur schlecht in der Lage aus der O/W-Emulsion in die Haut zu penetrieren, sodass zu allen Versuchszeiten

5. Penetrationsuntersuchungen an peptidhaltigen Formulierungen

vergleichbare relative Peptidanteile von 87–90 % auf der Hautoberfläche verblieben. Im SC und den lebenden Hautschichten wurde tendenziell mehr GEKG nachgewiesen. Die permeierten Anteile waren zu allen Versuchszeiten bei Pal-GEKG größer. Diese waren allerdings von hohen Standardabweichungen begleitet und könnten auf bereits beschriebene Kapillareffekte der Gaze zurückzuführen sein. Die vergleichende Betrachtung der Tiefenprofile zeigt, dass die Peptidkonzentrationen in der Haut trotz des hohen Peptidgehalts im Vehikel von 0,5 % bei beiden Peptidspezies nur im mikromolaren Bereich lagen (Abbildung 33). Obwohl die Werte stark fluktuierten, wurde nach 300 Minuten signifikant mehr GEKG im Zielkompartiment Dermis nachgewiesen.

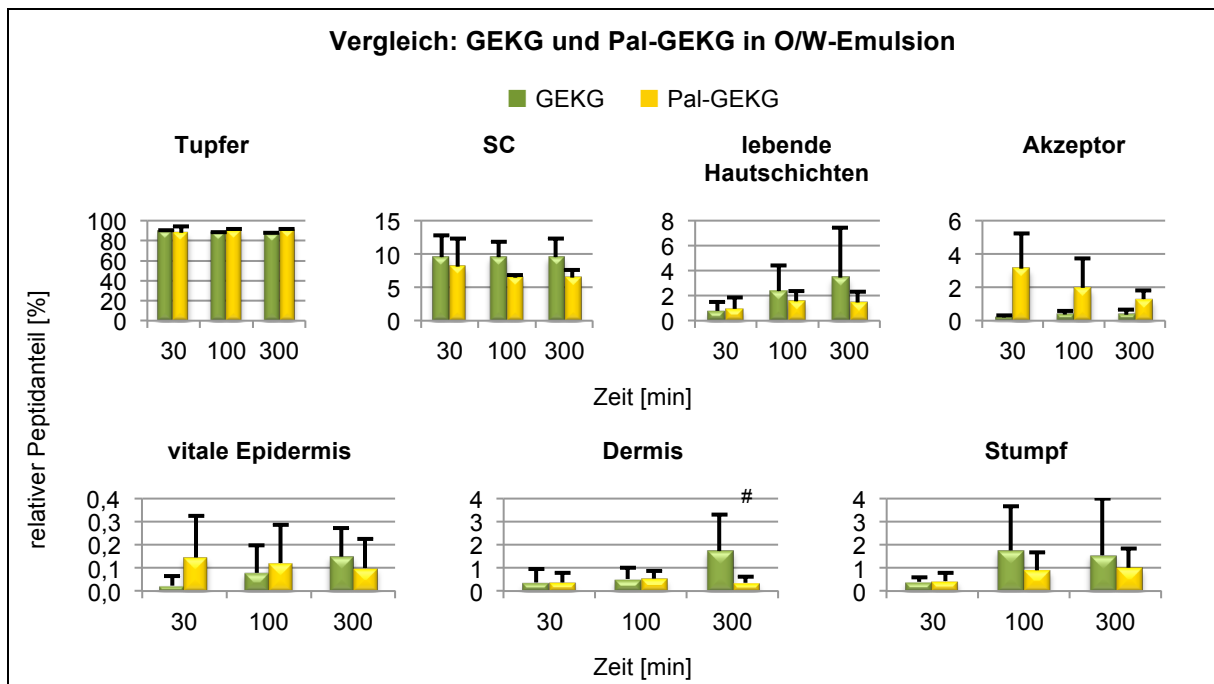


Abbildung 32: Vergleich der Penetrationsergebnisse von GEKG und Pal-GEKG aus der O/W-Emulsion mit 5000 ppm Peptidgehalt als relativer Anteil in den untersuchten Proben; MW \pm SD; n = 3 für Tupfer, SC und Akzeptor; n = 9 für lebende Hautschichten (Summe aus vitaler Epidermis, Dermis und Stumpf), Epidermis, Dermis, Stumpf; #p < 0,05 für GEKG vs. Pal-GEKG

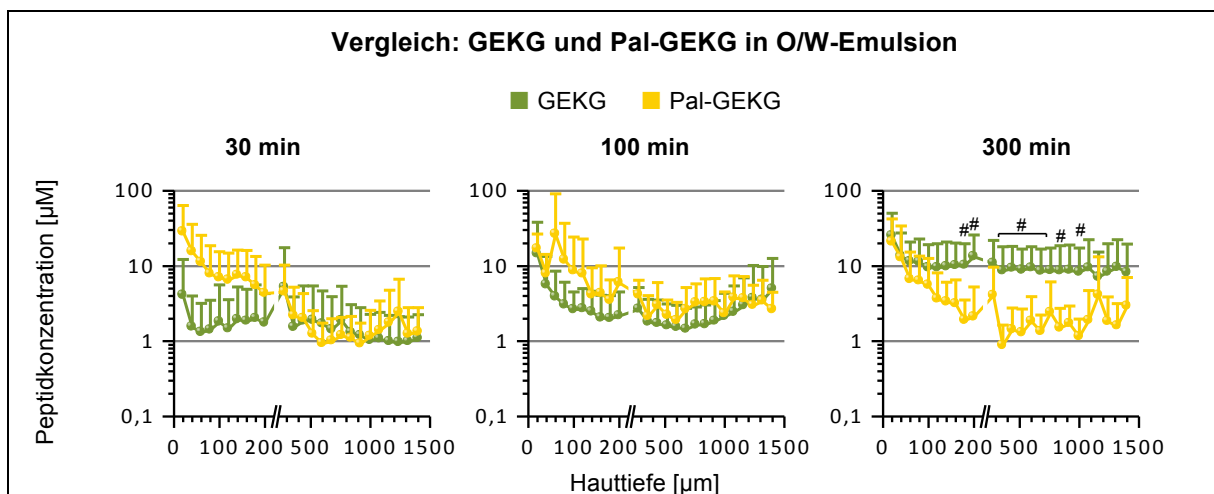


Abbildung 33: Vergleich der Tiefenprofile ohne SC von GEKG und Pal-GEKG aus der O/W-Emulsion mit 5000 ppm Peptidgehalt; MW \pm SD; n = 9; #p < 0,05 für GEKG vs. Pal-GEKG

Es stellt sich die Frage, wieso Pal-GEKG trotz höherer Lipophilie nicht besser in die Haut penetrierte als GEKG. Ein möglicher Grund für das schlechte Penetrationsvermögen von Pal-GEKG könnte die größere Molekülgröße sein. Der amphiphile Charakter des Moleküls könnte zudem zu stärkeren Wechselwirkungen mit dem Vehikel geführt haben. Beispielsweise ist eine Einlagerung in emulgatorreiche Grenzflächen denkbar, wodurch die Freisetzung behindert wird. Eine Modifizierung der O/W-Emulsion wäre nötig, um die Liberation des amphiphilen Pal-GEKG zu ermöglichen.

Weiterhin ist zu bedenken, dass im Penetrationsversuch radioaktiv markiertes Pal-GEKG verwendet wurde (siehe Tabelle 28 im Anhang, Seite 136). Pal-GEKG erwies sich zudem als instabil (siehe 3.4.1. Stabilität von GEKG, Palmitoyl-GEKG, PKEK und Palmitoyl-PKEK, Seite 21). Im vorliegenden Penetrationsexperiment wurde mit zunehmender Inkubationszeit nicht das intakte Pal-GEKG detektiert, sondern der radioaktiv markierte Metabolit. Es wäre durchaus möglich, dass GEKG als Metabolit von Pal-GEKG in die Haut penetrierte. Dies ist analytisch nicht erfassbar, weil die Fettsäurekette im Molekül radioaktiv markiert ist und diese womöglich abgespalten wurde. Würde radioaktives Material mit Markierung innerhalb der Peptidsequenz zum Einsatz kommen, wäre dies darstellbar. Allerdings ist dies erheblich teurer und konnte daher nicht verwendet werden. Um zu sehen, in welchem Ausmaß das intakte Pal-GEKG penetriert, könnte dieses im Penetrationsversuch mit LC-MS quantifiziert werden (siehe 7.1.1. Chromatographische Methoden (LC-MS und HPLC-UV), Seite 92). Die LOQ von 0,1 µg/mL wäre ausreichend klein, um eine Quantifizierung penetrierter Anteile in Hautproben zu gewährleisten. Für eine bessere Vergleichbarkeit der Ergebnisse mit denen von GEKG wurde Pal-GEKG im Rahmen der vorliegenden Arbeit jedoch ebenfalls radioaktiv markiert

5.2.2. Palmitoyl-PKEK

In Abbildung 34A ist das Penetrationsprofil von Pal-PKEK dargestellt. Es war nur in geringem Ausmaß in der Lage, in die lebenden Hautschichten zu penetrieren, sodass der relative Peptidanteil darin maximal 1,0 % betrug. Im Penetrationsprofil ist weiterhin zu sehen, dass zu allen Versuchszeiten mehr als 85 % des Peptids auf der Hautoberfläche verblieben ist, wobei der Anteil bei längerer Versuchszeit etwas abnahm. In SC und Akzeptor wurden die höchsten Peptidanteile nach 300 min wiedergefunden. Sie betrugen 12 % im SC und 2,4 % im Akzeptor. Die gesonderte Darstellung von vitaler Epidermis und Dermis in Abbildung 34A zeigt, dass sich die relativen Peptidanteile in diesen Hautschichten kaum unterschieden. Damit zeigte Pal-PKEK ein zu Pal-GEKG vergleichbares Penetrationsverhalten. Im Gegensatz zu Pal-GEKG erwies sich Pal-PKEK im Stabilitätsversuch als vergleichsweise stabil (siehe 3.4.1. Stabilität von GEKG, Palmitoyl-GEKG, PKEK und Palmitoyl-PKEK, Seite 21), sodass die detektierte Radioaktivität überwiegend auf das intakte Peptid zurückzuführen ist.

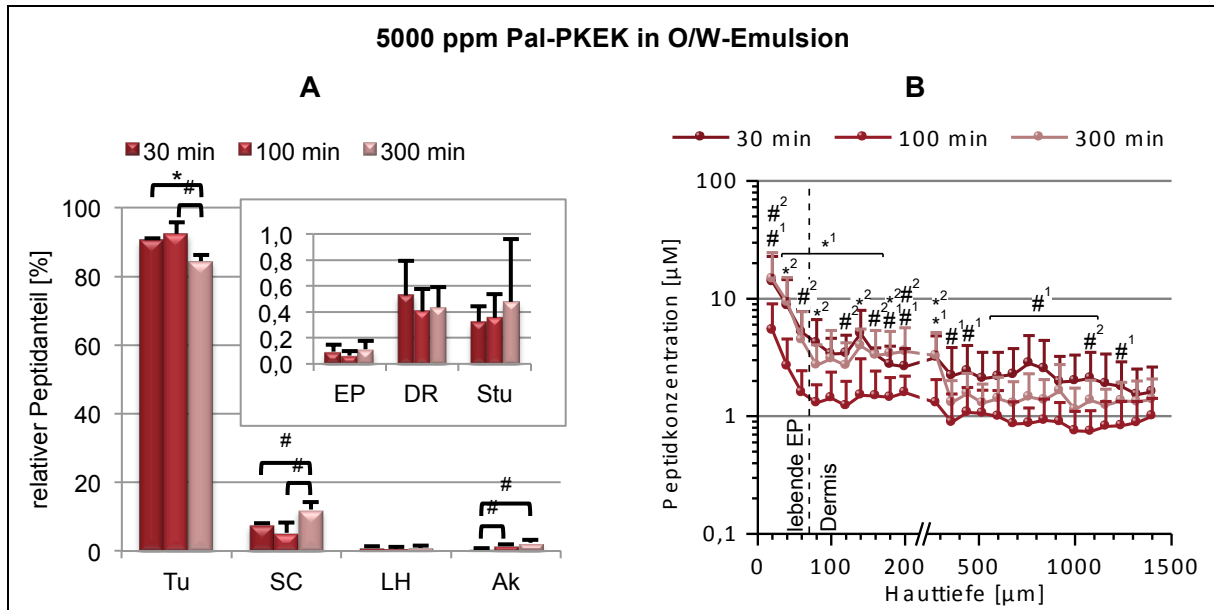


Abbildung 34: (A) Penetrationsergebnisse von Pal-PKEK aus der O/W-Emulsion mit 5000 ppm Peptidgehalt als relativer Anteil in den untersuchten Proben Tupfer (Tu), SC, lebende Hautschichten (LH = Summe aus vitaler Epidermis (EP), Dermis (DR) und Stumpf (Stu)) und Akzeptormedium (Ak); MW \pm SD; n = 3 für Tu, SC, Ak; n = 9 für LH, EP, DR, Stu und (B) das dazugehörige Tiefenprofil (TP) ohne SC; MW \pm SD; n = 9; *p < 0,01; #p < 0,05 für Unterschiede zwischen den Versuchszeiten, TP: ¹30 min vs. 100 min, ²100 min vs. 300 min

Die absoluten Peptidkonzentrationen, die im Tiefenprofil in Abbildung 34B dargestellt sind, waren nach 100 min kleiner als nach 30 min und 300 min, sodass ein zeitlicher Zusammenhang nicht ableitbar ist. Die Peptidkonzentration nahm mit zunehmender Hauttiefe jeweils ab und betrug im Zielkompartiment zwischen 1 und 5 μM .

Die mittlere WFR des 100 min-Versuchs betrug 79 %. Für die Versuche mit 30 min und 300 min Inkubationszeit war diese mit 137 % und 121 % höher (siehe Tabelle 44, Seite 146 in Anhang F: Übersicht über die Penetrationsdaten). Möglicherweise liegt dies daran, dass diese beiden Versuche an einem anderen Tag durchgeführt wurden, als der 100 min-Versuch. Wie bereits diskutiert, könnte Verdunstung des Lösungsmittels Ethanol zu einer höheren Konzentration der radioaktiven Gebrauchslösung geführt haben, sodass Werte über 100 % resultierten.

Die vergleichende Darstellung der Ergebnisse für PKEK und Pal-PKEK in Abbildung 35 und Abbildung 36 zeigt, dass PKEK besser in der Lage ist, in die Haut zu penetrieren und in den Akzeptor zu permeieren. Folglich wurde in der vitalen Epidermis und in der Dermis mehr PKEK wiedergefunden. Der Unterschied war für 100 min und 300 min Versuchszeit signifikant. Pal-PKEK verblieb indessen zu allen Versuchszeiten vermehrt auf der Hautoberfläche. Wie bereits für Pal-GEKG diskutiert, könnte hierfür die größere Molekülgröße oder eine schlechtere Liberation aus der O/W-Emulsion verantwortlich sein. Eine Optimierung der O/W-Emulsion wäre nötig, um eine bessere Freisetzung des amphiphilen Pal-PKEK zu ermöglichen.

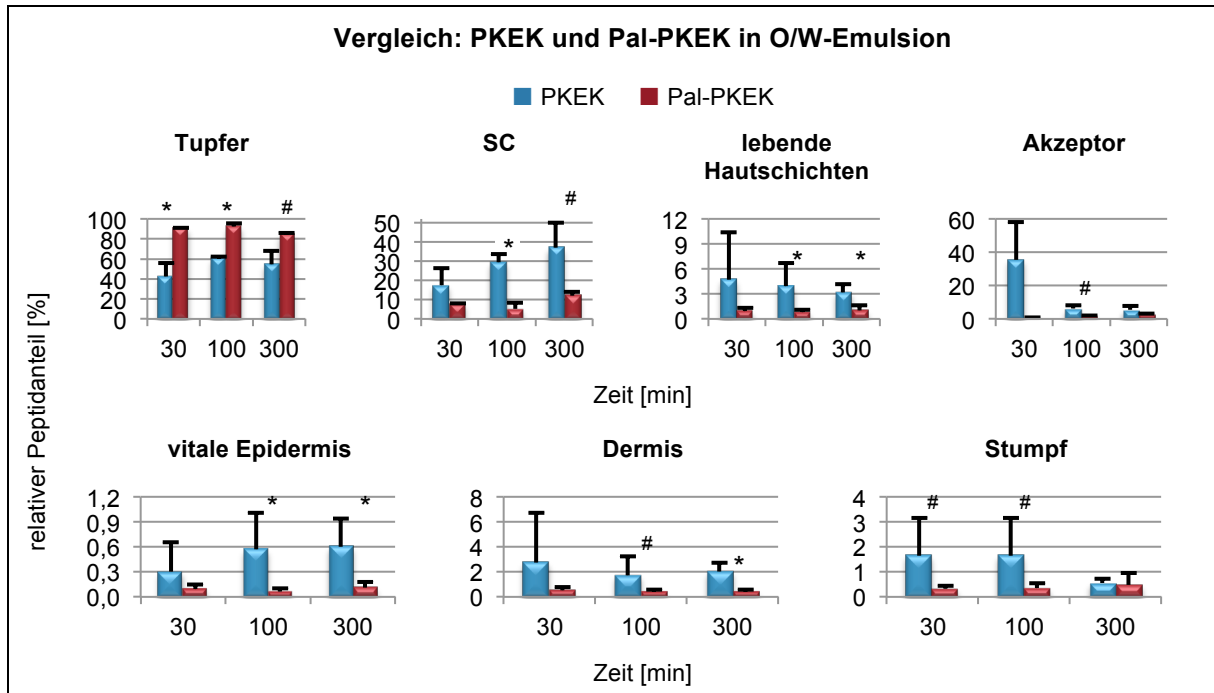


Abbildung 35: Vergleich der Penetrationsergebnisse von PKEK und Pal-PKEK aus der O/W-Emulsion mit 5000 ppm Peptidgehalt als relativer Anteil in den untersuchten Proben; MW ± SD; n = 3 für Tupfer, SC und Akzeptor; n = 9 für lebende Hautschichten (Summe aus vitaler Epidermis, Dermis und Stumpf), Epidermis, Dermis, Stumpf; *p < 0,01; #p < 0,05 für PKEK vs. Pal-PKEK

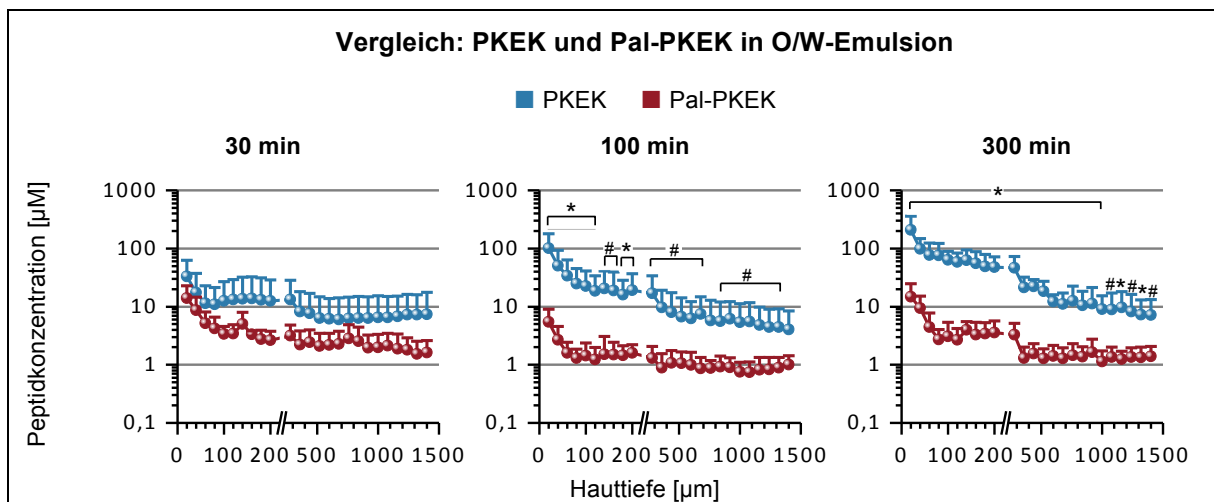


Abbildung 36: Vergleich der Tiefenprofile von PKEK und Pal-PKEK aus der O/W-Emulsion mit 5000 ppm Peptidgehalt als relativer Anteil in den untersuchten Proben; MW ± SD; n = 9; *p < 0,01, #p < 0,05 für PKEK vs. Pal-PKEK

5.3. Optimierung der Penetration durch den Einsatz von Mikroemulsionen

5.3.1. GEKG

Abbildung 37A zeigt das Penetrationsprofil von GEKG nach Anwendung der ME1 mit 10 % hydrophiler Phase, 25 % Emulgator und 65 % Öl. Mit zunehmender Versuchszeit penetrierte GEKG stärker in die Haut, sodass sich der relative Anteil im Tupfer von 52 % nach 30 min auf 15 % nach 300 min verringerte. GEKG verblieb jedoch nicht ausschließlich

in der Haut, sondern permeierte in zunehmendem Ausmaß in die darunterliegenden Kompartimente Gaze (12–17 %) und Akzeptor (17–49 %).

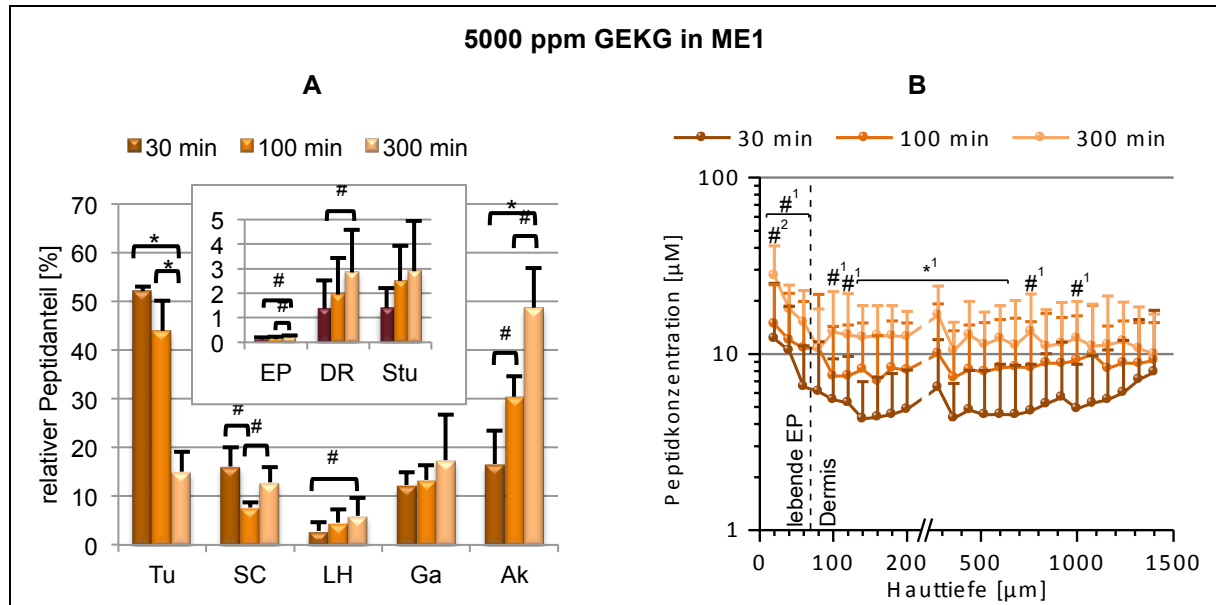


Abbildung 37: (A) Penetrationsergebnisse von GEKG aus der ME1 mit 5000 ppm Peptidgehalt als relativer Anteil in den untersuchten Proben Tupfer (Tu), SC, lebende Hautschichten (LH = Summe aus vitaler Epidermis (EP), Dermis (DR) und Stumpf (Stu)), Gaze (Ga) und Akzeptormedium (Ak); MW \pm SD; n = 3 für Tu, SC, Ga, Ak; n = 9 für LH, EP, DR, Stu und (B) das dazugehörige Tiefenprofil (TP) ohne SC; MW \pm SD; n = 9; *p < 0,01; #p < 0,05 für Unterschiede zwischen den Versuchszeiten, TP: 130 min vs. 300 min, 2100 min vs. 300 min

Die einzelne Darstellung der Ergebnisse für Epidermis, Dermis und Stumpf in Abbildung 37A verdeutlicht, wie die Tiefenprofile in Abbildung 37B, dass die Peptidkonzentration im Zielkompartiment tendenziell bei längeren Versuchszeiten zunahm. Nach 300 min wurden Konzentrationen von bis zu 17 μM erreicht. In den oberen Hautschichten (Epidermis und obere Dermis) nahm die Peptidkonzentration mit zunehmender Tiefe tendenziell ab. Ab 100 μm Hauttiefe war das Peptid jeweils nahezu gleichmäßig in der Dermis verteilt.

Gründe für die teilweise starken fluktuierenden Peptidanteile und -konzentrationen in den Schnitten der Haut wurden bereits erläutert. Die mittleren WFR der Versuche waren mit 73 % (30 min), 82 % (100 min) und 79 % (300 min) vergleichbar und lagen in einem ähnlichen Bereich, wie im Versuch von GEKG in der O/W-Emulsion (78–81 %). Analog zu diesem Versuch wurde bei längeren Versuchszeiten neben dem intakten Peptid auch der Metabolit miterfasst, der die radioaktive Markierung trägt, da GEKG in Gegenwart von Hautbestandteilen instabil ist (siehe 3.4.1. Stabilität von GEKG, Palmitoyl-GEKG, PKEK und Palmitoyl-PKEK, Seite 21).

Bei vergleichender Betrachtung der Penetrationsergebnisse (relativer Anteil) von GEKG in O/W-Emulsion und ME1 (Abbildung 38), sind die signifikanten Unterschiede in Tupfer, lebenden Hautschichten (Summe aus Epidermis, Dermis und Stumpf), Gaze und Akzeptor

5. Penetrationsuntersuchungen an peptidhaltigen Formulierungen

auffällig. Nach Applikation der Standardcreme verblieb der überwiegende Peptidanteil auf der Hautoberfläche und wurde somit im Tupfer nachgewiesen. Dementsprechend gering war der GEKG-Anteil in der Haut, sowie Gaze und Akzeptor. Aus der ME1 penetrierte und permeierte GEKG hingegen sehr gut in und durch die Haut. Daraus resultieren zu allen Versuchszeiten geringere relative Peptidanteile im Tupfer und überwiegend höhere Anteile in den übrigen Proben. Der Vergleich der Tiefenprofile in Abbildung 39 zeigt, dass auch die absoluten GEKG-Konzentrationen in den verschiedenen Schnitten der Haut nach Applikation der ME1 größer waren. Nach der längsten Versuchszeit glichen sich die Konzentrationen einander an.

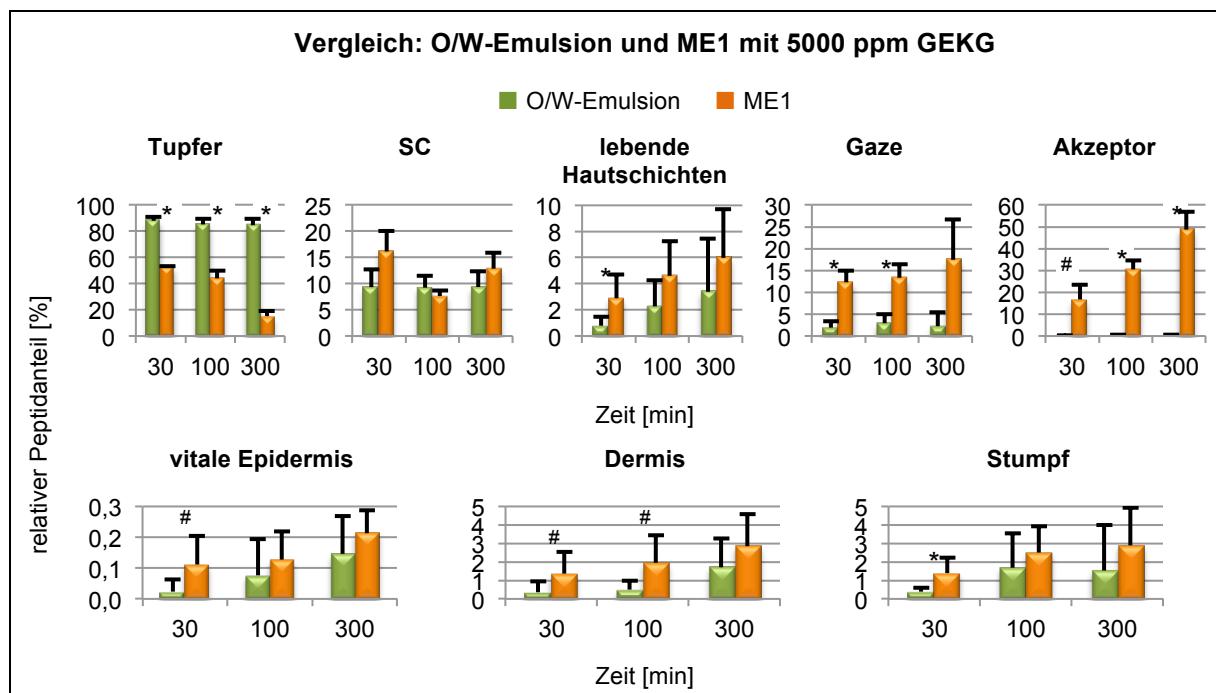


Abbildung 38: Vergleich der Penetrationsergebnisse von der O/W-Emulsion und der ME1 mit je 5000 ppm GEKG als relativer Anteil in den untersuchten Proben; MW ± SD; n = 3 für Tupfer, SC, Gaze und Akzeptor; n = 9 für lebende Hautschichten (Summe aus vitaler Epidermis, Dermis und Stumpf), Epidermis, Dermis, Stumpf; *p < 0,01; #p < 0,05 für O/W-Emulsion vs. ME

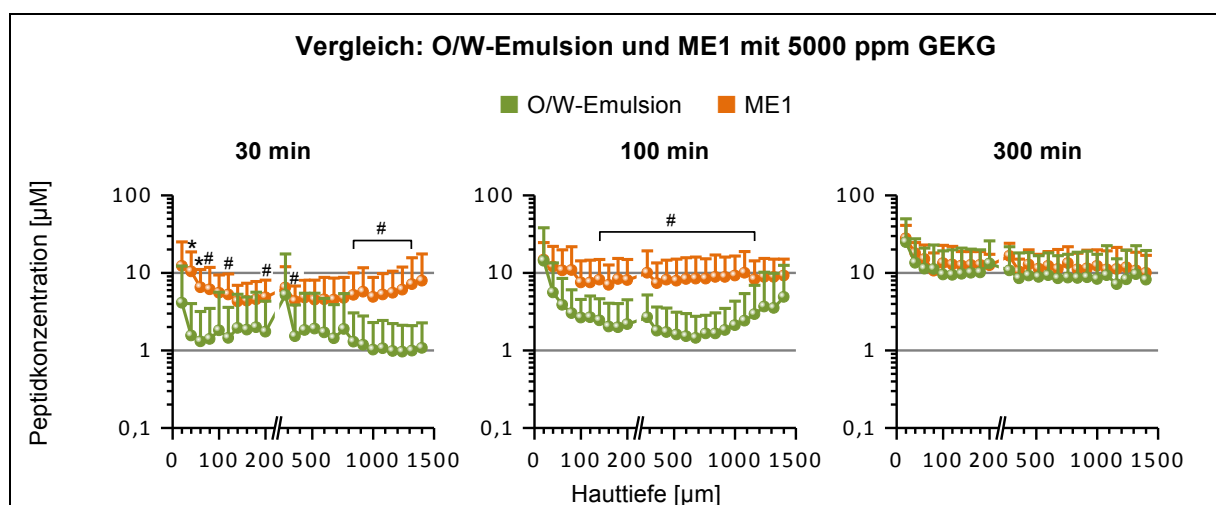


Abbildung 39: Vergleich Tiefenprofile ohne SC von der O/W-Emulsion und der ME1 mit je 5000 ppm GEKG; MW ± SD; n = 9; * p < 0,01, #p < 0,05 für O/W-Emulsion vs. ME

Die ME1 ist demzufolge besser geeignet, um GEKG schnell zu seinem Zielkompartiment Dermis zu transportieren. Dieses Ergebnis war aufgrund der bekannten penetrationsfördernden Eigenschaften von ME zu erwarten. Auch das hydrophile Peptid Desmopressin gelangte mit Hilfe einer W/O-ME bestehend aus 5 % Wasser, 20 % Emulgatorgemisch (PEG-20-glycerylmonooleat/Sorbitanmonooleat 3:2) und 75 % IPP besser in tiefere Schichten der Haut und das Akzeptormedium als mit einer Creme [101]. Essentiell ist jedoch die richtige Auswahl des Systems. Der Einsatz einer O/W-ME zeigte im Vergleich zu einem Hydrodispersionsgel beispielsweise keinen Vorteil für die dermale Verfügbarkeit des hydrophilen N-acetyl-L-Carnosins [63].

Die hohen Akzeptorkonzentrationen lassen vermuten, dass GEKG *in vivo* in der Lage ist, durch die Haut zu permeieren und so in den Blutkreislauf zu gelangen. Systemische Effekte sind dennoch nicht zu erwarten, da GEKG aus proteinogenen Aminosäuren besteht und im Blut wahrscheinlich schnell durch Aminopeptidasen abgebaut wird. Dies wurde für das ebenfalls kosmetisch genutzte Peptid Glycyl-L-histidyl-L-Lysin (GHK) nachgewiesen [331].

5.3.2. PKEK

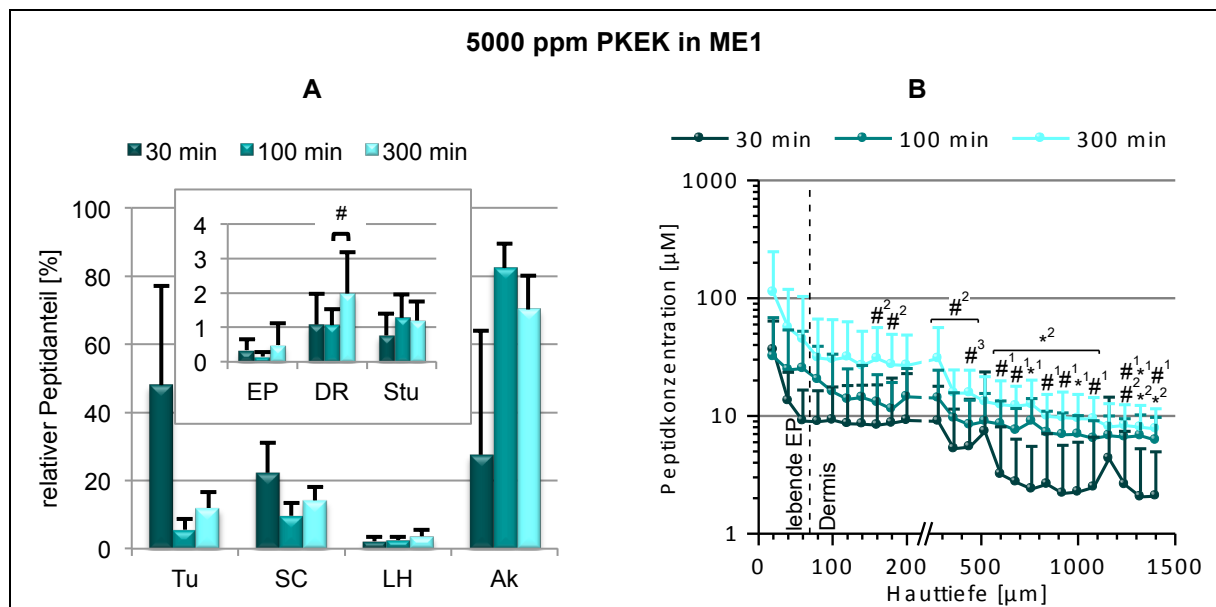


Abbildung 40: (A) Penetrationsergebnisse von PKEK aus der ME1 mit 5000 ppm Peptidgehalt als relativer Anteil in den untersuchten Proben Tupper (Tu), SC, lebende Hautschichten (LH = Summe aus vitaler Epidermis (EP), Dermis (DR) und Stumpf (Stu)) und Akzeptormedium (Ak); MW ± SD; n = 3 für Tu, SC, Ak; n = 9 für LH, EP, DR, Stu und (B) das dazugehörige Tiefenprofil (TP) ohne SC; MW ± SD; n = 9, *p < 0,01; #p < 0,05 für Unterschiede zwischen den Versuchszeiten, TP: 130 min vs. 100 min, 230 min vs. 300 min, 3100 min vs. 300 min

Die Penetrationsergebnisse von PKEK in der ME1 in Abbildung 40A zeigen, dass das Peptid bereit nach kurzer Applikationszeit von 30 min in die Haut penetrieren konnte und auch das Akzeptorkompartiment erreichte. Der nicht penetrierte Anteil war nach 30 min mit ca. 48 % am größten, wobei dieser Wert stark fluktuierte (VK: 61 %). Bei längeren Versuchszeiten von 100 min und 300 min permeierte PKEK verstärkt durch die Haut in den Akzeptor, sodass dort bis 82 % relativer Peptidanteil nachgewiesen wurde. Der Peptidanteil in den

5. Penetrationsuntersuchungen an peptidhaltigen Formulierungen

lebenden Hautschichten war demgegenüber mit maximal 3,7 % nach 300 min vergleichsweise gering. Das Tiefenprofil (Abbildung 40B) verdeutlicht, dass die PKEK-Konzentrationen in den lebenden Hautschichten mit zunehmender Versuchszeit zunahm und mit zunehmender Hauttiefe abnahm. Im Zielkompartiment wurden 9–45 μM PKEK detektiert.

PKEK erwies sich im Stabilitätsversuch in Gegenwart von Hautbestandteilen als vergleichsweise stabil (siehe 3.4.1. Stabilität von GEKG, Palmitoyl-GEKG, PKEK und Palmitoyl-PKEK, Seite 21). Daher entspricht die detektierte Radioaktivität sehr wahrscheinlich dem intakten Peptid. Stark fluktuierende PKEK-Anteile in Tupper und Akzeptor traten auch im 30 min-Versuch mit der O/W-Emulsion mit 5000 ppm PKEK-Gehalt auf. Wie bereits an anderer Stelle erörtert, könnte ein erhöhtes Vorkommen von Poren auf den Hautstücken oder das Auftreten von Kapillarkräften, die Anteile der Formulierung über die Gaze direkt in den Akzeptor ziehen, für die erhöhte Permeation verantwortlich sein.

Die WFR der Versuche schwankten stark und betragen 85 ± 50 % (30 min), 178 ± 29 % (100 min) und 164 ± 31 % (300 min) (siehe Tabelle 48, Seite 148 in Anhang F: Übersicht über die Penetrationsdaten). Gleiches wurde im Versuch von PKEK in der O/W-Emulsion mit 5000 ppm Peptidgehalt beobachtet. Mögliche Ursachen, beispielweise die Verwendung verschiedener Szintillatoren oder Matrixeffekte wurden erörtert. Durch Darstellung der Ergebnisse als relative Anteile bezogen auf die WFR, sollte ein Vergleich der Ergebnisse dennoch gegeben sein.

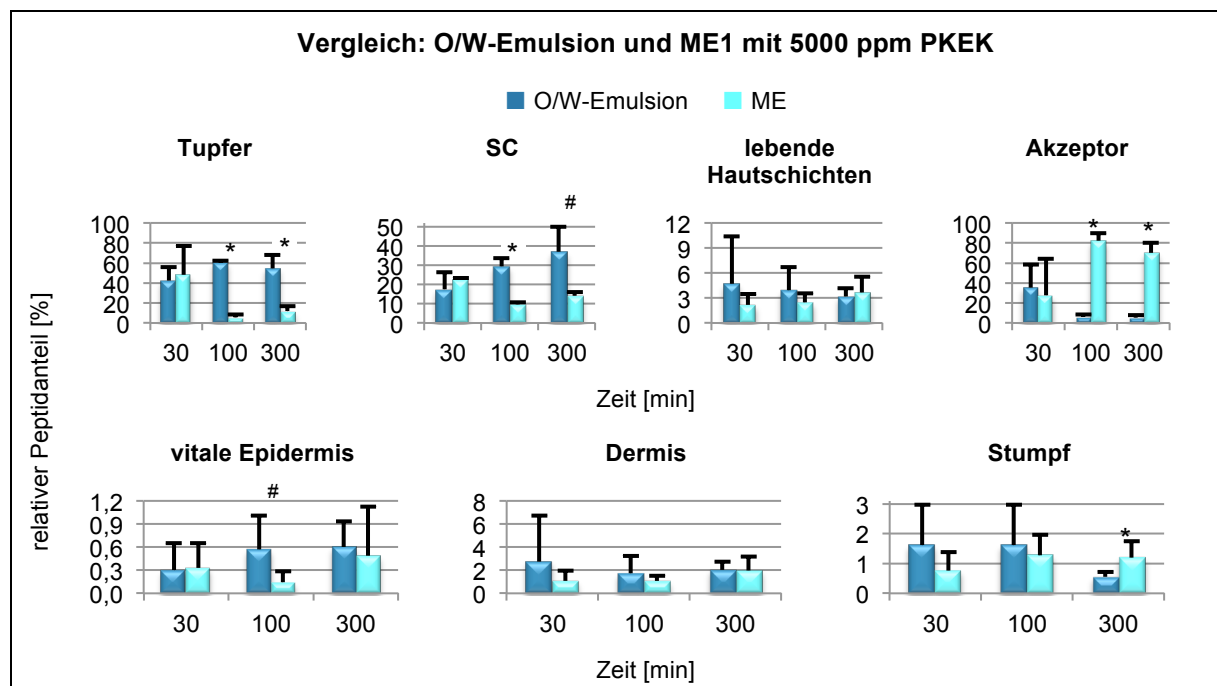


Abbildung 41: Vergleich der Penetrationsergebnisse von der O/W-Emulsion und der ME1 mit je 5000 ppm PKEK als relativer Anteil in den untersuchten Proben; MW \pm SD; n = 3 für Tupper, SC und Akzeptor; n = 9 für lebende Hautschichten (Summe aus vitaler Epidermis, Dermis und Stumpf), Epidermis, Dermis, Stumpf; *p < 0,01; #p < 0,05 für O/W-Emulsion vs. ME

In Abbildung 41 sind die Penetrationsergebnisse der O/W-Emulsion und der ME1 für PKEK vergleichend dargestellt. Es wird deutlich, dass vor allem nach längeren Versuchszeiten von 100 min und 300 min ein unterschiedliches Penetrationsverhalten von PKEK durch beide Formulierungen resultierte. Nach 30 Minuten verblieb ein vergleichbarer Peptidanteil von 42–48 % auf der Hautoberfläche, 35 % beziehungsweise 28 % erreichten den Akzeptor. Nach 100 und 300 min gelangte mehr PKEK mit der O/W-Emulsion in die Hornschicht und nach 30 und 100 min in die lebenden Hautschichten. Die ME war bei längeren Versuchszeiten (100 und 300 min) besser in der Lage, PKEK in den Akzeptor zu transportieren. Dementsprechend war der Peptidanteil auf der Hautoberfläche (Nachweis im Tupfer) nach Applikation der O/W-Emulsion signifikant größer.

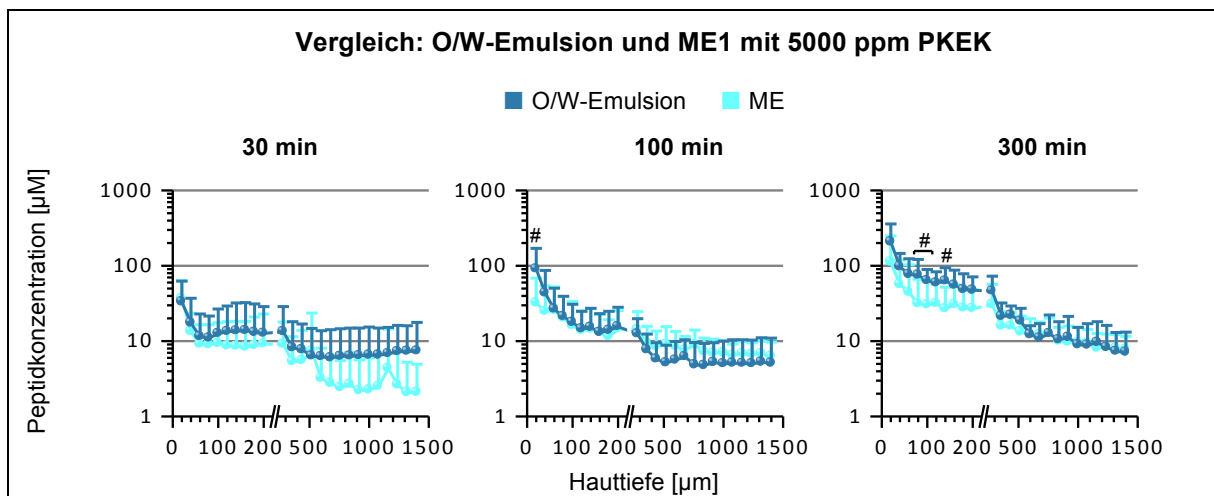


Abbildung 42: Vergleich der Tiefenprofile von der O/W-Emulsion und der ME1 mit je 5000 ppm PKEK; MW \pm SD; n = 9; #p < 0,05 für O/W-Emulsion vs. ME1

Die Gegenüberstellung der Tiefenprofile in Abbildung 42 zeigt, dass ähnliche Peptidkonzentrationen in den Hautschnitten nachgewiesen wurden. Nach 30 min verblieb nach Applikation der O/W-Emulsion tendenziell mehr PKEK in den tiefen Dermischnitten und nach 300 min war die PKEK-Konzentration bei dieser Formulierung in den oberen Hautschichten leicht höher.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass durch den Einsatz eines kolloidalen Systems PKEK signifikant besser in der Lage war, die Hornschicht zu überwinden. Dies ist auf die bereits beschriebenen penetrationsfördernden Eigenschaften der W/O-ME für hydrophile Peptide zurückzuführen [101]. Das hydrophile Peptid verbleibt jedoch nicht in der Haut, sondern permeierte, wie auch für GEKG beobachtet, in den Akzeptor. Wie bereits erläutert, wird *in vivo* dennoch keine Anreicherung im Blut erwartet, weil PKEK wahrscheinlich enzymatisch abgebaut wird. Für den PKEK-Anteil in den Hautproben brachte die ME1 keinen Vorteil.

In vivo ist dieses wässrige Akzeptormedium nicht vorhanden, sodass die ME1 durchaus besser geeignet sein kann, um PKEK zum Zielkompartiment untere Epidermis zu transportieren. Wünschenswert wäre dennoch, den hohen permeierten Anteil im Akzeptor

zu reduzieren und stattdessen höhere Konzentrationen an den jeweiligen Zielkompartimenten auch für GEKG zu erreichen. Mit einer ME mit erhöhter Viskosität wäre dies möglicherweise umsetzbar. Ein höher viskoses System wäre zudem leichter zu applizieren. Erstmals wurde ein ME-basiertes Gel von Haering *et al.* auf Grundlage einer W/O-ME mit Gelatine entwickelt [332]. Sahle *et al.* zeigten für das lipophile Ceramid NP, dass Carbopol® 940-haltige ME (O/W und bikontinuierlich) die Permeation durch die Haut reduzierten [244]. Rozmann *et al.* testeten verschiedene viskositätserhöhende Substanzen auf ihre Eignung zur Herstellung von ME-basierten Gelen [333]. Anlehnend an diese Studien wurden zur Viskositätserhöhung in einem Vorversuch 0,5–5,0 % Aluminiumstearat, 1–10 % weißes Wachs, 1–10 % Siliciumdioxid (Aerosil 200) und 1–15 % Gelatine in die ME1 eingearbeitet. Mischungen mit Aluminiumstearat und weißem Wachs wurden trüb. Siliciumdioxid löste sich nicht vollständig, die ME blieb aber klar und wurde fester. Die Gelatine löste sich trotz Erwärmung auf bis zu 55 °C nicht in ME1. Um aus der ME1 ein ME-basiertes Gel zu entwickeln, sind weitere Optimierungsschritte nötig. Alternativ könnten sogenannte Penetrationsreducer eingesetzt werden, die die Bilayer-Struktur des SC stabilisieren und somit die Penetration verzögern [334].

5.3.3. LPA, LPBG und LPT

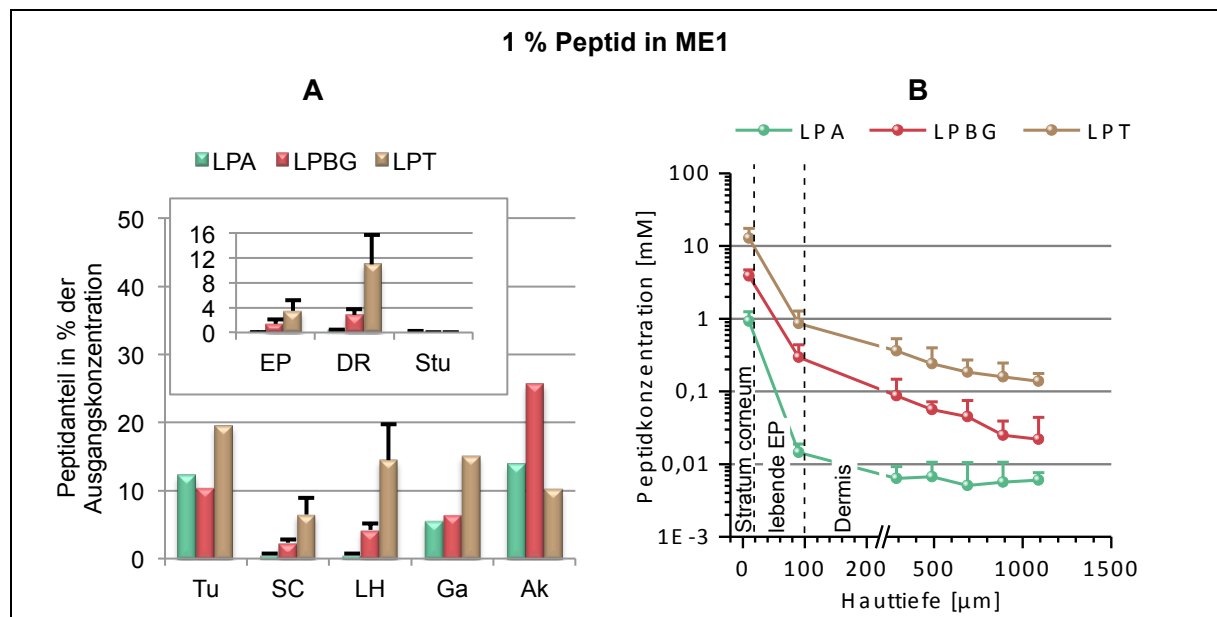


Abbildung 43: (A) Penetrationsergebnisse von LPA, LPBG und LPT aus der ME1 mit 1,0 % Peptidgehalt nach einer Versuchszeit von 300 min als Anteil der applizierten Dosis in den untersuchten Proben Tupfer (Tu), SC, lebende Hautschichten (LH = Summe aus vitaler Epidermis (EP), Dermis (DR) und Stumpf (Stu)), Gaze (Ga) und Akzeptormedium (Ak); MW ± SD; n = 1 für Tu, Ga, Ak; n = 3 für SC, LH, EP, DR, Stu und (B) die dazugehörigen Tiefenprofile mit SC; MW ± SD; n = 3

Abbildung 43 zeigt die Penetrationsergebnisse von LPA, LPBG und LPT nach Anwendung von ME1 mit je 1,0 % Peptidgehalt. Die Tripeptide waren in der Lage, durch die Haut hindurch zu permeieren, sodass der größte Peptidanteil in Gaze und Akzeptor detektiert wurde (Abbildung 43A). Auf der Hautoberfläche verblieben zwischen 10 % und 19 % des jeweils aufgetragenen Peptids. Der Peptidanteil in den Schichten der Haut war für LPA im

Vergleich zu LPBG und LPT gering. Im SC wurden 0,52 % LPA nachgewiesen, in der vitalen Epidermis 0,06 % und in der Dermis 0,33 %. LPBG verblieb in größerem Ausmaß in diesen Hautschichten (SC: 2,3 %; EP: 1,4 %; DR: 2,8 %). Die größten Peptidanteile wurden von LPT in der Haut nachgewiesen (SC: 6,5 %; EP: 3,5 %; DR: 10,9 %).

Dies bestätigt auch das Tiefenprofil in Abbildung 43B. Die Peptidkonzentration in den lebenden Hautschichten lag für LPA zwischen 0,015 und 0,006 mM, für LPBG zwischen 0,30 und 0,02 mM und für LPT zwischen 0,86 und 0,14 mM. Mit zunehmender Hauttiefe nahm die Konzentration ab. Die WFR waren vergleichbar mit denen des BC-Versuchs (LPA: 33 %, LPBG: 49 %, LPT: 66 %). Dies bestätigt die Theorie, dass der Peptidverlust im Penetrationsversuch auf Abbauprozesse in Gegenwart der Hautbestandteile zurückzuführen ist. Letztendlich zeigen die Penetrationsergebnisse der ME1 die gleiche Tendenz wie die der BC (siehe 5.1.3. LPA, LPBG und LPT ab Seite 56). LPT penetriert am besten in die Haut, gefolgt von LPBG und LPA. Es wird somit bekräftigt, dass sich das Penetrationsverhalten der Peptide aufgrund der bereits erläuterten strukturellen Verschiedenheiten und abweichenden physikochemischen Eigenschaften unterscheidet.

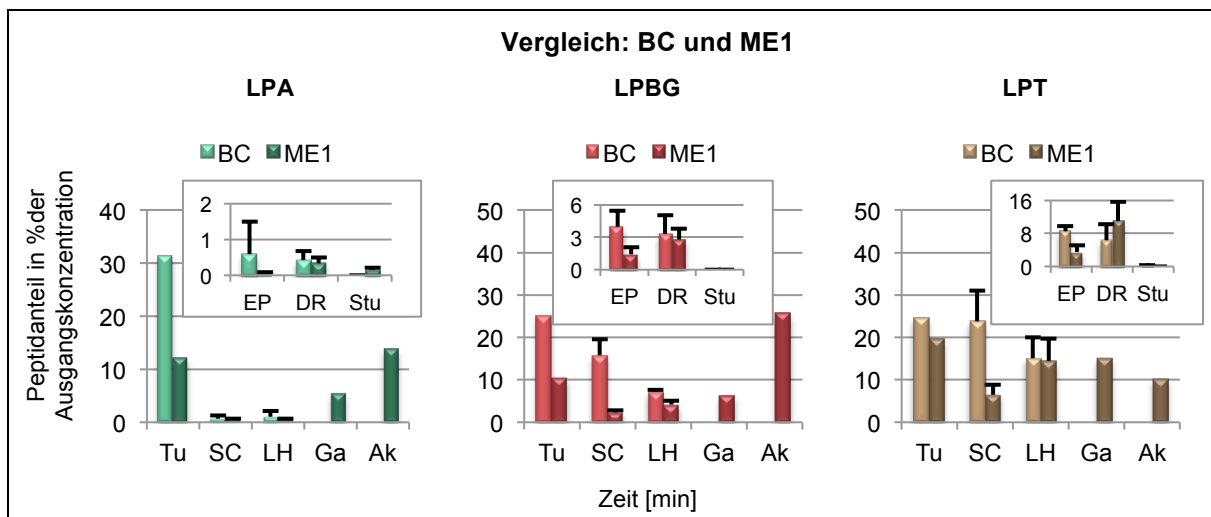


Abbildung 44: Vergleich der Penetrationsergebnisse von der BC und der ME1 mit je 1 % Peptid nach einer Versuchszeit von 300 min als Anteil in % der Ausgangskonzentration in den untersuchten Proben Tupfer (Tu), SC, lebende Hautschichten (LH = Summe aus vitaler Epidermis (EP), Dermis (DR) und Stumpf (Stu)), Gaze (Ga) und Akzeptormedium (Ak); MW ± SD; n = 1 für Tu, Ga, Ak; n = 3 für SC, LH, EP, DR, Stu

In Abbildung 44 und Abbildung 45 sind die Penetrationsergebnisse für LPA, LPBG und LPT im Standardvehikel BC und dem kolloidalen System ME1 gegenübergestellt. Da die Penetrationsuntersuchungen nur jeweils an einem Hautstück untersucht wurden, wurde ein statistischer Vergleich mittels Dunnett's Test als nicht sinnvoll erachtet. Für alle Tripeptide war jedoch die Tendenz zu beobachten, dass durch Anwendung der ME ein größerer Peptidanteil in die tieferen Dermissschichten penetrierte und durch die Haut in die Gaze und den Akzeptor permeierte. Nach Applikation der BC verblieb jeweils ein größerer Peptidanteil auf der Hautoberfläche und wurde folglich im Tupfer detektiert. Weiterhin

verblieben größere Peptidanteile in den oberen Hautschichten SC und vitale Epidermis (Abbildung 44). Auch in den oberen Schnitten der Dermis war die Peptidkonzentration nach Anwendung der BC tendenziell größer (Abbildung 45). Dieses Ergebnis ist auf die hervorragenden penetrationsfördernden Eigenschaften von ME zurückzuführen. Wie bereits erörtert, wurde bei Anwendung einer ME das hydrophile Peptid Desmopressin im Penetrationsversuch ebenfalls vermehrt in tieferen Schichten der Dermis und dem Akzeptor detektiert [101].

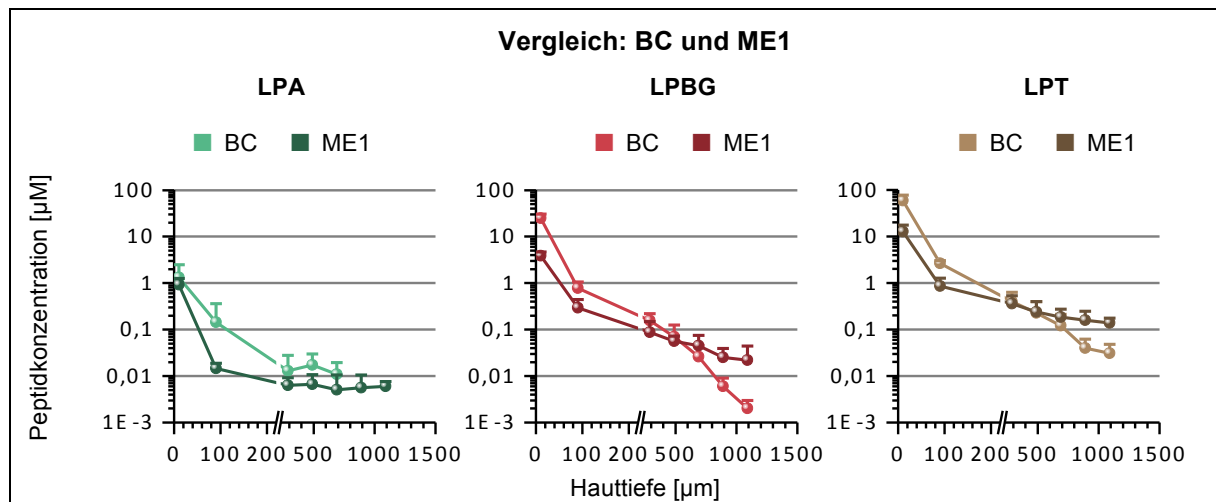


Abbildung 45: Vergleich der Tiefenprofile von der BC und der ME1 mit je 1 % Peptid nach einer Versuchszeit von 300 min; MW ± SD; n = 3; **p < 0,01; *p < 0,05 für den Vergleich der BC gegenüber ME1

Alle drei Peptide waren mit Hilfe der ME in der Lage, durch die Haut zu permeieren. *In vivo* könnten LPA, LPBG und LPT bei Anwendung einer ME daher vermutlich in die systemische Zirkulation gelangen. Unerwünschte Effekte können nicht ausgeschlossen werden, da unklar ist, wie schnell die Peptide, die zur Stabilisierung aus chemisch modifizierten Aminosäuren bestehen, im Blut abgebaut werden. Klinische Untersuchungen können zeigen, in welchem Ausmaß die Peptide in das Blut gelangen. Stabilitätsuntersuchungen mit humanem Plasma würden Auskunft über die Peptidstabilität im Blut geben.

Um zuverlässige, statistisch vergleichbare Informationen über das Penetrationsverhalten von LPA, LPBG und LPT zu erhalten, müssten mehrere Parallelversuche durchgeführt werden, beispielsweise eine Dreifachbestimmung. Analog zu den Peptiden GEKG, PKEK, Pal-GEKG und Pal-PKEK wären zudem Versuche mit kürzeren Inkubationszeiten (30 und 100 min) sinnvoll, um zu sehen, wie der zeitliche Verlauf des Penetrationsverhaltens ist und ob höhere WFR erzielt werden können.

5.4. Optimierung der Penetration durch den Einsatz hydrophiler Enhancer

Neben chemischer Modifizierung und dem Einsatz von kolloidalen Systemen, können auch Penetrationenhancer eingesetzt werden, um die dermale Verfügbarkeit der Peptide zu verbessern (siehe 2.1.3. Strategien zur Optimierung der dermalen Peptidpenetration ab

Seite 6). In Screenings wurde der penetrationsfördernde Effekt verschiedener Enhancer für GEKG und PKEK bei einer Inkubationszeit von 300 min untersucht. Die eingesetzten Peptidkonzentrationen orientierten sich an den in *in vivo* Studien verwendeten Konzentrationen, sowie an dem empfohlenen Konzentrationsbereich für kosmetische Produkte und betragen für GEKG 50 ppm und für PKEK 40 ppm [163, 175, 178, 179, 186, 187].

Im Folgenden werden die eingesetzten Enhancer näher vorgestellt. Auf die zu Grunde liegenden Mechanismen der Penetrationsförderung wurde in 2.1.3. Strategien zur Optimierung der dermalen Peptidpenetration, Tabelle 1, Seite 7 näher eingegangen.

Glycerylcaprylat/caprat gehört zur Gruppe der Glycerolfettsäureester. Es handelt sich dabei um eine Mischung von Mono-, Di- und Triglyceriden der Caprylsäure und Caprinsäure. Der Rohstoff wurde in zwei verschiedenen Veresterungsgraden eingesetzt. Glycerylcaprylat/caprat (2,0 x) enthält überwiegend zweifach veresterte Glyceride und Glycerylcaprylat/caprat (1,5 x) eine Mischung aus Mono- und Diglyceriden. Glycerylcaprylat/caprat wird als rückfettendes Hautpflegemittel, Lösungsvermittler und Co-Emulgator mit antimikrobiellen Eigenschaften zu 5–10 % in kosmetischen und pharmazeutischen Formulierungen eingesetzt [335-337]. Außerdem wirkt es penetrationsfördernd und wird daher in halbfesten Zubereitungen zur rektalen, vaginalen und nasalen Anwendung eingearbeitet, um die Permeation schlecht resorbierbarer Arzneistoffe zu fördern [335, 337, 338]. Glycerolfettsäureester sind im Allgemeinen nicht toxisch und werden gut vertragen. In hoher Konzentration ($\geq 50\%$) können sie die Haut reizen [336, 337].

Die PGFE **Polyglyceryl-4-laurat** (Handelsname: Tegosoft® PL4, HLB: ~11) und **Polyglyceryl-3-caprat** (Handelsname: Tegosoft® PC31, HLB: ~10) sind in ME1 und ME2 enthalten und werden im Anhang vorgestellt (siehe Anhang A: Eigenschaften der Mikroemulsionsbestandteile ab Seite 131). Bei **Polyglyceryl-3-caprylat** (Handelsname: TEGO® Cosmo P 813, HLB nicht bekannt) handelt es sich um einen Co-Emulgator, der aufgrund seiner antibakteriellen Wirksamkeit bevorzugt in Deodorants eingesetzt wird [226]. Die penetrationsfördernden Eigenschaften von PGFE sind bisher wenig untersucht worden. Polyglyceryl-4-laurat wurde in Kombination mit Polyglyceryl-4-oleat von Sahle *et al.* in verschiedenen ME verarbeitet, die die Freisetzung und Penetration von Ceramiden verbesserten [242-244]. Polyglyceryl-10-trioleat führte zu einer verstärkten Permeation von Tenoxicam und Polyglyceryl-3-oleat von Piroxicam (nichtsteroidale Antirheumatika) [339, 340]. Polyglyceryl-3-diisostearat zeigte andererseits keine Enhancerwirkung für das hydrophile 5-Fluorouracil [335].

Die Eigenschaften des Polyols **PeG** werden ebenfalls in Anhang A: Eigenschaften der Mikroemulsionsbestandteile ausführlich beleuchtet. Untersuchungen von Göbel *et al.*

zeigten anhand von Carnosin, dass es in der Lage ist, das Penetrationsvermögen von hydrophilen Peptiden zu steigern [63, 341].

2-Pyrrolidon oder γ -Butyrolactam (INCI: 2-Pyrrolidone) gehört zur Gruppe der Lactame und ist eine farblose, hygroskopische, brennbare Flüssigkeit, die mischbar mit wässrigen und organischen Lösungsmitteln ist. Als hochsiedendes Lösungsmittel wird es in der organischen Synthese eingesetzt, sowie zur Herstellung von Polymeren, Glycerol, Sorbitol und Zuckern. Es ist weiterhin Ausgangsstoff für die Synthese von γ -Aminobuttersäure (GABA), einem inhibitorischen Neurotransmitter, und Zwischenprodukt bei der Herstellung von Polyvinylpyrrolidon, einem pharmazeutisch genutzten Hilfsstoff [62, 342]. Seit langem sind die penetrationsfördernden Eigenschaften des kleinen, polaren, hydrophilen Enhancers bekannt und wurden für sowohl hydrophile, als auch lipophile Wirkstoffe, wie Coffein, Acetylsalicylsäure, Mannitol, Progesteron, Hydrocortison, Griseofulvin, Theophyllin und Oxytetracyclin belegt [6, 16, 68, 343]. Auch für peptidische Wirkstoffe, wie Vasopressin und Insulin wirkt es als Penetrationenhancer [6]. Bei Anwendung der unverdünnten Substanz wurden im Tierversuch kurzzeitige Hautreizungen beobachtet. Ein Epikutantest an Versuchspersonen ergab keine reizenden Effekte. Von der Europäischen Chemikalienagentur wird es zusammenfassend als nicht hautreizend und nicht sensibilisierend bewertet [344].

5.4.1. GEKG

5.4.1.1. Screening mit Enhancer-haltigen Formulierungen (n=1)

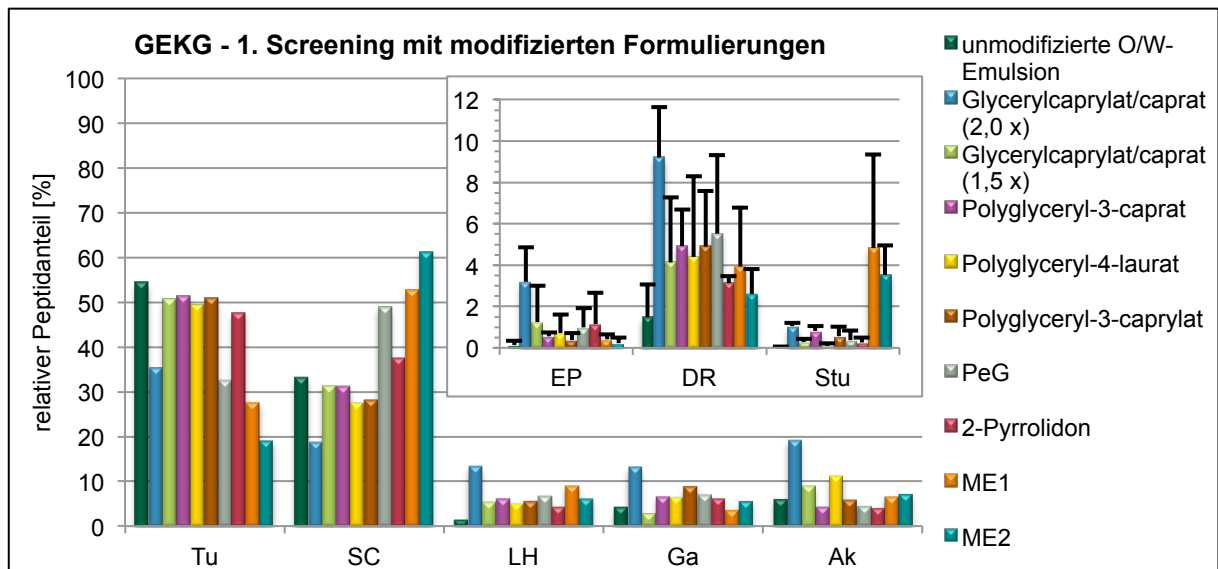


Abbildung 46: Penetrationsergebnisse von GEKG aus der unmodifizierten O/W-Emulsion, sowie O/W-Emulsionen mit 5 % verschiedener Penetrationenhancer, sowie ME1 und ME2 (Peptidgehalt: 50 ppm) als relativer Anteil in den untersuchten Proben Tupfer (Tu), SC, lebende Hautschichten (LH = Summe aus vitaler Epidermis (EP), Dermis (DR) und Stumpf (Stu)), Gaze (Ga) und Akzeptormedium (Ak); n = 1; kleine Abbildung: MW \pm SD für die 3 Stenzen eines Hautstücks

In einem 1. Screening an einem Hautstück (n = 1) wurden alle sieben der vorgestellten Enhancer einbezogen: Glycerylcaprylat/caprat (2,0 x), Glycerylcaprylat/caprat (1,5 x), Polyglyceryl-3-caprat, Polyglyceryl-4-laurat, Polyglyceryl-3-caprylat, PeG und 2-Pyrrolidon. Jeweils 5 % wurden in die O/W-Emulsion eingearbeitet, die in den vorangegangenen Untersuchungen mit GEKG, PKEK, Pal-GEKG und Pal-PKEK zum Einsatz gekommen war. Die Zusammensetzung der Formulierungen ist in Anhang E: Zusammensetzung der O/W-Emulsionen (Seite 137) zu finden. Zwei ME, ME1 und ME2 mit je 10 % hydrophiler Phase, 25 % Emulgator und 65 % Öl, wurden ebenfalls in die Untersuchungen einbezogen, um deren penetrationsfördernden Effekt mit dem der Enhancer zu vergleichen.

Die Penetrationsprofile der untersuchten Formulierungen mit den relativen GEKG-Anteilen in den untersuchten Proben sind in Abbildung 46 dargestellt. In der kleinen Abbildung, die die Ergebnisse für vitale Epidermis, Dermis und Stumpf zeigt, sind die Standardabweichungen für die Schwankungen zwischen den drei Stanzen der einen Haut erfasst. Nach Anwendung der unmodifizierten O/W-Emulsion verblieb der größte GEKG-Anteil auf der Hautoberfläche (54 %) und im SC (33 %). In den lebenden Hautschichten wurde im Vergleich zu den übrigen Formulierungen mit insgesamt 1,7 % der geringste GEKG-Anteil wiedergefunden. In Gaze und Akzeptor wurden 4 % beziehungsweise 6 % GEKG detektiert. Mit der Glycerylcaprylat/caprat (2,0 x)-haltigen O/W-Emulsion gelangten die jeweils höchsten Anteile von GEKG in die lebenden Hautschichten (13 %), die Gaze (13 %) und den Akzeptor (19 %). Dementsprechend verblieb ein geringerer Anteil auf der Hautoberfläche (35 %) und SC (19 %). Für den gleichen Enhancer mit geringerem Veresterungsgrad resultierte ein anderes Penetrationsprofil. Ein höherer GEKG-Anteil verblieb auf der Hautoberfläche (51 %) und im SC (31 %) und es gelangte weniger Peptid in die lebenden Hautschichten (6 %), die Gaze (3 %) und den Akzeptor (9 %).

Bei Anwendung der PGFE-haltigen Formulierungen zeigte GEKG ein ähnliches Penetrationsverhalten. 49–51 % relativer GEKG-Anteil penetrierten nicht in die Haut und zwischen 28 und 31 % wurden im SC wiedergefunden. In die lebenden Hautschichten penetrierten zwischen 5 und 6 % Peptid und der permeierte Anteil betrug in der Summe aus Gaze und Akzeptor zwischen 11 und 18 %. Nach Applikation der PeG-haltigen O/W-Emulsion verblieb mit 33 % relativem Anteil vergleichsweise wenig GEKG auf der Hautoberfläche und ein hoher Anteil wurde mit 49 % im SC detektiert. In den lebenden Hautschichten, Gaze und Akzeptor betrug der GEKG-Anteil zwischen 5 und 7 %. Ein wiederum höherer Anteil GEKG verblieb mit 47 % nach Anwendung der 2-Pyrrolidon-haltigen Emulsion auf der Hautoberfläche und ein dementsprechend geringerer Anteil wurde mit 38 % im SC nachgewiesen. GEKG-Anteile zwischen 4 und 6 % erreichten die lebenden Hautschichten, die Gaze und den Akzeptor. Für die ME1 und ME2 war der nicht penetrierte Anteil von GEKG mit 28 % und 19 % am geringsten und der Anteil im SC mit 53 % und 61 % am höchsten. Die GEKG-Anteile in den übrigen Proben waren mit den übrigen Formulierungen vergleichbar. Nur im Stumpf war der Peptidanteil im Vergleich zu

5. Penetrationsuntersuchungen an peptidhaltigen Formulierungen

den O/W-Emulsionen höher, jedoch von starken Schwankungen begleitet (VK: 94 % für ME1 und 41 % für ME2). Die Dicke der verwendeten Hautstücke ist nicht einheitlich. Außerdem wurden aufgrund der Verfügbarkeit für die Penetrationsversuche der Enhancer-haltigen Formulierungen Haut vom Oberschenkel verwendet und für die der ME Rückenhaut. Möglicherweise war die Schichtdicke, des Stumpfes in den Versuchen der ME größer, sodass darin mehr GEKG nachgewiesen werden konnte. Andererseits könnte aber auch der penetrationsfördernde Effekt der ME für dieses Ergebnis verantwortlich sein.

Die WFR der einzelnen Versuche lagen zwischen 35 % und 90 % (siehe Tabelle 51, Seite 150 in Anhang F: Übersicht über die Penetrationsdaten). Ursachen für die fluktuierenden Werte, wie beispielsweise Matrixeffekte und Verwendung verschiedener Szintillatoren wurden bereits beleuchtet. Durch Darstellung der Ergebnisse als relative Anteile bezogen auf die WFR war ein Vergleich der Formulierungen dennoch möglich.

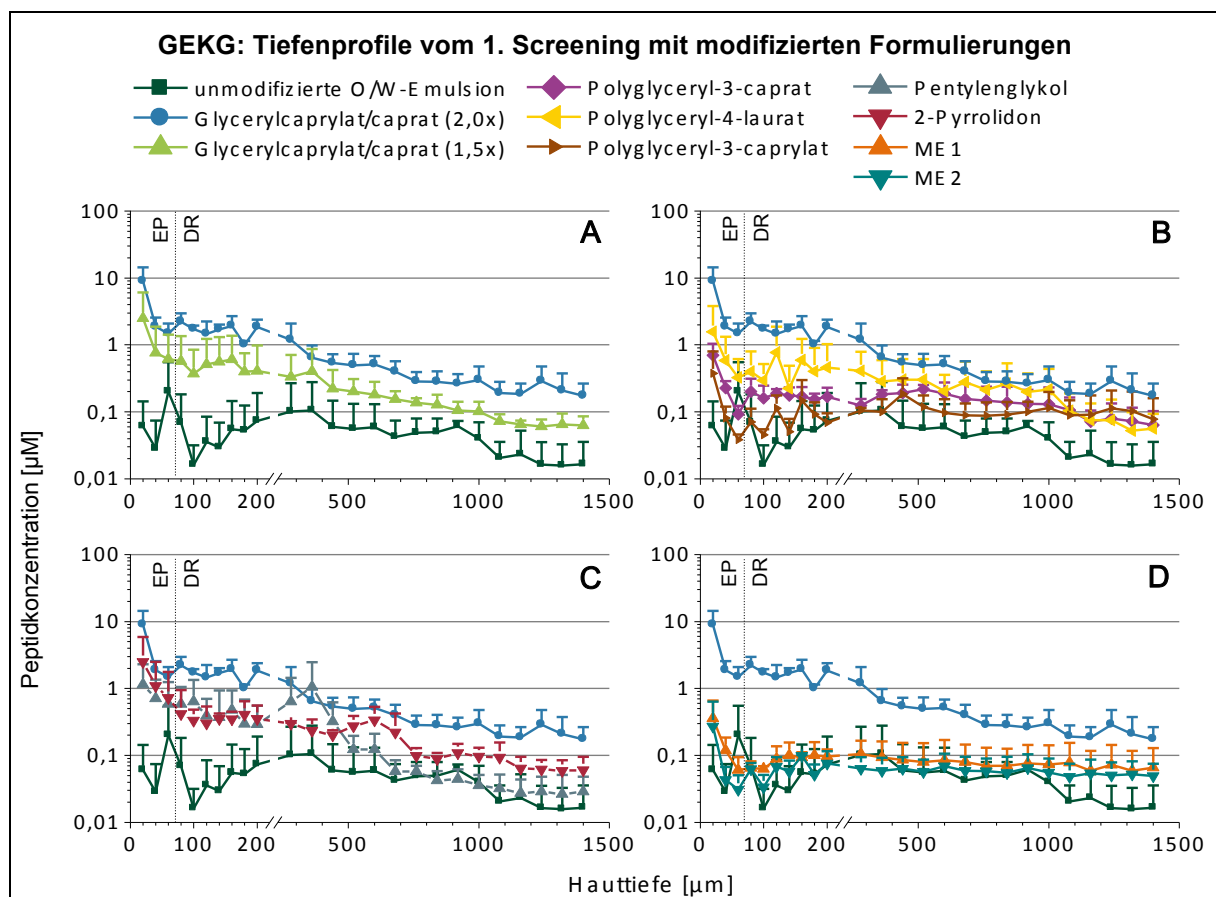


Abbildung 47: Tiefenprofile von GEKG aus der unmodifizierten O/W-Emulsion, sowie O/W-Emulsionen mit 5 % verschiedener Penetrationsehnern, sowie ME1 und ME2 (Peptidgehalt: 50 ppm) ohne SC; EP: lebende Epidermis, DR: Dermis; MW ± SD; n = 3

Die Tiefenprofile in Abbildung 47A-D zeigen die absoluten Peptidkonzentrationen in den Schnitten der vitalen Epidermis und Dermis. Das beste Penetrationsergebnis zeigte die Emulsion mit Glycerylcaprylat/caprat (2,0 x). Daher wurde das entsprechende Tiefenprofil in jeder der Teilabbildungen A-D vergleichend mitgeführt. Weiterhin ist in jeder Teilabbildung die unmodifizierte O/W-Emulsion dargestellt, um zu verdeutlichen, in

welchem Ausmaß sich die GEKG-Konzentration in den verschiedenen Hautschichten im Vergleich zu Enhancer-haltigen Formulierungen und den ME unterschied.

In Abbildung 47A sind die Ergebnisse von den Emulsionen mit Glycerylcaprylat/caprat in den verschiedenen Veresterungsgraden, sowie die unmodifizierte O/W-Emulsion abgebildet. Die Standardemulsion ohne zusätzlichen Enhancer erzielte nur eine geringe Konzentration in der Haut (0,2–0,016 μM) und die Konzentration nahm mit zunehmender Hauttiefe in tieferen Hautschichten ab. Für die Emulsion mit Glycerylcaprylat/caprat (2,0 x) wurde in der Haut eine Peptidkonzentration zwischen 9 und 0,2 μM detektiert. Bis zu 2,2 μM betrug die Konzentration im Zielkompartiment Dermis. Mit der 1,5-fach veresterten Variante wurden geringere Konzentrationen erzielt: 2,5–0,06 μM in der Haut und bis zu 0,6 μM im Zielkompartiment. Dass der penetrationsfördernde Effekt vom Veresterungsgrad beeinflusst wird, zeigten auch Studien von Cornell *et al.*, in denen Glycerylmonocaprylat/caprat die Penetration vom hydrophilen 5-Fluorouracil förderte und Glyceryltricaprylat/caprat nicht [335]. Doch auch der Ölanteil unterschied sich in den Formulierungen (Tabelle 29, Seite 137 im Anhang). Da Glycerylcaprylat/caprat (2,0 x) lipophiler ist, wurde der Ölanteil der Formulierung um 5 % reduziert. Die 1,5-fach veresterte Variante ist hydrophiler und ersetzte 5 % der Wasserphase. Möglicherweise verbesserte der höhere Wasseranteil der Formulierung mit Glycerylcaprylat/caprat (2,0 x) das Penetrationsvermögen von GEKG.

Mit den PGFE-haltigen Formulierungen (Abbildung 47B) wurden in allen Hautschnitten geringere GEKG-Konzentrationen als mit der Glycerylcaprylat/caprat (2,0x)-haltigen erreicht und überwiegend höhere als mit der Formulierung ohne Enhancer. Mit zunehmender Hauttiefe nahm die GEKG-Konzentration überwiegend ab. Mit der Polyglyceryl-3-caprylat-haltigen Formulierung wurde eine gleichmäßige Verteilung des Peptids in tieferen Hautschichten erreicht. Vergleicht man die PGFE untereinander, wurden die höchsten GEKG-Konzentrationen tendenziell mit Polyglyceryl-4-laurat erzielt (1,57–0,05 μM), gefolgt von Polyglyceryl-3-caprat (0,70–0,06 μM) und Polyglyceryl-3-caprylat (0,37–0,05 μM). Vermutlich bewirkte die größere hydrophile Kopfgruppe von Polyglyceryl-4-laurat bei Einlagerung in die Lipidschichten des SC für GEKG eine leichtere Passage entlang der hydrophilen Route. Dies kann auf die höhere Anzahl an Wasserstoffbrückendonatoren und -akzeptoren der Polyglyceryl-4-Gruppe zurückgeführt werden, die für stärkere Wechselwirkungen mit den Lipiden und anderen Hautbestandteilen sorgen kann. Auch die Ausbildung einer größeren Solvathülle um die hydrophile Kopfgruppe ist möglich.

Abbildung 47C zeigt die Tiefenprofile für die Emulsionen mit PeG und 2-Pyrrolidon. Innerhalb der vitalen Epidermis und oberen Dermis zeigen die Konzentrationskurven einen ähnlichen Verlauf. In tieferen Dermissschichten wurde eine höhere GEKG-Konzentration mit der 2-Pyrrolidon-haltigen Creme erreicht. Die Peptidkonzentration nahm jeweils mit zunehmender Hauttiefe ab und war niedriger als bei der O/W-Emulsion mit

Glycerylcaprylat/caprat (2,0 x) und höher als bei der Formulierung ohne Enhancer. Sie betrug für die PeG-haltige Formulierung 1,15–0,03 μM in der Haut und bis zu 0,64 μM im Zielkompartiment Dermis, für die 2-Pyrrolidon-haltige 2,5–0,06 μM in der Haut und bis zu 0,42 μM in der Dermis.

Die Tiefenprofile der ME sind in Abbildung 47D dargestellt. Die GEKG-Konzentrationen, die für ME1 (0,36–0,06 μM) und ME2 (0,27–0,04 μM) in der Haut detektiert wurden, waren gering und lagen in der Epidermis und oberen bis mittleren Schichten der Dermis im Bereich der unmodifizierten O/W-Emulsion. In tieferen Schichten war die Konzentration höher als für die Emulsion ohne Enhancer. Innerhalb der Dermis war GEKG nach Applikation der ME jeweils gleichmäßig verteilt und betrug für ME1 bis zu 0,10 μM und für ME2 bis zu 0,08 μM . Im Versuch mit der höher konzentrierten ME1 mit 5000 ppm GEKG (siehe Seite 65 in Kapitel 5.3. Optimierung der Penetration durch den Einsatz von Mikroemulsionen) wurde dieser Effekt ebenfalls erzielt. Allerdings war die Konzentration im Zielkompartiment ungefähr um den Faktor 100 größer, was auf die höhere Peptidkonzentration im Vehikel zurückzuführen ist.

Vergleicht man die Ergebnisse des Screenings mit den vorangegangenen Untersuchungen mit 5000 ppm GEKG-Konzentration in der unmodifizierten O/W-Emulsion (Seite 51) und ME1 (Seite 65), ergeben sich einige Unterschiede. Für die O/W-Emulsion wurden im Versuch mit 50 ppm GEKG in der Formulierung geringere relative Peptidanteile im Tupfer, sowie den lebenden Hautschichten wiedergefunden. Ein höherer Anteil gelangte in SC und Akzeptor. Für die ME1 mit 50 ppm Peptidgehalt verblieb ein höherer relativer Anteil auf der Hautoberfläche und dem SC. Auch der Anteil in den lebenden Hautschichten war höher. Entsprechend war der Peptidanteil im Akzeptor wesentlich geringer und betrug anstatt 49 % nur noch 7 % der detektierten Peptidmenge. Diese Tendenzen zeigen, dass die Peptidkonzentration einen erheblichen Einfluss auf die Verteilung von GEKG in den verschiedenen Proben hat. Dies wurde auch für PKEK gezeigt (Seite 54). Ein zweites Screening mit drei Parallelversuchen soll zeigen, ob die beobachteten Unterschiede reproduzierbar und statistisch relevant sind.

Die Ergebnisse des ersten Screenings lassen vermuten, dass Enhancer das Penetrationsvermögen von GEKG nennenswert verbessern können. Die höchste Peptidkonzentration im Zielkompartiment Dermis wurde mit der Polyglycerolcaprylat/caprat-haltigen Formulierung erzielt. Gemessen an den relativen Peptidanteilen war der penetrationsfördernde Effekt der ME1 und ME2 mit dem der Enhancer-haltigen Formulierungen vergleichbar. Wie in vorangegangenen Penetrationsversuchen mit GEKG wurde für die lange Versuchszeit von 300 min neben dem intakten Peptid der Metabolit miterfasst, der die radioaktive Markierung trägt. Stabilitätsversuche zeigten, dass GEKG in Gegenwart von Hautbestandteilen abgebaut wird (siehe 3.4.1. Stabilität von GEKG, Palmitoyl-GEKG, PKEK und Palmitoyl-PKEK, Seite 21).

5.4.1.2. Screening mit Enhancer-haltigen Formulierungen (n=3)

Mit dem 2. Screening sollte das Ergebnis für die Formulierung mit dem besten Penetrationsergebnis aus dem 1. Screening verifiziert werden. Hierfür wurde der Versuch für die Glycerylcaprylat/caprat (2,0 x)-haltige Formulierung (F2) in drei Parallelversuchen wiederholt. Die Emulsion ohne zusätzlichen Enhancer (F1), sowie die ME1 (F6) wurden als Vergleichsformulierungen einbezogen. Anhand dieser Formulierungen wird zudem der Einfluss der Peptidkonzentration in der Formulierung auf das Penetrationsergebnis demonstriert. Um auszuschließen, dass der geringere Ölgehalt in der Glycerylcaprylat/caprat (2,0x)-haltigen Formulierung gegenüber der mit dem 1,5-fach veresterten Glycerolfettsäureester für das bessere Penetrationsverhalten im 1. Screening verantwortlich war, wurde im 2. Screening eine Glycerylcaprylat/caprat (2,0 x)-haltige Formulierung (F3) untersucht, die den gleichen Ölanteil wie die Emulsion mit dem 1,5-fach veresterten Enhancer (F4) enthält (siehe Tabelle 30, Seite 138 im Anhang). Das chemisch modifizierte Peptid Pal-GEKG (F5) wurde ebenfalls im Screening untersucht, um zu sehen, in welchem Ausmaß sich die chemische Modifizierung im Vergleich zu den Penetrationsehancern auf das Penetrationsvermögen auswirkt.

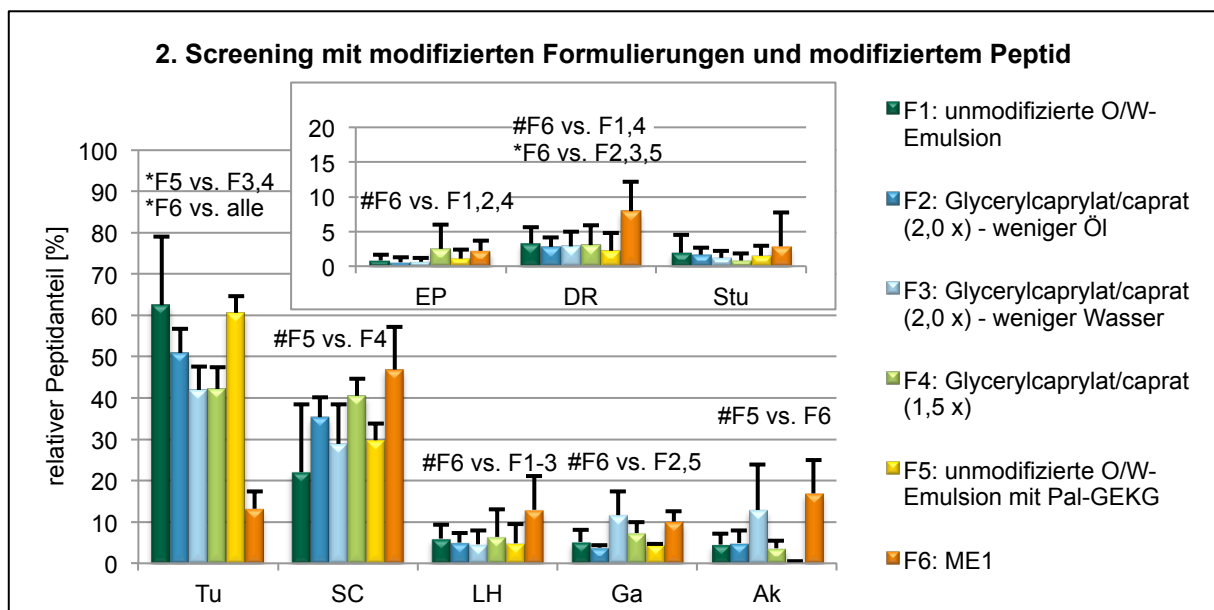


Abbildung 48: Penetrationsergebnisse von GEKG und Pal-GEKG aus der unmodifizierten O/W-Emulsion, sowie von GEKG aus O/W-Emulsionen mit 5 % verschiedener Penetrationsehancern und der ME1 als relativer Anteil (Peptidgehalt: 50 ppm) in den untersuchten Proben Tupfer (Tu), SC, lebende Hautschichten (LH = Summe aus vitaler Epidermis (EP), Dermis (DR) und Stumpf (Stu)), Gaze (Ga) und Akzeptormedium (Ak); MW ± SD; n = 3 für Tu, SC, Ga, Ak; n = 9 für LH, EP, DR, Stu; *p < 0,01; #p < 0,05 für Unterschiede zwischen den Formulierungen

Die Penetrationsprofile des 2. Screening sind in Abbildung 48 dargestellt. Der höchste Peptidanteil (62 %) verblieb wie im vorherigen Versuch nach Anwendung von F1 auf der Hautoberfläche, 22 % penetrierten in das SC und 6 % in die lebenden Hautschichten. Mit den Enhancer-haltigen Emulsionen (F2-F4) wurde tendenziell weniger GEKG auf der

Hautoberfläche nachgewiesen (42–51 %) und entsprechend mehr im SC (29–41 %). Der GEKG-Anteil in den lebenden Hautschichten war mit 4,6–6,3 % für die GEKG-haltigen Emulsionen (F1–F4) ähnlich. In Gaze und Akzeptor wurde im Vergleich der GEKG-haltigen Emulsionen (F1–F4) tendenziell mehr Peptid nach Anwendung von F3, die den 2,0-fach veresterten Enhancer und den gleichen Wasser- und Ölgehalt wie F4 enthielt, wiedergefunden. Mit ME1 (F6) penetrierte GEKG am besten in die Haut (SC und vitale Schichten), sowie durch die Haut in Gaze und Akzeptor. Nur 13 % Peptid verblieben auf der Hautoberfläche. Pal-GEKG (F5) zeigte ein ähnliches Penetrationsverhalten wie GEKG aus der unmodifizierten Emulsion (F1). Tendenzuell verblieb ein höherer Anteil im SC (30 %) und Pal-GEKG permeierte mit 0,4 % weniger stark in den Akzeptor.

Die mittleren WFR der Versuche mit Enhancer-haltigen Formulierungen lagen in einem vergleichbaren Bereich zwischen 71 % und 83 % (siehe Tabelle 53, Seite 152 in Anhang F: Übersicht über die Penetrationsdaten). Diese Werte sind mit denen vergleichbar, die in Versuchen der O/W-Emulsion und ME1 mit 5000 ppm GEKG-Gehalt erhalten wurden. Geringere WFR wurden für die GEKG-haltige ME1 (38 %) und Pal-GEKG (54 %) erhalten. Mögliche Ursachen wurden bereits beleuchtet. Durch Darstellung der Ergebnisse als relative Anteile bezogen auf die WFR war ein Vergleich der Daten dennoch möglich.

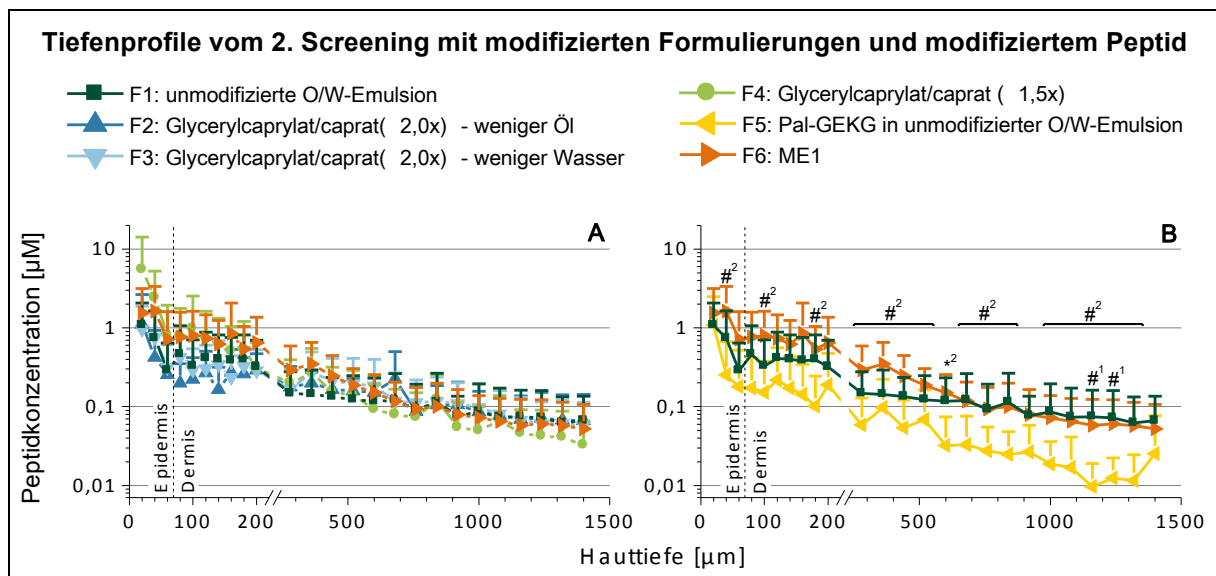


Abbildung 49: A: Tiefenprofile von GEKG aus der unmodifizierten O/W-Emulsion (F1), Emulsionen mit 5 % verschiedener Penetrationenhancer (F2–4) und der ME1 (F7), B: Tiefenprofile von GEKG und Pal-GEKG aus der unmodifizierten O/W-Emulsion (F1, F5), sowie von GEKG aus ME1 (F7) (Peptidgehalt: 50 ppm); ohne SC; MW ± SD; n = 9; *p < 0,01; #p < 0,05; ¹F1 vs. F5, ²F5 vs. F6

Die Tiefenprofile von GEKG in Abbildung 49A verdeutlichen, dass mit F4 tendenziell höhere GEKG-Konzentrationen (5,5–0,5 µM) in den oberen Hautschichten erzielt wurden als bei den übrigen Emulsionen (F1–3). Die ME1 ermöglichte in der vitalen Epidermis und oberen Dermis stabile GEKG-Konzentrationen im Bereich 1,5–0,5 µM. Tendenzuell geringere Konzentrationen wurden in Epidermis und oberer Dermis mit der unmodifizierten O/W-Emulsion (F1) erzielt, gefolgt von den Glycerylcaprylat/caprat (2,0 x)-haltigen Emulsionen.

In den unteren Schnitten der Dermis nahm die Peptidkonzentration mit zunehmender Hauttiefe ab und rangierte für die GEKG-haltigen Formulierungen (F1-4 und F7) in vergleichbarem Bereich von 0,3–0,03 μM .

Abbildung 49B zeigt die Tiefenprofile von GEKG und Pal-GEKG nach Anwendung der unmodifizierten O/W-Emulsion, sowie von GEKG nach Anwendung von ME1. Tendenziell war die Konzentration von Pal-GEKG in den verschiedenen Schnitten der Haut am geringsten und lag im Bereich der Dermis zwischen 0,22–0,01 μM . Von GEKG gelangten mit Hilfe der unmodifizierten O/W-Emulsion tendenziell höhere Konzentrationen in die lebenden Hautschichten der vitalen Epidermis und Dermis. Abbildung 49B verdeutlicht, dass durch den Einsatz eines kolloidalen Systems überwiegend signifikant höhere Peptidkonzentrationen in der Haut erzielt wurden, als durch die chemische Modifizierung von GEKG in Form der Palmitoylierung.

Aus den Ergebnissen des 2. Screenings kann geschlossen werden, dass bei einer Peptidkonzentration von 50 ppm die Palmitoylierung keinen Vorteil für die GEKG-Konzentration im Zielkompartiment bringt. Lediglich im SC wurde ein höherer relativer Peptidanteil erzielt. Durch den Einsatz von Polyglycerolcaprylat/caprat (2,0 x) und (1,5 x) wurde gegenüber der unmodifizierten Emulsion keine signifikante Verbesserung des Penetrationsvermögens von GEKG erreicht. Tendenziell erreichte ein größerer relativer Anteil von GEKG das SC und weniger verblieb auf der Hautoberfläche. Mit der Polyglycerolcaprylat/caprat (2,0 x)-haltigen Creme mit weniger Wasser (F3) permeierte GEKG tendenziell besser in die Gaze und den Akzeptor. Mit Hilfe der 1,5-fach veresterten Variante wurden tendenziell höhere Peptidanteile und Konzentrationen im SC und den oberen lebenden Hautschichten erzielt. Durch den veränderten Veresterungsgrad wurde schlussfolgernd keine signifikante Verbesserung des Penetrationsvermögens von GEKG erzielt. Anhand des 1. Screenings wurde vermutet, dass sich ein geringer Ölgehalt der Emulsion positiv auf das Penetrationsverhalten von GEKG auswirkt. Dies konnte im 2. Screening ebenfalls nicht verifiziert werden. Mit Hilfe von F2 wurde zwar ein tendenziell höherer relativer GEKG-Anteil im SC detektiert, für F3 waren die Anteile in Gaze und Akzeptor jedoch höher. Im Zielkompartiment erzielten beide Formulierungen vergleichbare GEKG-Konzentrationen. Wie in den Versuchen mit drei Versuchszeiten (siehe Seite 65) wurde gezeigt, dass die kolloidale Formulierung ME1 die Penetration von GEKG in und durch die Haut verbessert.

Analog zu vorangegangenen Penetrationsversuchen mit GEKG und Pal-GEKG ist für die lange Versuchszeit von 300 min zu erwarten, dass neben dem intakten Peptid jeweils auch der Metabolit miterfasst wurde, der die radioaktive Markierung trägt. Beide Peptide wurden in Gegenwart von Hautbestandteilen abgebaut (siehe 3.4.1. Stabilität von GEKG, Palmitoyl-GEKG, PKEK und Palmitoyl-PKEK, Seite 21).

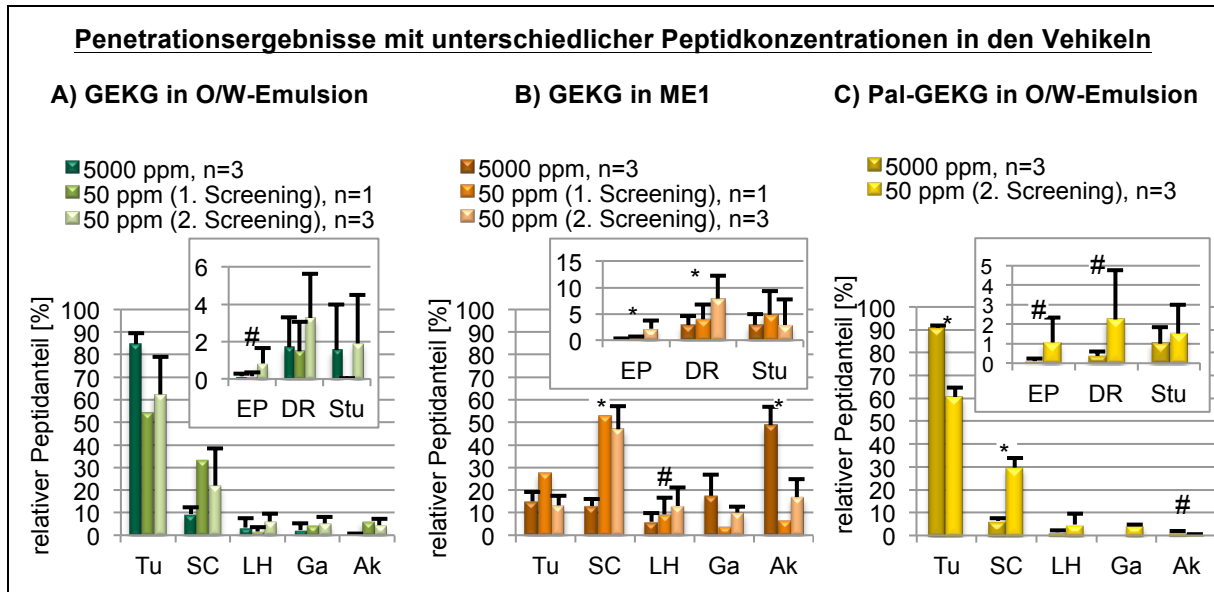


Abbildung 50: Gegenüberstellung von Penetrationsergebnissen der Peptide GEKG und Pal-GEKG aus Versuchen mit unterschiedlicher Peptidkonzentration in den Vehikeln unmodifizierte O/W-Emulsion und ME1, Versuchszeit: 300 min; MW ± SD; *p < 0,01; #p < 0,05 für 5000 ppm, n=3 vs. 50 ppm (2. Screening), n=3

In Abbildung 50 sind die Ergebnisse des 2. Screenings für GEKG und Pal-GEKG nach Anwendung der unmodifizierten O/W-Emulsion, sowie von GEKG nach Anwendung der ME1 den Penetrationsergebnissen der Vollprofile für 300 min Versuchszeit (siehe Kapitel 5.1.1. GEKG, 5.2.1. Palmitoyl-GEKG, und 5.3. Optimierung der Penetration durch den Einsatz von Mikroemulsionen) gegenübergestellt. Der Vergleich soll zeigen, inwiefern sich die unterschiedliche Peptidkonzentration in den Versuchen auf das Penetrationsvermögen der Peptide auswirkte. Für GEKG macht die Abbildung außerdem deutlich, inwiefern sich die Ergebnisse des 1. und 2. Screenings unterschieden. Der statistische Vergleich erfolgte für Versuche die in Dreifachbestimmung durchgeführt wurden.

Bei Anwendung der O/W-Emulsion mit 50 ppm GEKG verblieb im Vergleich zu der höher konzentrierten Formulierung tendenziell weniger Peptid auf der Hautoberfläche und ein höherer relativer Anteil gelangte in das SC, die Gaze und den Stumpf (Abbildung 50A). Im 2. Screening wurden zudem tendenziell höhere Anteile in den lebenden Hautschichten erzielt. Für die vitale Epidermis war der Unterschied signifikant. Die leichten Unterschiede im Ergebnis des 1. Screenings gegenüber dem 2. Screening liegen im Bereich der statistischen Fluktuation der Ergebnisse. Für die ME1 hatte der Konzentrationsunterschied in den Versuchen einen erheblichen Einfluss auf das Penetrationsergebnis (Abbildung 50B). Bei geringerer Peptidkonzentration wurden signifikant höhere relative GEKG-Anteile in SC und den lebenden Hautschichten detektiert. In höherer Konzentration permeierte GEKG vor allem durch die Haut hindurch und gelangte in höherem Ausmaß in Gaze und Akzeptor. Der GEKG-Anteil, der auf der Hautoberfläche verblieb, war für beide Konzentrationen vergleichbar. Die Unterschiede im Ergebnis des 1. Screenings gegenüber dem 2. Screening kann mit der Verwendung von Haut unterschiedlicher Körperregionen (1. Screening:

Rücken, 2. Screening: Brust) erklärt werden. Aus Abbildung 50C wird deutlich, dass von Pal-GEKG nach Applikation der geringer konzentrierten Formulierung signifikant größere relative Peptidanteile in SC, vitale Epidermis und Dermis wiedergefunden wurden. Ein geringerer Anteil verblieb auf der Hautoberfläche. Wie bei PKEK wirkt sich die geringere Konzentration positiv auf das Penetrationsvermögen aus. Den gleichen Effekt beobachteten Alvarez-Figueroa *et al.* bei Methotrexat-haltigen ME [330].

5.4.2. PKEK

5.4.2.1. Screening mit Enhancer-haltigen Formulierungen (n=1)

Der Einfluss verschiedener Enhancer auf das Penetrationsvermögen sollte auch für PKEK in einem Screening (300 min Versuchszeit, n=1) untersucht werden. Hierfür wurden, wie im 1. Screening für GEKG, Emulsionen mit 5 % der Enhancer Glycerylcaprylat/caprat (2,0 x), Glycerylcaprylat/caprat (1,5 x), Polyglyceryl-3-caprat, PeG und 2-Pyrrolidon verwendet. Die unmodifizierte O/W-Emulsion, sowie ME1 und ME2 wurden zu Vergleichszwecken ebenfalls wieder einbezogen.

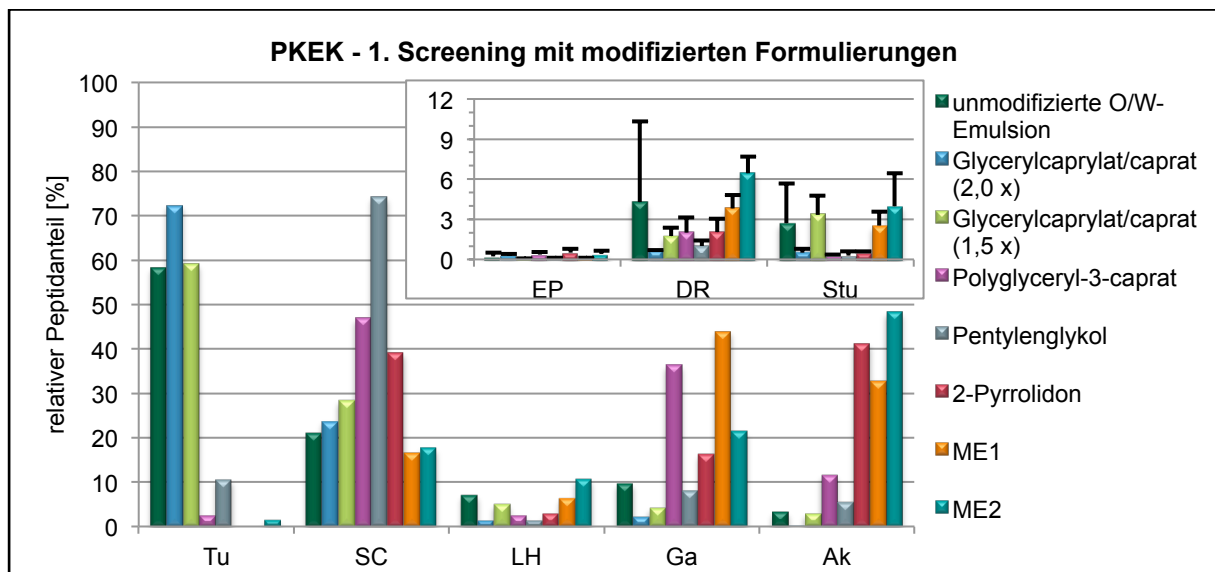


Abbildung 51: Penetrationsergebnisse von PKEK aus der unmodifizierten O/W-Emulsion, sowie O/W-Emulsionen mit 5 % verschiedener Penetrationenhancer, sowie ME1 und ME2 (Peptidgehalt: 40 ppm) als relativer Anteil in den untersuchten Proben Tupfer (Tu), SC, lebende Hautschichten (LH = Summe aus vitaler Epidermis (EP), Dermis (DR) und Stumpf (Stu)), Gaze (Ga) und Akzeptormedium (Ak); n = 1; kleine Abbildung: MW ± SD für die 3 Stenzen eines Hautstücks

Anhand der Penetrationsergebnisse in Abbildung 51 wird deutlich, dass der nicht-penetrierte relative PKEK-Anteil mit 72 % nach Anwendung der Emulsion mit Glycerylcaprylat/caprat (2,0 x) am größten war, gefolgt von der unmodifizierten Emulsion und der Glycerylcaprylat/caprat (1,5 x)-haltigen mit 58–59 %. Im SC wurden für die unmodifizierte Emulsion 21 % Peptid detektiert und in den vitalen Hautschichten 7 %. In Gaze und Akzeptor permeierten 10 und 3 %. Für Formulierungen mit Glycerylcaprylat/caprat (2,0 x) und (1,5 x) war der Anteil im SC jeweils größer und in den

übrigen Proben geringer. Nur 11 % PKEK-Anteil verblieben mit der PeG-haltigen F5 auf der Hautoberfläche. Der größte relative Anteil (74 %) penetrierten in das SC. Der Anteil in den vitalen Hautschichten war mit 1,4 % gering. In Gaze und Akzeptor wurden 8 und 6 % detektiert. Bei den übrigen Emulsionen mit Polyglyceryl-3-caprat und 2-Pyrrolidon, sowie ME1 und ME2 betrug der relative Anteil auf der Hautoberfläche unter 3 %. Im SC war der PKEK-Anteil für die Emulsionen mit Polyglyceryl-3-caprat und 2-Pyrrolidon mit 47 und 39 % höher als bei den ME (17 und 18 %). Nach Anwendung der ME1 und ME2 permeierte der größte Peptidanteil durch die Haut hindurch in Gaze und den Akzeptor. 6 % beziehungsweise 11 % verblieben in den vitalen Hautschichten. Auch für die mit Polyglyceryl-3-caprat- und 2-Pyrrolidon-haltigen Emulsionen war der permeierte Peptidanteil groß und es verblieb mit ca. 3 % wenig PKEK in den vitalen Hautschichten.

Die WFR fluktuierten, wie in vorangegangenen Versuchen mit PKEK, stark und lagen zwischen 24 % und 102 % (siehe Tabelle 55, Seite 153 in Anhang F: Übersicht über die Penetrationsdaten). Als mögliche Ursachen wurden Matrixeffekte und die Verwendung verschiedener Szintillatoren in diesem Zusammenhang erörtert. Durch Darstellung der Ergebnisse als relative Anteile bezogen auf die WFR sollte ein Vergleich der Ergebnisse dennoch gegeben sein.

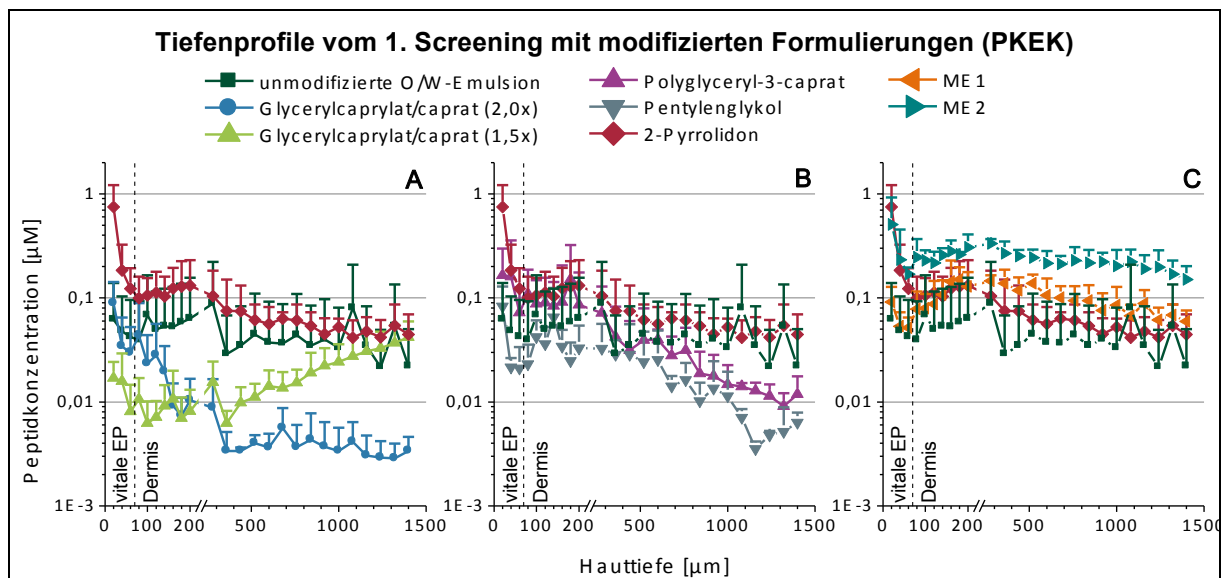


Abbildung 52: Tiefenprofile von PKEK aus der unmodifizierten O/W-Emulsion, sowie O/W-Emulsionen mit 5 % verschiedener Penetrationsenhancer, sowie ME1 und ME2 (Peptidgehalt: 40 ppm) ohne SC; MW ± SD; n = 3

In den Tiefenprofilen in Abbildung 52A–C sind die absoluten Konzentrationen von PKEK in den Hautschnitten dargestellt. Da unter den Enhancer-haltigen Formulierungen die höchsten Konzentrationen (0,75–0,04 µM) mit der 2-Pyrrolidon-haltigen Formulierung erzielt wurden, wurde das entsprechende Tiefenprofil in jeder der Teilabbildungen A–C vergleichend mitgeführt, genau wie das der unmodifizierten Emulsion. Nach Anwendung der Emulsionen mit Glycerylcaprylat/-caprat (2,0 x) und (1,5 x) betrug die PKEK-

Konzentration maximal $0,1 \mu\text{M}$ (Abbildung 52A). Für den 2,0-fach veresterten Enhancer nahm die Konzentration mit zunehmender Hauttiefe bis $0,002 \mu\text{M}$ ab und für die 1,5-fach veresterte Variante wurde ein Konzentrationsanstieg in tiefen Schichten der Dermis beobachtet. Überwiegend höhere Konzentrationen wurden mit der unmodifizierten Emulsion erzielt, wobei die Konzentration im Zielkompartiment (Bereich zwischen Epidermis und Dermis) zwischen $0,07 \mu\text{M}$ und $0,04 \mu\text{M}$ betrug. Für die PeG-haltige Formulierung lag die PKEK-Konzentration ebenfalls unter $0,1 \mu\text{M}$ und nahm bis auf $0,004 \mu\text{M}$ in tieferen Hautschichten ab (Abbildung 52B). Für die Emulsion mit dem PGFE wurden höhere Konzentrationen in der Haut erzielt ($0,16\text{--}0,01 \mu\text{M}$), die in oberen Hautschichten auch höher waren als für die unmodifizierte Emulsion. Mit Hilfe der ME wurden ebenfalls hohe Konzentrationen in der Haut erzielt (ME1: $0,15\text{--}0,05 \mu\text{M}$; ME2: $0,51\text{--}0,15 \mu\text{M}$), die im Bereich der Dermis die der unmodifizierten Emulsion, sowie der Emulsion mit 2-Pyrrolidon überwiegend überstiegen (Abbildung 52C).

Die Ergebnisse des 1. Screenings mit PKEK-haltigen Formulierungen verdeutlicht, dass für dieses Peptid mit Polyglyceryl-3-caprat, PeG und 2-Pyrrolidon andere Enhancer vorteilhafter für das Penetrationsvermögen waren als für GEKG. Glycerylcaprylat/caprat (2,0 x) und (1,5) brachten hingegen keinen Vorteil für den Peptidtransport zum Zielkompartiment. Scheinbar sind nicht nur Wechselwirkungen zwischen dem Enhancer und Hautbestandteilen für die penetrationsfördernden Effekte verantwortlich. Möglicherweise spielen auch Wechselwirkungen zwischen dem Enhancer und Peptid eine wesentliche Rolle. Je nach Stärke dieser Wechselwirkungen ist der Enhancer, der selbst in die Haut penetriert, besser in der Lage, das Peptid mit sich zu ziehen (Solvent Drag Prinzip). Mit Hilfe der Affinitätskapillarelektrophorese und Frontalanalyse konnten keine Wechselwirkungen der Peptide GEKG und PKEK mit den Enhancern Glycerylcaprylat/caprat (2,0 x), Polyglyceryl-3-caprat und 2-Pyrrolidon nachgewiesen werden [345]. Möglicherweise müssen andere Methoden, wie beispielsweise die Affinitätschromatographie, Kernspinresonanzspektroskopie (NMR) oder isotherme Titrationskalorimetrie eingesetzt werden, um die auf Wasserstoffbrücken beruhenden Wechselwirkungen zu belegen.

Wie im Versuch mit 5000 ppm PKEK in der ME1 (siehe Seite 67 in Kapitel 5.3. Optimierung der Penetration durch den Einsatz von Mikroemulsionen) wurde im 1. Screening belegt, dass mit Hilfe kolloidaler Systeme wie ME das Penetrationsvermögen des hydrophilen, polaren Peptids maßgeblich verbessert werden kann. PKEK penetrierte aus der ME1 und ME2 stärker in und durch die Haut als mit den Enhancer-haltigen Formulierungen.

Da PKEK in Gegenwart von Hautbestandteilen vergleichsweise stabil ist, entspricht die im Penetrationsversuch detektierte Radioaktivität sehr wahrscheinlich dem intakten Peptid (siehe 3.4.1. Stabilität von GEKG, Palmitoyl-GEKG, PKEK und Palmitoyl-PKEK, Seite 21).

5.4.2.2. Screening mit Enhancer-haltigen Formulierungen (n=3)

Mit den Emulsionen, die Polyglyceryl-3-caprat und 2-Pyrrolidon als Penetrationenhancer enthielten, wurden im 1. Screening gute Ergebnisse mit hohen Permeationsraten erzielt. Daher sollten diese in einem erweiterten Screening mit drei Parallelversuchen näher untersucht werden (F1 und F6). Allerdings erwies sich die bisher verwendete O/W-Emulsion (im Folgenden O/W-Emulsion 1) mit Polyglycerol-3-caprate (F1) als physikalisch instabil und es wurden zwei weitere Emulsionen (O/W-Emulsionen 2 und 3) mit diesem Enhancer (F2 und F3) einbezogen, die von der Evonik Industries AG entwickelt worden waren (Zusammensetzung im Anhang, Seite 140). Außerdem wurde die PKEK-Penetration aus den neuen Emulsionen ohne zusätzlichen Enhancer (F4 und F5) untersucht.

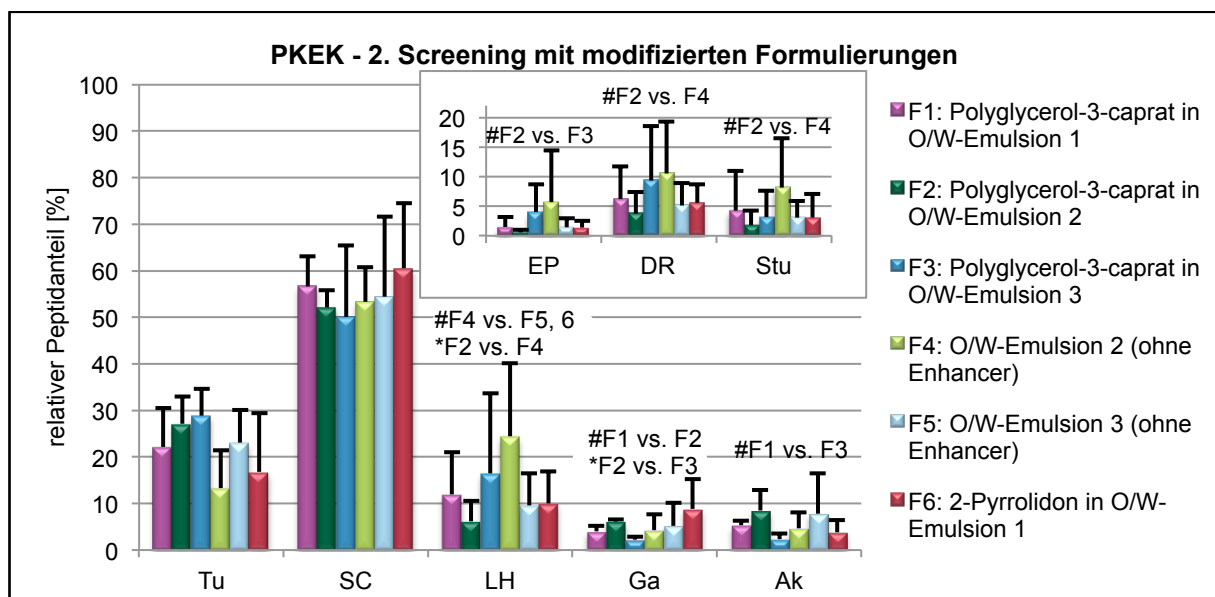


Abbildung 53: Penetrationsergebnisse von PKEK aus O/W-Emulsionen mit 5 % Polyglycerol-3 Caprate (F1-F3) und Soluphor P (F6), sowie O/W-Emulsionen ohne Enhancer (F4-F5) (Peptidgehalt: 40 ppm) als relativer Anteil in den untersuchten Proben Tupfer (Tu), SC, lebende Hautschichten (LH = Summe aus vitaler Epidermis (EP), Dermis (DR) und Stumpf (Stu)), Gaze (Ga) und Akzeptormedium (Ak); MW \pm SD; n = 3 für Tu, SC, Ga, Ak; n = 9 für LH, EP, DR, Stu; *p < 0,01; #p < 0,05 für Unterschiede zwischen den Formulierungen

Die Ergebnisse des 2. Screenings mit den relativen PKEK-Anteilen in den untersuchten Proben in Abbildung 53 zeigt, dass bei allen Formulierungen der größte Peptidanteil im SC nachgewiesen wurde. Auf der Hautoberfläche verblieb der tendenziell größte Peptidanteil mit 27 % und 29 % nach Anwendung der neu entwickelten F2 und F3 mit Polyglycerol-3-caprat. Im SC wurden bei diesen Formulierungen relative PKEK-Anteile von 52 % beziehungsweise 50 % detektiert. Nach Applikation der entsprechenden Emulsionen ohne Enhancer (F4 und F5) verblieben mit 13 % und 23 % weniger PKEK auf der Hautoberfläche und es erreichten tendenziell höhere Mengen das SC (53 % und 54 %). Mit Hilfe der 2-Pyrrolidon-haltigen O/W-Emulsion 1 (F6) wurde der größte Peptidanteil im SC erreicht (61 %) gefolgt von Polyglycerol-3-caprat-haltigen O/W-Emulsion 1 (F1) (57 %). Nur 17 % beziehungsweise 22 % penetrierten bei diesen Emulsionen nicht und wurden auf der

5. Penetrationsuntersuchungen an peptidhaltigen Formulierungen

Hautoberfläche detektiert. In den lebenden Hautschichten wurden zwischen 6 und 24 % PKEK detektiert, wobei der Anteil mit O/W-Emulsion 2 ohne Enhancer am größten war, gefolgt von O/W-Emulsion 3 mit Polyglycerol-3-caprat (F3). Mit F1, F5 und F6 gelangten ähnliche Mengen von ca. 10 % in die Hautschnitte. Die permeierten PKEK-Anteile in Gaze und Akzeptor lagen jeweils unter 10 %.

Gründe für die teilweise starken fluktuierenden Peptidanteile in den Schnitten der Haut sind auf die heterogene Oberflächenbeschaffenheit der Haut zurückzuführen und wurden an anderer Stelle ausführlich erläutert. Die mittleren WFR der Versuche lagen mit 26–109 % in einem ähnlichen Bereich wie im 1. Screening mit PKEK und schwankten erheblich. Auch hierfür wurden mögliche Ursachen, wie Matrixeffekte oder die Verwendung verschiedener Szintillatoren, bereits zuvor beschrieben. Durch Darstellung relativer Anteile, können dennoch vergleichende Aussagen zu den Penetrationsergebnissen der verschiedenen Formulierungen getroffen werden. Da PKEK in Gegenwart von Hautbestandteilen vergleichsweise stabil ist, entspricht die im Penetrationsversuch detektierte Radioaktivität sehr wahrscheinlich dem intakten Peptid (siehe 3.4.1. Stabilität von GEKG, Palmitoyl-GEKG, PKEK und Palmitoyl-PKEK, Seite 21).

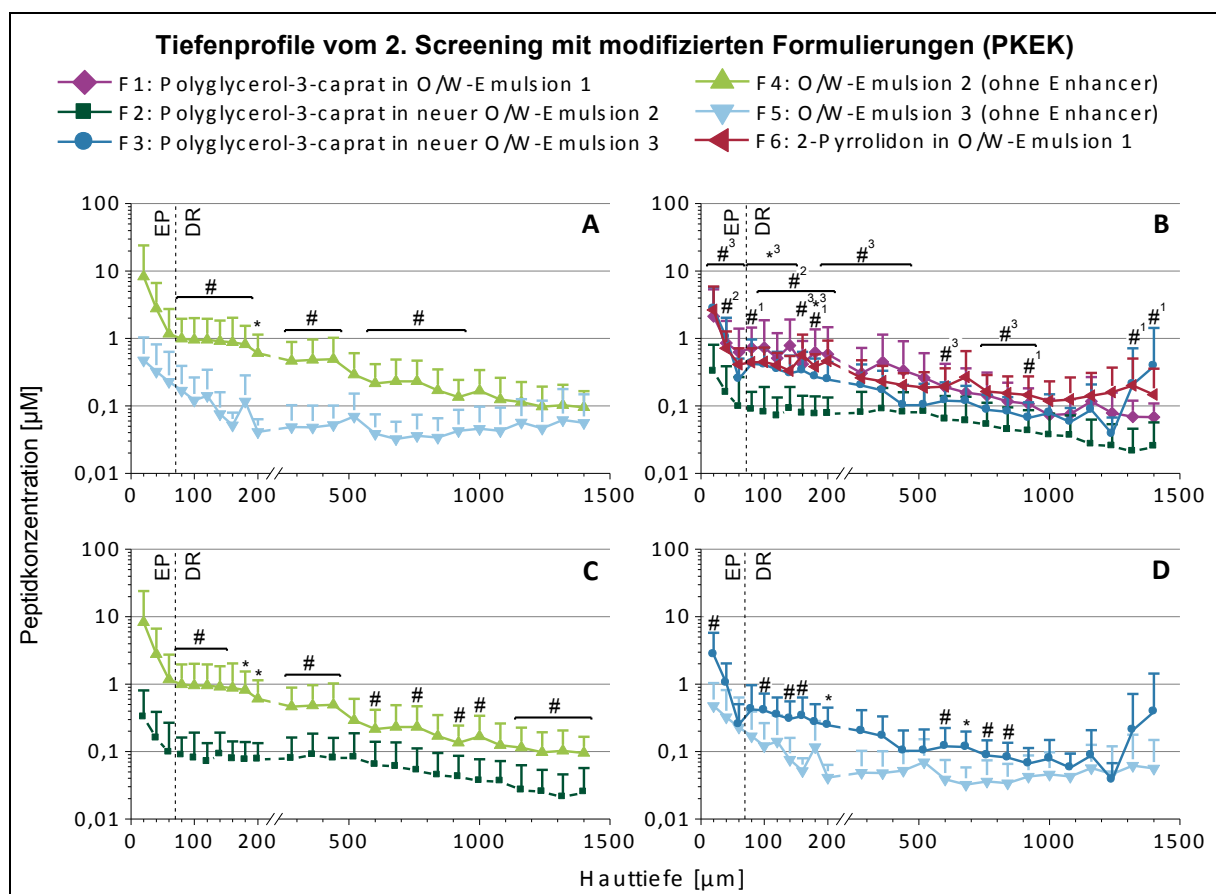


Abbildung 54: Tiefenprofile von PKEK aus O/W-Emulsionen mit 5 % Polyglycerol-3-caprat (F1-F3) und 2-Pyrrolidon (F6), sowie O/W-Emulsionen ohne Enhancer (F4-F5) (Peptidgehalt: 40 ppm) ohne SC; EP: lebende Epidermis, DR: Dermis; MW \pm SD; n = 9; *p < 0,01; #p < 0,05; in Abbildung B: ¹F1 vs. F2, ²F2 vs. F3, ³F3 vs. F6

Die Tiefenprofile des 2. Screenings mit PKEK-haltigen Formulierungen sind in Abbildung 54 dargestellt. Der Vergleich der neu entwickelten Emulsion 2 und 3 ohne Enhancer (F4 und F5) in Abbildung 54A zeigt, dass höhere absolute PKEK-Konzentrationen nach Anwendung von O/W-Emulsion 2 in der Haut detektiert werden konnten. In Abbildung 54B sind die Ergebnisse aller Enhancer-haltigen Formulierungen gegenübergestellt. Für alle Formulierungen nahm die Konzentration mit zunehmender Hauttiefe ab. W/O-Emulsion 1 mit dem PGFE (F1) und 2-Pyrrolidon (F6), sowie W/O-Emulsion 3 mit dem PGFE (F3) erzielten vergleichbare PKEK-Konzentrationen in den vitalen Hautschichten, die höher waren als nach Anwendung der PGFE-haltigen W/O-Emulsion 2 (F2). Am Zielkompartiment betrug die Konzentration für F1, 3 und 6 zwischen 0,7–0,3 μM und für F2 nur 0,1 μM . Der Vergleich der PGFE-haltigen Formulierungen gegenüber den Emulsionen ohne Enhancer in Abbildung 54C und D, dass für O/W-Emulsion 2 höhere Peptidkonzentrationen ohne Enhancer in der Haut erzielt werden konnten und für O/W-Emulsion 3 mit Enhancer.

Die Untersuchung der neuen Formulierungen konnte einen penetrationsfördernden Effekt von Polyglycerol-3-caprat nicht bestätigen. Bei den Emulsionen ohne Enhancer (F4 und F5) war der nicht penetrierte Anteil jeweils tendenziell geringer als bei den Formulierungen mit Polyglycerol-3-caprat (F2 und F3). Mit Emulsion 2 ohne Enhancer gelangte ein höherer PKEK-Anteil in die Haut als bei der Formulierung mit Enhancer. Für Emulsion 3 war der Peptidanteil in der Haut mit Enhancer etwas höher als ohne. Der permeierte Anteil in Gaze und Akzeptor war für Emulsion 3 ohne Enhancer allerdings höher. Möglicherweise beeinflusst das eingesetzte Vehikel, inwiefern der Enhancer seine penetrationsfördernden Eigenschaften entfalten kann. Wechselwirkungen des PGFE mit anderen Formulierungsbestandteilen könnten dazu führen, dass der Enhancer weniger stark in die Haut penetriert.

Für die O/W-Emulsion 1 mit Polyglycerol-3-caprat und 2-Pyrrolidon konnte mit dem erweiterten Screening (n=3) die Ergebnisse aus dem vorherigen Versuch mit n=1 nicht bestätigt werden. So waren vor allem die hohen permeierten Anteile nicht reproduzierbar und die Anteile in Tupfer und SC waren im 2. Screening höher. Es verblieben aber auch höhere Peptidmengen im Zielkompartiment. Dies wird in höheren relativen Peptidanteilen in Epidermis und Dermis deutlich, sowie höheren Konzentrationen in den Tiefenprofilen. Möglicherweise enthielten die Hautstücke, die im 1. Screening für diese Formulierungen verwendet wurden, vermehrt Poren, die die Permeation erleichterten. Auch die unterschiedliche Qualität der Haut könnte für die veränderten Ergebnisse verantwortlich sein. Im ersten Screening wurde Leichenhaut von Oberschenkel und Bauch verwendet und im 2. Screening Mammahaut von lebenden Spendern.

6. Zusammenfassung und Ausblick

Ziel der Arbeit war es, das dermale Penetrationsverhalten der Modellpeptide GEKG, PKEK, LPA, LPBG und LPT aus Standard-Vehikelsystemen zu untersuchen. Die umfassende physikochemische Charakterisierung der Modellpeptide ergab, dass diese sehr hydrophil und polar sind und zudem aufgrund zahlreicher ionisierbarer funktioneller Gruppen permanente Ladungen aufweisen. In Gegenwart von Hautbestandteilen erwiesen sich PKEK als stabil. GEKG, Pal-GEKG, Pal-PKEK, LPA, LPBG und LPT wurden mit zunehmender Inkubationszeit abgebaut. Die Peptide besitzen damit ausgesprochen ungünstige Eigenschaften, um die lipophile Penetrationsbarriere der Haut, das SC, zu überwinden und ihre Zielkompartimente in den vitalen Schichten der Haut zu erreichen.

Mit Hilfe chemischer Modifizierung der Peptide GEKG und PKEK in Form einer N-terminalen Palmitoylierung (Pal-GEKG und Pal-PKEK), sowie verschiedener galenischer Ansätze sollte das Penetrationsvermögen optimiert werden. Zum Einen kamen zu diesem Zweck verschiedene Penetrationenhancer zum Einsatz. Zum Anderen sollten ME als moderne kolloidale Vehikelsysteme, die für ihre hervorragende penetrationsfördernde Wirkung bekannt sind, verwendet werden. Die dermatologische Verträglichkeit war Hauptkriterium bei der Auswahl der Inhaltsstoffe. Auf Basis der nichtionischen PGFE konnten neun vielversprechende Mikroemulsionssysteme entwickelt werden. Zwei der Systeme (ME1 und ME2) wurden für weitere Untersuchungen und als Vehikel für die Peptide ausgewählt. Anhand von Phasendiagrammen wurde jeweils die Größe des isotropen Phasengebietes identifiziert. Eine umfassende Charakterisierung ermöglichte die Abgrenzung von ME gegenüber flüssigkristallinen Mischungen. Weiterhin ergaben die Strukturuntersuchungen, dass in den Systemen der ME1 und ME2 W/O-Systeme vorliegen, die in bikontinuierliche Strukturen übergehen. Für das System ME2 wurde außerdem der Übergang zu O/W-ME bestätigt. Hinsichtlich der genauen Perkolationschwellen variierten die Ergebnisse teilweise. Weitere etablierte Methoden, beispielsweise die Elektronenspinresonanz-Spektroskopie (ESR), Gefrierbruch-Transmissionselektronenmikroskopie (FF-TEM) oder Kernspinresonanzspektroskopie (NMR) könnten eingesetzt werden, um weitere Informationen über die innere Struktur der Systeme zu erhalten. Mittels DLS wurde die Größe der kolloidalen Phase für ausgewählte W/O-ME bestimmt. Es wurden hydrodynamische Radien zwischen 11 und 57 nm erhalten und somit typische Werte für ME. Die Peptide GEKG, PKEK, LPA, LPBG und LPT konnten in die ME inkorporiert werden. Pal-GEKG und Pal-PKEK führten zur Destabilisierung der Systeme, da sie sich vermutlich in die emulgatorhaltigen Grenzschichten einlagerten. Toxikologische Parameter der Mikroemulsionsbestandteile zeigten, dass diese leichte bis mäßige Reizungen an der Haut hervorrufen können. Für die ME1 und ME2 mit 10 % hydrophiler Phase, 25 % Emulgatorgemisch und 65 % Öl, die einen hautfreundlichen pH-Wert im leicht sauren Bereich besitzen, wurde eine gute Verträglichkeit mittels HET-CAM belegt. Klinische

Untersuchungen in Form eines einfachen Epikutantests sind notwendig, um primäre Reizungen an der Haut zweifelsfrei auszuschließen.

Umfangreiche *ex vivo* Penetrationsuntersuchungen an Humanhaut wurden mittels Diffusionszelle nach Franz mit den verschiedenen Modellpeptiden, sowie den unterschiedlichen Formulierungen durchgeführt. Für GEKG, PKEK, Pal-GEKG und Pal-PKEK wurde das Penetrationsverhalten aus O/W-Emulsion und ME zu drei Inkubationszeiten (30, 100 und 300 min) untersucht (n=3) und aus Enhancer-haltigen Formulierungen, sowie für die Peptide LPA, LPBG und LPT zu einer Inkubationszeit von 300 min. Nach Anwendung der O/W-Emulsion verblieb GEKG überwiegend auf der Hautoberfläche und penetrierte kaum in die Haut. PKEK war im Vergleich dazu besser in der Lage aus der O/W-Emulsion in die Haut zu penetrieren. Für dieses Peptid wurde außerdem gezeigt, dass die Peptidkonzentration in der Formulierung das Penetrationsvermögen beeinflusst. Mit einer geringer konzentrierten O/W-Emulsion (40 ppm vs. 5000 ppm) wurden nach 300 min signifikant höhere relative Peptidanteile im SC und den lebenden Hautschichten erzielt. LPBG und LPT penetrierten nach Anwendung der BC sehr gut in die Haut und erreichten ihr Zielkompartiment Dermis in hoher Konzentration. LPA gelangte nur in geringem Ausmaß in die Haut und war nur in den oberen Schichten nachweisbar. Die permeierten Anteile in Gaze und Akzeptor lagen für alle drei Peptide unterhalb der LOQ. Mit Hilfe kolloidaler Vehikelsysteme konnte das Penetrationsvermögen von GEKG, PKEK, LPA, LPBG und LPT maßgeblich verbessert werden. Vor allem in tieferen Dermissschichten, sowie Gaze und Akzeptor wurden höhere Peptidanteile erzielt. Die chemische Modifizierung von GEKG und PKEK in Form der N-terminalen Palmitoylierung erbrachte hingegen keinen Vorteil für das Penetrationsvermögen. In Screenings (n=1) mit sieben beziehungsweise fünf hydrophilen Enhancern wurde untersucht, inwiefern diese die Penetration von GEKG und PKEK beeinflussen. Diese steigerten in unterschiedlichem Ausmaß die penetrierten und permeierten Peptidanteile. Die höchste Peptidkonzentration im Zielkompartiment Dermis wurde für GEKG mit der Polyglycerolcaprylat/caprat (2,0x)-haltigen Formulierung erzielt. Polyglyceryl-3-caprat und 2-Pyrrolidon steigerten vor allem den permeierte Anteil von PKEK in Gaze und Akzeptor. Im erweiterten Screening (n=3) konnte eine signifikante Steigerung des Penetrationsvermögens durch diese Enhancer nicht bestätigt werden.

Weitere Enhancer könnten hinsichtlich ihres penetrationsfördernden Effekts für hydrophile Peptide untersucht werden. Alternativ könnten Enhancermischungen eingesetzt werden [65]. In den ersten Screenings erwiesen sich unterschiedliche Enhancer vorteilhaft für das Penetrationsvermögen von PKEK und GEKG. Wechselwirkungen zwischen Enhancer und Peptid sind möglicherweise hierfür verantwortlich, die mittels Affinitätschromatographie, NMR oder isothermer Titrationskalorimetrie näher nachgewiesen werden könnten. Da die penetrationsfördernden Eigenschaften von PGFE und die zugrunde liegenden Mechanismen bisher wenig beziehungsweise gar nicht untersucht wurden, könnten Strukturuntersuchungen an künstlichen Lipidmembranen analog zu Studien von

Engelbrecht *et al.*, Mueller *et al.* und Eichner *et al.* zeigen, inwiefern diese die Lipidanordnung im SC beeinflussen können [59, 60, 346, 347]. Für LPA, LPBG und LPT sollte die analytische Methode weiter optimiert werden, um geringere LOQ zu erzielen und niedrige Konzentrationen in Hautproben zuverlässig zu detektieren. Die Penetrationsversuche für diese Peptide sollten in Dreifachbestimmung und für drei Inkubationszeiten wiederholt werden, um statistisch vergleichbare Informationen über das Penetrationsverhalten der Peptide, sowie den zeitlichen Verlauf zu gewinnen. Weiterhin könnten die verwendeten ME optimiert werden, sodass höhere Peptidkonzentrationen in der Haut erzielt werden und geringere Anteile in Gaze und Akzeptor permeieren. Der Ansatz, die Viskosität der ME zu erhöhen sollte zu diesem Zweck weiterverfolgt werden. *In vivo* Studien sind nötig, um die Penetrationsergebnisse zu verifizieren und zudem die systemische Exposition der Peptide zu beurteilen.

7. Experimenteller Teil

7.1. Analytische Methoden zur Quantifizierung der Peptide

7.1.1. Chromatographische Methoden (LC-MS und HPLC-UV)

Die Quantifizierung von Pal-GEKG, Pal-PKEK, LPA, LPBG und LPT erfolgte mittels LC-MS unter Verwendung der in Tabelle 15 und Tabelle 16 dargestellten Parameter. Zur Auswertung der erhaltenen Chromatogramme wurde das Programm Xcalibur herangezogen [348]. Die bestimmten Peakflächen der Kalibrierproben wurden mittels OriginPro mit linearer Regression der Form $y = mx + n$ für LPA, LPBG, LPT und Pal-GEKG (0,2–6,0 µg/mL) beziehungsweise mit polynomialer Regression der Form $y = ax^2 + bx + c$ für Pal-PKEK und Pal-GEKG (0,2–10,0 µg/mL) ausgewertet [349]. Die Korrelation (R^2) von nominalen Konzentrationen und Messwerten wurde mittels Methode der kleinsten Quadrate berechnet. Kalibrierungen mit $R^2 \geq 0,99$ wurden zur Auswertung verwendet.

Tabelle 15: Analytische Parameter der Quantifizierung mittels HPLC-MS für Pal-GEKG und Pal-PKEK; H₂O = Wasser, FA = Ameisensäure, (l) = linear, (p) = polynomial

	Peptide	Pal-GEKG (1)	Pal-GEKG (2)	Pal-PKEK
Kalibrierung	Stammlösung	1000 µg/mL in MeOH		
	Interner Standard (Konzentration)	Mometasonfuroat (MMS) (10 µg/mL)		Hydrocortisonbutyrat (HCB) (5 µg/mL)
	Kalibrierbereich	0,2–2,0 µg/mL (l) 0,2–10,0 µg/mL (p)	für Stabilität: 0,5–5,0 µg/mL (l)	0,5–6,0 µg/mL (p)
	Gerät	SpectraSystem P 4000 und Autosampler AS 3000	Agilent HP 1100 HPLC mit Autosampler und binärer Hochdruckgradientenpumpe	
HPLC-Parameter	Stationäre Phase	Trentec Reprosil-Pur 120 C18-AQ 3 µm, 125 × 2,0 mm	YMC ODS AQ 125 × 2,1 mm ID	
	Mobile Phase	A: H ₂ O/FA (100/0,1) B: ACN/FA (100/0,1)		A: ACN/H ₂ O/FA (50/50/0,02) B: ACN/FA (100/0,02)
	Gradient	0–30 min 100 % A auf 100 % B		0–10 min 100 % A auf 50 % B
	Flussrate	0,2 mL/min		
	Säulentemperatur	40 °C		
	Injektionsvolumen	5 µL		10 µL
	Druck	ca. 88 bar		
		Gerät	Finnigan LCQ Ionenfallenspektrometer	
Detektion mittels MS	Detektion	ESI positiv SIM Modus		
	m/z für $[M + H]^+$	628,3		739,5 und 370,7
	m/z für internen Standard	MMS: 520,7	MMS: 520,4	HCB: 433,5
	Kapillartemperatur	220 °C		200–220 °C
	Kapillarspannung	20 V		
	Spray-Spannung	4,5 kV		
	Sheath Flow Rate	70	60-70	
	Aux Flow Rat	30	10	
	Retentionszeit	ca. 28,7 min	ca. 23,8 min	ca. 12,3 min
		MMS: ca. 29,36 min	MMS: 27,3 min	HCB: 13,7 min
	LOQ	0,2 µg/mL (S/N ≥ 10)	0,1 µg/mL (S/N ≥ 10)	0,5 µg/mL (S/N ≥ 10)
Nachweisgrenze (LOD)	0,05 µg/mL (S/N ≥ 3)	0,05 µg/mL (S/N ≥ 3)	0,3 µg/mL (S/N ≥ 3)	

Tabelle 16: Analytische Parameter der Quantifizierung mittels HPLC-MS für LPA, LPBG und LPT; H₂O = Wasser, FA = Ameisensäure

Analyten	LPA	LPBG	LPT	Chinidin	
Kalibrierung	Stammlösung	1000 µg/mL in MeOH			
	Matrix	In Vorversuchen MeOH; im Penetrationsversuch MeOH in Konzentrationen analog zu den Proben → Matrixbestandteile (ME, BC, Hautextrakt) analog zu den Proben			
	Interner Standard	Chinidin (0,5 µg/mL)			
	Kalibrierbereich	0,2–10 µg/mL (linear)			
HPLC-Parameter	Gerät	Agilent HP 1100 HPLC mit Autosampler und binärer Hochdruckgradientenpumpe			
	Stationäre Phase	YMC Pack Diol (HILIC), 150 × 3,0 mm ID, 12 nm S-5 µm			
	Mobile Phase	ACN/H ₂ O/FA (45/55/0,1)			
	Gradient	isokratisch			
	Flussrate	0,4 mL/min			
	Säulentemperatur	30 °C			
	Injektionsvolumen	20 µl			
	Druck	60–65 bar			
Detektion mittels MS	Gerät	Finnigan LCQ Ionenfallenspektrometer			
	Detektion	ESI positiv SIM Modus			
	<i>m/z</i> für [M + H] ⁺	329,1	357,2	387,1	325,2
	Kapillartemperatur	200–220 °C			
	Kapillarspannung	20 V			
	Spray-Spannung	4,5 kV			
	Sheath Flow Rate	60-70			
	Aux Flow Rat	10			
	Retentionszeit	ca. 6,0 min	ca. 5,9 min	ca. 5,7 min	ca. 4,7 min
	LOQ	0,1 µg/mL ^a	0,1 µg/mL ^a	0,1 µg/mL ^a	
	0,22 µg/mL ^b	0,15 µg/mL ^b	0,22 µg/mL ^b		
LOD	0,07 µg/mL ^b	0,04 µg/mL ^b	0,06 µg/mL ^b		

^afür S/N ≥ 10; ^bBerechnung mittels DINTTEST gemäß DIN 32645 [350]

Die Quantifizierung von GEKG und PKEK erfolgte mittels HPLC mit UV-Detektion unter Verwendung der in Tabelle 17 dargestellten Parameter. Zur Auswertung der erhaltenen Chromatogramme wurden die Programme ChemStation (Rev.B.03.02) von Agilent und MassLynx™ V4.0 SP4 von Waters verwendet [351, 352]. Die bestimmten Peakflächen der Kalibrierproben wurden mittels OriginPro mit linearer Regression der Form $y = mx + n$ ausgewertet [349]. Die Korrelation (R^2) von nominalen Konzentrationen und Messwerten wurde mittels Methode der kleinsten Quadrate berechnet. Kalibrierungen mit $R^2 \geq 0,99$ wurden zur Auswertung verwendet.

Zur Validierung der mittels LC-MS und HPLC-UV durchgeführten Messläufe wurde die Präzision und Richtigkeit jeder gemessenen Kalibrierreihe bestimmt. Ein Kalibrierstandard wurde mitgeführt und nach jeder 12. Einspritzung vermessen. Die Analysenläufe wurden angenommen, wenn sich die Kalibrierproben innerhalb der üblichen Abweichungen von 15 % (LOQ 20 %) für biologische Matrices bewegten [353]. Maximal eine Kalibrierprobe durfte stärker abweichen und wurde dann für die Auswertung nicht berücksichtigt.

Tabelle 17: Analytische Parameter der Quantifizierung mittels HPLC-UV für GEKG und PKEK; AA = Ammoniumacetat, FA = Ameisensäure, H₂O = Wasser

Parameter	GEKG (1)	GEKG (2)	PKEK	
Kalibrierung	Stammlösung	1000 µg/mL in Wasser		
	Matrix	MeOH in Konzentrationen analog zu den Proben		
	Kalibrierbereich	2,0–150,0 µg/mL	1,0–20,0 µg/mL	20,0–140 µg/mL
HPLC-Parameter	Gerät	Agilent HP 1100 HPLC mit Autosampler, binärer Hochdruckgradientenpumpe	Agilent HP 1100 HPLC mit Autosampler, binärer Hochdruckgradientenpumpe	Waters Delta 600 mit Waters 600 Controller Pumpe, Autosampler Waters 717 plus
	Stationäre Phase	125/4 Nucleosil [®] 300-7 Protein C-4	YMC Pack Diol (HILIC), 150 × 3,0 mm ID, 12 nm S-5 µm	YMC Pack Diol (HILIC), 150 × 3,0 mm ID, 12 nm S-5 µm
	Mobile Phase	A: H ₂ O + FA (20 µL/L) B: MeOH	ACN / H ₂ O (40/60) + 12 mmol/L AA	ACN / H ₂ O (50/50) + 5 mmol/L AA
	Gradient	0–8 min: 100 % A 8–9 min: auf 50 % B 9–15 min: 50 % B 15–16 min: auf 100 % A	isokratisch	isokratisch
	Flussrate	1,2 mL/min	1,5 mL/min	1,0 mL/min
	Säulentemperatur	60 °C	30 °C	30 °C
	Injektionsvolumen	10 µL	20 µL	20 µL
	Druck	47 bar	100 bar	108 bar
	Gerät	Photodiodenarray-Detektor (DAD)	Photodiodenarray-Detektor (DAD)	Waters 2996 DAD
	Wellenlänge	205 nm	205 nm	210 nm
Detektion	Retentionszeit	4,7 min	3,3 min	6,5 min
	LOQ	3,0 µg/mL ^a / 5,9 µg/mL ^b	1,0 µg/mL ^a / 1,6 µg/mL ^b	20 µg/mL ^a / 19,0 µg/mL ^b
	LOD	2,0 µg/mL ^c / 1,7 µg/mL ^b	0,5 µg/mL ^c / 0,5 µg/mL ^b	15 µg/mL ^c / 7,9 µg/mL ^b

^afür S/N ≥ 10; ^bBerechnung mittels DINTTEST gemäß DIN 32645 [350]; ^cfür S/N ≥ 3

Zur Bestimmung des Carry-over Effekts wurde in Dreifachbestimmung zunächst die höchste Probenkonzentration der Kalibrierung vermessen und im Anschluss daran MeOH als Blindwert. Der Kalibrierbereich der Methoden wurde jeweils so festgelegt, dass im Chromatogramm des Blindwertes kein Signal des Analyten auftrat.

Der Matrixeffekt wurde für LC-MS Methoden für LPA, LPBG und LPT bestimmt. Hierfür wurden Peptidlösungen (0,6 µg/mL) mit Formulierung (BC oder ME) versetzt, sowie Peptidlösungen mit Hautextrakt hergestellt (n=3). Die Peakflächen, die für Peptid und internen Standard anhand der Messung der methanolischen Peptidlösung ohne Matrixbestandteile erhalten wurden, wurden zu den Peakflächen der matrixhaltigen Proben ins Verhältnis gesetzt.

7.1.2. Flüssigkeitsszintillationsmessung

Die Flüssigkeitsszintillationsmessungen wurden mittels 1414 WinSpektral Liquid scintillation counter für Proben der Penetrationsversuche durchgeführt, die radioaktiv (³H oder ¹⁴C) markiertes Material enthielten. Den radioaktiven Proben wurde jeweils ein

Szintillator hinzugefügt. Dieser absorbiert die beim Beta-Minus-Zerfall der Radionuklide ^3H und ^{14}C freigesetzten Elektronen und wird somit angeregt. Die Anregungsenergie wird in Licht umgewandelt, das mittels Photomultiplier detektiert wurde. Zur Konzentrationsbestimmung in den Proben wurde eine Eichgerade erstellt. Hierfür wurden $5\ \mu\text{l}$ des radioaktiven Materials entnommen und auf $5\ \text{mL}$ mit MeOH aufgefüllt. Anschließend wurden Aliquots entnommen, eine Lösung von $4\ \text{g}$ PPO und $0,1\ \text{g}$ POPOP in $1\ \text{L}$ Toluol als Szintillator hinzugesetzt und per Doppelbestimmung vermessen.

7.1.3. Kapillarelektrophorese

Die Messungen erfolgten an einem BECKMAN/COULTER P/ACE MDQ Molecular Characterization System mit UV-Detektion. Die verwendete Quarzglas kapillare hatte eine Gesamtlänge von $40,5\ \text{cm}$, eine effektive Länge bis zum Detektor von $31,0\ \text{cm}$ und einen Innendurchmesser von $50\ \mu\text{m}$. Vor jeder Messung wurde die Kapillare zur vollständigen Hydroxylierung der Oberfläche $3\ \text{min}$ mit $0,1\ \text{M}$ Natriumhydroxidlösung gespült, dann $2\ \text{min}$ mit entionisiertem Wasser und abschließend $3\ \text{min}$ mit Laufmittel. Tabelle 18 zeigt die verwendeten Geräteparameter, Laufmittel und Probenkonzentrationen. Die Messungen erfolgten in Doppelbestimmung und die Messdaten wurden an der IBM workstation type 6794 37U mit der 32 Karat™ Software ausgewertet [354].

Tabelle 18: Experimentelle Parameter für die Bestimmung des IEP mittels CE

Parameter	GEKG	PKEK
Eluent:	25 %iger Phosphat-Citrat-Puffer nach Mc Illoine aus $0,2\ \text{M}$ Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat-Lösung und $0,1\ \text{M}$ Citronensäurelösung [355]	Borat-Puffer nach Sørensen und Clark aus $0,05\ \text{M}$ Natriumborat-Lösung und $0,1\ \text{M}$ Salzsäurelösung [355]
Gradientenprogramm:	isokratisch	isokratisch
Injektion	hydrodynamische Injektion für $10\ \text{s}$	hydrodynamische Injektion für $10\ \text{s}$
Injektionsdruck:	$1,0\ \text{psi}$	$1,0\ \text{psi}$
Spannung:	$30\ \text{kV}$	$30\ \text{kV}$
Temperatur:	$25\ ^\circ\text{C}$	$25\ ^\circ\text{C}$
Markierung des EOF:	Aceton	Dimethylsulfoxid (DMSO)
Detektionswellenlänge:	$205\ \text{nm}$ (GEKG) $250\ \text{nm}$ (Aceton)	$210\ \text{nm}$ (PKEK) $221\ \text{nm}$ (DMSO)
Probekonzentration:	$200\ \mu\text{g/mL}$ GEKG in Wasser	$500\ \mu\text{g/mL}$ PKEK in Wasser

7.2. Herstellung der Formulierungen

7.2.1. Mikroemulsionen

Zur Herstellung der ME wurde zunächst Wasser mit dem jeweiligen Glykol (PrG, BuG oder PeG) gemischt. Anschließend wurde das Gemisch mit den Emulgatoren und der lipophilen Komponente in ein Schnappdeckelglas eingewogen. Dies wurde verschlossen und mit Parafilm abgedichtet. Der Ansatz wurde $1\ \text{min}$ bei $2000\ \text{rpm}$ homogenisiert und über Nacht auf dem Laborschüttler geschüttelt, damit sich alle Bestandteile lösen. Bei der Herstellung der peptidhaltigen Formulierungen wurden die Peptide in der hydrophilen Phase

(Wasser/Glykol-Gemisch) gelöst und diese mit dem Tensidgemisch und der lipophilen Phase analog zu den peptidfreien Formulierungen weiterverarbeitet.

7.2.2. Cremes

Die Basisformulierungen für die Penetrationsversuche von GEKG, PKEK, Pal-GEKG und Pal-PKEK wurden von der Evonik Industries AG (Essen, D) zur Verfügung gestellt. Für Formulierungen der Vollprofile (3 Versuchszeiten, n=3), sowie die O/W-Emulsion mit 2-Pyrrolidon, die in den Screenings zum Einsatz kam, wurde eine Basisformulierung zur Verfügung gestellt, die gegenüber der unmodifizierten O/W-Emulsion 1 nur 50 % Wasser, sowie kein Glycerol und BuG enthält. Aus Wasser, BuG, Glycerol und Peptid, sowie gegebenenfalls 2-Pyrrolidon wurde eine Lösung hergestellt. Diese wurde in einer Abdampfschale in die Creme mittels Pistill eingearbeitet. Durch wiederholtes Abkratzen des Pistills und der Abdampfschale, sowie erneutem Verrühren, wurde die Peptide homogen in den Formulierungen verteilt. Für die übrigen Formulierungen der Screenings enthielten die Basisformulierungen bereits Glycerol, BuG und gegebenenfalls die entsprechenden Enhancer. Die Peptide wurden jeweils in 5 % Wasser gelöst und die Lösung, wie bereits beschrieben, in die jeweilige Basisformulierung eingerührt. Die Zusammensetzungen der fertigen Cremes ist dem Anhang zu entnehmen (Anhang E: Zusammensetzung der O/W-Emulsionen, ab Seite 137).

Als Standardvehikel für LPA, LPBG und LPT wurde BC verwendet. Die Peptide wurden jeweils in 5 % Wasser gelöst und die Lösung, wie bereits beschrieben, in die fertige Creme eingearbeitet. Der Peptidgehalt betrug 1 % (m/m) und die Ansatzgröße 2 g für den HET-CAM, sowie 3 g für die Penetrationsexperimente. Für die Extraktionsversuche waren bei einer Ansatzgröße von 2 g je nur 0,5 % (m/m) Peptid in den Formulierungen enthalten, um Material zu sparen.

7.3. Charakterisierung der Peptide

7.3.1. Experimentelle Bestimmung des isoelektrischen Punktes

Zur Bestimmung des IEP wurde Peptidlösungen mittels CE (siehe 7.1.3. Kapillarelektrophorese, Seite 95) vermessen, wobei der pH-Wert des Laufmittels zwischen 3 und 7 für GEKG und 6 und 9 für PKEK variierte. In den resultierenden Elektropherogrammen wurde die Retentionszeit der Peptide (t_m) und der jeweils eingesetzten Neutralsubstanz (t_0) bestimmt.

$$\mu_{eff} = \frac{L_g L_d}{V} \cdot \left(\frac{1}{t_m} - \frac{1}{t_0} \right)$$

μ_{eff} =	Effektive Mobilität [$\text{cm}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$]
L_g =	Gesamtlänge der Kapillare [cm]
L_d =	Kapillarlänge bis zum Detektor [cm]
V =	Messspannung [V]
t_m =	Retentionszeit des Analyten [s]
t_0 =	Retentionszeit der Neutralsubstanz (EOF) [s]

Gleichung 4: Berechnung der effektiven Mobilität [195]

Mit Hilfe von Gleichung 4 wurde die effektive Mobilität μ_{eff} der Peptide berechnet und graphisch gegen den pH-Wert des Laufmittels aufgetragen. Der IEP wurde als derjenige pH-Wert ermittelt, bei dem die effektive Mobilität den Wert 0 annimmt.

7.3.2. Bestimmung der Sättigungslöslichkeit

Die Bestimmung der Sättigungskonzentration von Pal-GEKG erfolgte in Sörensen-Phosphatpuffer [355] verschiedener pH-Werte (5,4; 7,0 und 7,4) in je drei Ansätzen ($n = 3$). 250 μL Puffer wurden in ein 1,5 mL Eppendorf-Safe-Lock-Tube gefüllt und anschließend so viel Peptid hinzugefügt, dass ein Bodensatz entstand. Die Proben wurden dann mittels Vortex-Schüttler eine halbe Stunde durchmischt. Weiteres Peptid wurde hinzugefügt und nochmals eine halbe Stunde geschüttelt. Als nächstes wurden die Proben zentrifugiert und der Überstand nach Verdünnen mit MeOH (1:2500) per HPLC-MS vermessen.

7.3.3. Computergestützte Ermittlung physikochemischer Parameter

Für die Berechnung verschiedener physikochemischer Parameter der Peptide wurde MarvinSketch (Calculator Plugins) verwendet [356] und folgende Einstellungen zugrunde gelegt:

- **IEP:** pH-Schrittgröße 0,5
- **logP/logD_{IEP}:** Methode ChemAxon (basiert auf Methode von Viswanadhan, Ghose et al. [203])
- **H-Brücken-Donatoren/-Akzeptoren:** Schwefelatome und Halogene vom Akzeptor ausschließen
- **PSA:** Schwefel- und Phosphoratome von der Berechnung ausschließen

7.3.4. Extraktionsversuche

Für Extraktionsversuche aus den Formulierungen wurden 2 mg der peptidhaltigen Zubereitung in ein Reagenzglas abgewogen und mit 5 mL Extraktionsmittel (MeOH-Wasser-Mischungen: 100 %, 90 %, 70 %, 50 % MeOH) versetzt. Nach Homogenisation mittels Minishaker wurde die Probe 1 h bei Raumtemperatur auf dem Laborschüttler mit 200 U/min bewegt. Bei der Extraktion aus Cremes wurde die Probe zusätzlich 5–10 min im Ultraschall behandelt und zum Entfernen von Cremerückständen spritzenfiltriert. Die Versuche erfolgten jeweils in Dreifachbestimmung. Versuche mit Blindformulierungen wurden parallel durchgeführt. Zur Auswertung wurde der Peptidgehalt der Probe in % des Ausgangsgehalts angegeben. Der Ausgangsgehalt der Formulierung wurde anhand der eingewogenen Menge Peptid bei der Formulierungsherstellung ermittelt.

Für Extraktionsversuche aus Haut wurde bei $-32\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagerte Humanhaut (Rücken) in ca. $0,25\text{ cm}^2$ große Stücke geschnitten, das subkutane Fettgewebe mittels Skalpell weitestgehend entfernt und die präparierten Hautstücke in 1,5 mL Eppendorf-Safe-Lock-

Tubes platziert. 2 mg peptidhaltige ME wurden epikutan aufgetragen, die Probe 100 min bei $32\pm 1^\circ\text{C}$ inkubiert und anschließend mit 1 mL Extraktionsmittel (MeOH-Wasser-Mischungen: 100 %, 90 %, 70 %, 50 % MeOH) versetzt. Nach Homogenisation mittels Minishaker wurde die Probe eine Stunde bei Raumtemperatur auf dem Laborschüttler mit 200 U/min bewegt und abschließend zentrifugiert. Der Überstand wurde verdünnt und für die Quantifizierung in HPLC-Filter-Vials abgefüllt. Die Versuche erfolgten in Dreifachbestimmung. Ein Versuch mit Blindformulierung mit 100 % MeOH als Extraktionsmittel wurde parallel durchgeführt. Die Auswertung erfolgte analog zu den Formulierungen.

7.3.5. Untersuchung der Peptidstabilität in Gegenwart von Humanhauthomogenat

Zur Herstellung des HHH wurden die von der Hautklinik zur Verfügung gestellten Hautproben (Ohr-, Nabel- und juvenile Vorhaut) vereint und mit flüssigem Stickstoff eingefroren. Anschließend wurde das Hautgemisch mit Hilfe eines Mixers mit Kreuzklinge zerkleinert und homogenisiert. Das resultierende HHH wurde portionsweise (50–70 mg) in Protein LoBind Tubes 2 mL überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -32°C gelagert. Zur Durchführung der Stabilitätsuntersuchungen wurde das HHH aus dem Tiefkühlschrank entnommen und aufgetaut. Wässrige Peptidlösungen der in Tabelle 19 angegebenen Konzentrationen und Volumina wurden hinzugefügt und das Gemisch bei 32°C inkubiert. Nach verschiedenen Versuchszeiten wurden Proben wie angegeben entnommen und verdünnt. Die Quantifizierung der Proben erfolgte mittels LC-MS für die palmitoylierten Peptide, sowie LPA, LPBG und LPT beziehungsweise mittels HPLC-UV für GEKG und PKEK.

Tabelle 19: Experimentelle Parameter für den Stabilitätsversuch in Gegenwart von HHH

	GEKG	Pal- GEKG	PKEK	Pal- PKEK	LPA	LPBG	LPT
Volumen der wässrigen Peptidlösung [μL]	1500	1800	1500	1500	1500	1500	1500
Anfangskonzentration c_0 [$\mu\text{g}/\text{mL}$]	200	10	200	100	160	160	160
Volumen der Probenahme [μL]	100	200	100	100	100	100	100
Probenverdünnung	1:10	1:1	1:10	1:20	1:20	1:20	1:20
Verdünnungsmedium	MeOH (gegebenenfalls mit internem Standard)						

Für die Peptide LPA, LPBG und LPT wurden parallel wässrige Peptidlösungen mit 0,02 % Natriumazid untersucht. Zudem wurde die Stabilität der Peptide in wässriger Lösung ohne HHH sowohl bei 32°C , als auch bei Lagerung im Kühlschrank bei 8°C verfolgt. Alle Experimente wurden in Dreifachbestimmung durchgeführt.

7.4. Charakterisierung der Mikroemulsionen

7.4.1. pH-Wert Bestimmung

Die pH-Werte der ME wurden mittels pH-Meter durch Dreifachbestimmung ermittelt. Zwischen den Messungen wurde die Elektrode gründlich mit gereinigtem Wasser abgespült und anschließend getrocknet.

7.4.2. Erstellung der Phasendiagramme

Zur Erstellung der pseudoternären Phasendiagramme wurden Mischungen, wie unter Herstellung von ME (7.2.1. Mikroemulsionen) beschrieben, hergestellt. Dabei wurde das Emulgatormischung in 5 %-Schritten vorgelegt und die hydrophile und lipophile Komponente dann in den verschiedenen Verhältnissen ebenfalls in 5 %-Schritten ergänzt. Nach 24-stündigem Schütteln und zweiwöchiger Lagerung erfolgte die visuelle Beurteilung. Klare, einphasige Mischungen, die optisch isotrop waren, wurden dem Mikroemulsionsgebiet zugeordnet. Trübe Mischungen und anisotrope Phasen wurden nicht näher charakterisiert.

7.4.3. Polarisationsmikroskopie

Alle klaren Mischungen des Phasendiagramms wurden mittels Polarisationsmikroskop untersucht, um optische Isotropie zu bestätigen. Bei Raumtemperatur wurde jeweils ein Tropfen der Zubereitung auf einen Objektträger gegeben, ein Deckgläschen aufgelegt und die Probe betrachtet.

7.4.4. Rheologische Untersuchungen

Die dynamische Viskosität wurde für Zubereitungen verschiedener Verdünnungsreihen in den Phasendreiecken bestimmt. Hierfür wurde mithilfe eines Rotationsviskosimeters mit Zylindermesszelle und Doppelspalt die Viskosität bei zunehmender Scherrate von 0,1–100 s⁻¹ gemessen. Die Temperierung des Systems auf 25,0 °C ± 0,2 °C erfolgte mittels Peltiersystem. Die Messdaten wurde mit dem Programm Physica RheoPlus erfasst und ausgewertet [357].

7.4.5. Leitfähigkeitsmessungen

Zur Ermittlung der elektrischen Leitfähigkeit der ME wurde ein Konduktometer mit einer Zellkonstanten von 1,0 cm⁻¹ verwendet. Jede Probe wurde fünfmal bei Raumtemperatur (23 °C) vermessen.

7.4.6. Dynamische Differenzkalorimetrie

Für die DSC-Messungen wurde das DSC 200 verwendet. Zunächst wurden je 8–14 mg der Probe in einen Aluminiumtiegel genau eingewogen, der für die Messung hermetisch abgeschlossen war, um das Verdunsten von Wasser zu vermeiden. Dann wurde die Probe auf 40 °C erwärmt und im Anschluss auf -60 °C mit einer Abkühlrate von 10 K/min heruntergekühlt. Nach der Equilibrierung (5 min) wurde der Tiegel dann auf 120 °C mit einer Aufheizrate von ebenfalls 10 K/min erwärmt. Die Messung erfolgte gegen einen baugleichen, leeren Aluminiumtiegel als Referenz. Das System wurde während der Messung mit Stickstoff (10 mL/min) gespült. Zur Auswertung wurden die resultierenden Kühlkurven herangezogen.

7.4.7. Dynamische Lichtstreuung

Für den Versuch wurden die Proben in neue, staubfreie zylindrische Suprasil® Quarzglasküvetten gefüllt und gemäß der Methode von Shukla *et al.* bei einer Temperatur von 20 °C und Messwinkeln zwischen 30–150° in 10°-Schritten vermessen [287]. Hierfür kam das Kompakt-Goniometer ALV/SP-86 mit Photomultiplier-Detektor zum Einsatz. Als Lichtquelle diente ein Nd:YAG-Laser ($\lambda = 532 \text{ nm}$) mit einer Leistung von 200 mW. Die mittels digitalem ALV-Korrelator (minimale Messzeit: 12,5 ns) aufgezeichneten Intensitäts-Zeit-Korrelations-Funktionen wurden mit Hilfe des CONTIN-Algorithmus ausgewertet [288, 289]. Als Brechungsindex für W/O-ME wurde der Wert 1,438 von IPP verwendet, da es die äußere Phase darstellte [358]. Für W/O-Systeme wurde als Brechungsindex der Wert 1,332 für Wasser zugrunde gelegt. Mit Hilfe des DLS-Konvertierungsprogramms DLSkonv2 wurden hydrodynamische (R_h) Radien berechnet [359].

7.4.8. HET-CAM

Die HET-CAM-Versuche wurden nach Standardprotokoll des Instituts für angewandte Dermatopharmazie e.V. durchgeführt [360]. Es wurden natürlich befruchtete Hühnereier (50–60 g) der Rasse „New Hampshire“ verwendet. Diese wurden nach dem Transport in Polyesterol-ummantelten Behältnissen über acht Tage bei 37 °C und 55 % Luftfeuchtigkeit in Paletten in einem Brutschrank bebrütet und dabei regelmäßig (alle 12 h) mit Ausnahme der letzten 24 h (9. Bruttag) gedreht. Am 10. Bruttag wurden die Eier einzeln entnommen und in Polystyrolummantelungen mikrochirurgisch bei Zimmertemperatur präpariert.

Im Bereich der Luftkammer wurde das Ei geöffnet und ein etwa kreisrundes Loch mit einem Durchmesser von 1,5 cm in den schwächer konvexen Pol mittels Präpariernadel und Pinzette geschnitten. Die äußere Eihaut wurde entfernt, um die CAM freizulegen. Nicht befruchtete Eier (ca. 10–30 %) wurden verworfen. Für die Untersuchungen wurden nur Eier verwendet, die ein gut ausgebildetes Gefäßnetz auf der CAM aufwiesen.

Pro Testpräparation wurden an jeweils sechs Eiern maximal 30 min nach dem Eröffnen je 300 μl der Probe appliziert. Dann erfolgte eine Beobachtung der Eier über insgesamt 5 min (300 s). Veränderungen der CAM in Form von Hämorrhagie (Blutungen / Extravasation von Erythrozyten), Gefäßlyse (Transparentwerden von Gefäßen) und Koagulation (Stagnieren des Blutflusses und Zeichen der intravasalen Gerinnung) wurden währenddessen hinsichtlich des zeitlichen Auftretens, sowie des Schweregrades am Ende der Beobachtungszeit dokumentiert. Der Irritationsscore (IS) wurde mit Hilfe von Gleichung 3 (siehe Seite 46) ermittelt, um die Schwere des irritativen Potentials zu bewerten.

Das Ergebnis wurde anhand der folgenden Grenzwerte bewertet: $IS \leq 0,9$ kein Hinweis auf irritatives Potential, $IS \leq 4,9$ leichtes irritatives Potential, $IS \leq 8,9$ mäßiges irritatives Potential, $IS > 9$ starkes irritatives Potential [304, 307]. Als Referenzsubstanzen wurden im

Test steriles Wasser (ad injectionem) und Natriumlaurylsulfatlösung (1 %) (SLS) einbezogen. Der Versuchsansatz wurde nur als valide angesehen, wenn die Negativkontrolle (Aqua ad injectionem) einen $IS \leq 1$ und die Positivkontrolle (SLS-Lösung) einen $IS > 10$ und < 19 aufwies.

7.5. *ex vivo* Penetrationsuntersuchungen

Die Penetrationsexperimente wurden an der Diffusionszelle nach FRANZ an exzidiierter Humanhaut durchgeführt. Hierfür wurden die entfernten Gewebestücke zunächst mit isotonischer Kochsalzlösung gereinigt und das subkutane Fettgewebe vollständig entfernt. Anschließend erfolgte das Ausstanzen kreisrunder Segmente ($d=20\text{ mm}$; $A=3,1416\text{ cm}^2$). Diese wurden einzeln in Aluminiumfolie eingewickelt bei -20 °C gelagert. Eine Übersicht über die in den Penetrationsexperimenten verwendete Haut ist dem Anhang F: Übersicht über die Penetrationsdaten ab Seite 141 zu entnehmen. Die experimentelle Durchführung der Versuche ($n=3$), inklusive dem Aufbau der Diffusionszelle [310] ist in Abbildung 55 dargestellt.

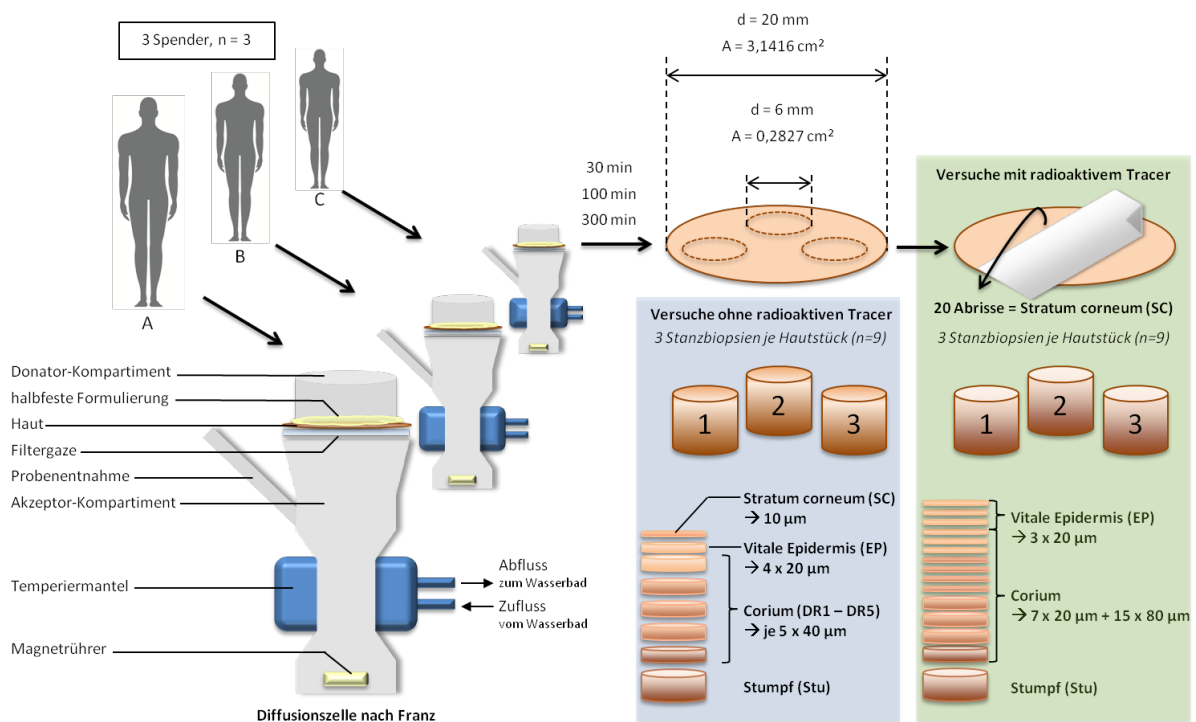


Abbildung 55: Schematische Darstellung der Versuchsanordnung für die Penetrationsversuche ($n=3$) mit radioaktivem Tracer (grün) und ohne radioaktiven Tracer (blau)

Für die Durchführung der Penetrationsversuche wurde die Haut aufgetaut und kondensierte Flüssigkeit mittels Wattetupfer (Tu) entfernt. Das Akzeptorgefäß der Franz-Zelle wurde mit 20 mL Akzeptorflüssigkeit gefüllt und dann mittels Wasserbad mit Umwälzthermostat auf 32 °C temperiert. Nach Auflegen einer Filtergaze, auf das Akzeptorgefäß wurde darauf das Hautstück platziert, sodass die dermale Seite in Kontakt mit der Akzeptorflüssigkeit stand. Zuvor wurden je 20 mg Creme beziehungsweise 20 µL ME auf die Haut aufgetragen. Um die Dicke der Diffusionsschicht möglichst gering zu halten, wurde das Akzeptormedium

während des Versuchs kontinuierlich mittels Magnetrührer bewegt. Zum Schutz vor Verdunstung wurde eine Glasabdeckung lose aufgelegt. Durch dieses Vorgehen können Okklusionseffekte ausgeschlossen werden.

Nach Ablauf der Versuchszeit (30, 100 oder 300 min) wurde das Hautstück entnommen und die auf der Hautoberfläche verbliebene Formulierung mittels Wattetupfer entfernt. Die Aufarbeitung der Proben unterschied sich bei den Penetrationsversuchen mit radioaktivem Peptidmaterial gegenüber den Versuchen ohne radioaktive Markierung.

7.5.1. Penetrationsuntersuchungen mit radioaktiv markiertem Peptidmaterial

Für die Penetrationsversuche mit den Peptiden GEKG, Pal-GEKG, PKEK und Pal-PKEK wurde jeweils radioaktiv markiertes Peptidmaterial verwendet. Die Art der Markierung, sowie die Eigenschaften der radioaktiven Peptide (spezifische Aktivität, Konzentration), sowie die eingesetzten Mengen im Versuch sind in Anhang D: Übersicht über das verwendete radioaktiv markierte Material, Seite 136 dargestellt. Die radioaktive Gebrauchslösung wurde jeweils vor Versuchsbeginn auf 20 mg O/W-Emulsion beziehungsweise 20 µl ME gegeben und der Ansatz stehen gelassen, damit das Lösungsmittel verdunstet. Anschließend wurde der Tracer untergemischt.

Als Akzeptorflüssigkeit wurde PBS, pH 7,4 verwendet, um physiologische Bedingungen nachzuempfinden. Diese wurde durch Lösen von 8 g Natriumchlorid, 0,2 g Kaliumchlorid, 1,44 g Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat und 0,2 g Kaliumdihydrogenphosphat in 1 L bidestilliertem Wasser hergestellt. Der pH-Wert wurde mittels 1-molarer Salzsäure und 1-molarer Natronlauge eingestellt.

Zur Aufbereitung der Haut nach Versuchsende wurde diese auf eine Polystyrol-Platte fixiert und eine Schablone mit einer kreisförmigen Aussparung ($A=2,0106 \text{ cm}^2$, $d=1,6 \text{ cm}$) aufgebracht. Von dem freiliegenden Bereich wurde das SC mittels Abrissmethode (Tape Stripping) entfernt. Dafür wurden 20 Tesafilmabrisse entnommen und je zwei Abrisse zusammen in ein Szintillationsmessgefäß überführt. Im weiteren Verlauf wurden von der Haut drei Stanzbiopsien ($A=0,2827 \text{ cm}^2$, $d=0,6 \text{ cm}$) mit Hilfe einer Kromayer Stanze entnommen und diese mittels Gefriermikrotom bei -40 °C horizontal in die einzelnen Hautschichten geschnitten. Es wurden zehn Schnitte mit je 20 µm und 15 Schnitte mit je 80 µm Dicke angefertigt. Das verbleibende Hautstück wird als Stumpf bezeichnet.

Für die Analytik mittels Flüssigkeitsszintillation wurden die Proben, wie in Tabelle 20 angegeben, aufbereitet. Als Szintillator für Tupfer, SC-Abrisse, Hautschnitte und Stumpf diente die PPO-POPOP-Lösung in Toluol (siehe 7.1.2. Flüssigkeitsszintillationsmessung, Seite 94). Für wässrige Lösungen wurde Hionic-Fluor als Szintillator verwendet.

Tabelle 20: Probenaufbereitungsschema für die Flüssigkeitsszintillationsmessung

Probe	Probenaufbereitung	Gefäß
Tupfer	1 mL MeOH + 2 mL Szintillator	Pico Glass Vial (6 mL)
SC-Abrisse	4 mL MeOH + 2 mL Szintillator	Econo Glass Vial (20 mL)
Hautschnitte	Inkubation in 100 µL Soluene® für 12 h, dann 1 mL MeOH + 1 mL Szintillator	Pico Glass Vial (6 mL)
Stumpf	Inkubation in 500 µL Soluene® für 12 h, dann 1 mL MeOH + 2 mL Szintillator	Pico Glass Vial (6 mL)
Gaze	20 mL Hionic-Fluor als Szintillator	Econo Glass Vial (20 mL)
Akzeptor	20 mL Hionic-Fluor als Szintillator	Econo Glass Vial (20 mL)

Querschnittsproben des verwendeten Hautmaterials wurden im Voraus mikroskopisch untersucht und die Dicke der vitalen Epidermis und des Coriums bestimmt. Da die durchschnittliche Dicke der vitalen Epidermis 62 µm betrug, wurden die ersten drei Hautschnitte (60 µm) diesem Kompartiment zugeordnet. Die übrigen Hautschnitte wurden der Dermis zugeordnet. Alle Schnitte wurden einzeln analysiert.

7.5.2. Penetrationsuntersuchungen ohne radioaktiv markiertes Peptidmaterial

Bei den Penetrationsversuchen ohne radioaktives Peptidmaterial wurden die drei Stanzbiopsien ($A = 0,2827 \text{ cm}^2$, $d = 0,6 \text{ cm}$) direkt nach Entnahme der Haut von der Franz-Zelle gewonnen. Analog zu den Versuchen mit radioaktivem Material wurden die Stanzen mittels Gefriermikrotom bei -40 °C in die einzelnen Hautsegmente geschnitten. Allerdings wurde ein anderes Schnittschema verwendet, das in Tabelle 21 dargestellt ist. Weiterhin sind die übrigen Proben und die jeweiligen Extraktionsvolumina darin aufgeführt.

Tabelle 21: Aufbereitung der Penetrationsproben im Versuch ohne radioaktives Peptidmaterial

Probe / Hautsegment	Medium	Extraktionsvolumen
nicht penetrierter Anteil	Tupfer	2,0 mL
SC	1 Schnitt à 10 µm	0,3 mL
vitale Epidermis (EP)	4 Schnitt à 20 µm	0,3 mL
Dermis 1-5 (DR 1-5)	jeweils 5 Schnitt à 40 µm	0,1 mL
Stumpf (Stu)	verbleibendes Hautstück	0,1 mL
permeierter Anteil	Filtergaze	2,0 mL
permeierter Anteil	Akzeptorflüssigkeit (Ak)	direkt vermessen

Die zum gleichen Hautsegment gehörenden Schnitte wurden in 1,5 mL (SC und EP) beziehungsweise 0,5 mL (DR1, DR2, DR3, DR4, DR5, Stu) Eppendorf Safe-Lock Gefäße überführt. Das Akzeptormedium wurde in ein dicht verschließbares Gefäß gefüllt und Tupfer, sowie Gaze in Probenröhrchen mit Schraubkappe gelagert. Alle Proben wurden bis zur Aufarbeitung und Vermessung mittels LC-MS bei -20 °C tiefgefroren. Der Zeitraum bis zur Aufarbeitung der Proben wurde auf maximal vier Tage begrenzt, um einen möglichen Peptidabbau in Gegenwart von Hautbestandteilen zu minimieren.

Tabelle 22: Übersicht über die verwendeten Extraktionsmittel

Peptid	Extraktionsmittel für die Formulierungen (Gehaltsbestimmung und Tupfer)	Extraktionsmittel für Hautprobe
LPA	MeOH/H ₂ O (90/10) (V/V)	MeOH/H ₂ O (90/10) (V/V)
LPBG	BC: MeOH ME: MeOH/H ₂ O (90/10) (V/V)	MeOH/H ₂ O (90/10) (V/V)
LPT	MeOH	MeOH

Tupfer, Gaze und die Hautproben wurden für die Analytik, wie in Tabelle 21 beschrieben, mit den in Tabelle 22 aufgeführten Extraktionsmitteln versetzt und über Nacht auf dem Laborschüttler bei 200 U/min bewegt. Die Hautproben wurden anschließend 5 min bei 14500 rpm zentrifugiert und in HPLC-Gewindeflaschen mit Insert und Schraubkappe, inklusive Dichtscheibe, abgefüllt. Die Gazeextrakte wurden zuvor spritzenfiltriert. Die Tupferextrakte wurden 1:10 mit dem jeweiligen Extraktionsmittel verdünnt und ebenfalls in HPLC-Gewindeflaschen abgefüllt. Das Akzeptormedium (Wasser) wurde zunächst ohne weitere Aufarbeitung der Analytik zugeführt.

Lag die Konzentration im Gazeextrakt und im Akzeptormedium unterhalb der LOQ, wurden die Proben unter Stickstoffbegasung bei 40 °C eingedampft und in geeignetem Extraktionsmittelvolumen resolvatisiert. War die Konzentration größer als der Kalibrierbereich oder traten in den Chromatogrammen überlagernde Signale von Matrixbestandteilen auf, wurde die Probe verdünnt. Die jeweilige Aufbereitung der Gazeextrakte und Akzeptoren ist in Tabelle 23 dargestellt.

Tabelle 23: Aufbereitung der Gazeextrakte und Akzeptormedien im Penetrationsversuch ohne radioaktives Peptidmaterial

Versuch	Gazeextrakte	Akzeptormedium
LPA in BC	750 µL eingedampft, in 250 µL resolvatisiert	1000 µL eingedampft, in 300 µL resolvatisiert
LPA in ME	1:1 verdünnt	direkt vermessen
LPBG in BC	900 µL eingedampft, in 300 µL resolvatisiert	1000 µL eingedampft, in 300 µL resolvatisiert
LPBG in ME	1:1 verdünnt	1:1 verdünnt
LPT in BC	800 µL eingedampft, in 400 µL resolvatisiert	1000 µL eingedampft, in 300 µL resolvatisiert
LPT in ME	direkt vermessen	direkt vermessen

7.6. Auswertung und Statistik

Die Daten der Penetrationsuntersuchungen wurden mit einfaktorieller Varianzanalyse (one-way ANOVA) statistisch ausgewertet [361]. Anschließend wurde zum Vergleich der Daten der Dunnett's Test als Post-Hoc Analyse durchgeführt, der Unterschiede zwischen Mittelwerten von Kontrollen gegen mehrere alternative Behandlungen nachweist [362]. Unterschiede mit $p < 0,05$ wurden als statistisch signifikant bewertet, die mit $p < 0,01$ als statistisch hochsignifikant.

7.7. Geräte und Hilfsmittel

7.7.1. Laborgeräte

Abdampfgerät

Analysenwaage AG 204 Delta Range® (METTLER TOLEDO GmbH, Gießen, D)

Brutschrank (HET-CAM)

Dynamisches Differenz-Kalorimeter DSC 200 (Netzsch-Gerätebau GmbH, Selb, D)

Eppendorf Research Pipetten (Eppendorf AG, Hamburg, D)

Flüssigkeitsszintillationszähler WINSPECTRAL 1414 (Wallac-ADL-GmbH, Freiburg, D)

Franz-Diffusionszellen (Crown Glass Company INC, Somerville, New York, USA)

Gefriermikrotom Modell: 1206 (Jung Frigomobil, Heidelberg, D)

HPLC: Agilent HP 1100 Series mit Autosampler, binärer Hochdruckgradientenpumpe und UV-DAD (Agilent Technologies, Waldbronn, D)

HPLC: SpectraSystem P 4000 und Autosampler AS 3000 (Thermo Electron GmbH, Karlsruhe, D)

HPLC: Waters Delta 600 mit Waters 600 Controller Pumpe, Autosampler Waters 717 plus, Säulenthermostat und Waters 2996 Photodiodenarray-Detektor (Waters GmbH, Eschborn, D)

HPLC- Säule 125/4 Nucleosil® 300-7 Protein C-4 (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, D)

HPLC- Säule HILIC YMC 150 × 3 mm ID, 12 nm S-5 µm (YMC Europe GmbH, Dinslaken, D)

HPLC- Säule Trentec Reprosil-Pur 120 C18-AQ 3 µm column, 125 mm × 2.0 mm mit Vorsäule 10 × 2.0 mm (Trentec-Analysentechnik, Gerlingen, D)

HPLC-Säule YMC ODS AQ 125 × 2,1 mm ID, 20 mm S-3 µm (YMC Europe GmbH, Dinslaken, D)

Inkubator: Spezialanfertigung (Mechanische Werkstatt, Institut für Pharmazie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle, D)

Ionenfallenspektrometer Finnigan LCQ mit ESI-Interface (Thermo Fisher, Egelsbach, D)

Kapillarelektrophorese: BECKMAN/COULTER P/ACE MDQ Molecular Characterization System (Brea, USA)

Kompakt-Goniometer ALV/SP-86 (ALV-Laser Vertriebsgesellschaft, Langen, D)

Konduktometer Cyberscan Con 11 (Eutech Instruments Europe B.V. – Part of Thermo Fisher Scientific, Landsmeer, NL)

Kromayer Stanze (Typ: 1006; Stiefel-Laboratorium, Offenbach, D)

Magnetrührer Typ R3T Variomag® Elektronikrührer Poly 15 (MLW Rührerätewerk Medingen, Freital, D)

Mixer mit Kreuzklinge: Mr. Magic, Modell 3186-1 (DS-Produkte GmbH, Gallin, D)

Nd:YAG-Laser (ADLAS GmbH, Weil im Schönbuch, D)

Peltiersystem (Anton Paar GmbH, Graz, A)

pH 1120 Portables pH-Messgerät (METTLER TOLEDO GmbH, Gießen, D)

pH-Elektrode Knick SE 101 (Knick Elektronische Messgeräte GmbH & Co. KG, Berlin, D)

Polarisationsmikroskop (Zeiss Axiolab Pol, Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena, D)

Rotationsviskosimeter mit Zylindermesszelle und Doppelspalt Typ MCR 501 (Anton Paar GmbH, Graz, A)

Schüttelapparat mit Hin- und Herbewegung GFL® 3006 (GFL Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel, D)

Tiefkühlschrank

Ultraschallreinigungsgerät Sonorex Super RK 255 H (BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Berlin, D)

Wasserbad mit Umwälzthermostat (Typ: B3/DC1; Haake, Karlsruhe, D)

Vortex-Schüttler IKA® MS 2 Minishakers (IKA® Werke GmbH & Co. KG, Staufen, D)

Vortex-Schüttler neoLab® 7-2020 (neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH, Heidelberg)

Vortex-Schüttler REAX top (Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, D)

Zentrifuge mini Spin plus (Eppendorf AG, Hamburg, D)

Zentrifuge VWR 1814 (VWR International GmbH, Darmstadt, D)

7.7.2. Verbrauchsmaterialien

Eppendorf Safe-Lock Tubes 1,5 mL (Eppendorf AG, Hamburg, D)

Eppendorf LowBind Tubes 2,0 mL (Eppendorf AG, Hamburg, D)

Filter Discs, Ø 110 mm (Munktell & Filtrak GmbH, Bärenstein, D)

Gaze Sartolon Polyamid, Porengröße 0,45 µm (Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen, D)

HPLC-Filter-Vials: Mini-UniPrep™ Syringeless Filters, 0,45 µm RC (GE Healthcare UK Limited, Buckinghamshire, UK)

HPLC-Gewindeflaschen 1,5 mL, braun, 32x11,6 mm (VWR International GmbH, Darmstadt, D)

Injekt® Einmalspritzen, 2 mL und 5 ml (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, D)

Micro-Inserts 0,15 mL, 5x31 mm für HPLC-Gewindeflaschen (VWR International GmbH, Darmstadt, D)

Parafilm M (Pechiney Plastic Packaging, Chicago, USA)

Petrischale mit Nocken 35x10 mm (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D)

Pipettenspitzen Standard UNIVERSAL 1-100 µL und 100-1000 µL (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D)

Probenröhrchen mit Schraubkappe (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D)

Protein LoBind Tubes 2 mL (Eppendorf AG, Hamburg, D)

Quarzkapillare für Kapillarelektrophorese (Chromatographie Service GmbH, Langerwehe, D)

Quarzküvette Suprasil® (zylindrisch), d = 10 mm (Hellma, Müllheim, D)

Rotilabo®-Reagenzgläser Ø 16 mm , 100 mm (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D)

Schraubkappe 8 mm für HPLC-Gewindeflasche (VWR International GmbH, Darmstadt, D)

Septen/Dichtscheibe Ø 8 mm, Dicke 1,3 mm, Härte 45° (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D)

Spritzenvorsatzfilter PERFECT Flow® PTFE 0,45 µm (WiCom GmbH, Heppenheim, D)

Szintillationsmessgefäß: Econo Glass Vial (Canberra-Packard GmbH, Dreieich, D)

Szintillationsmessgefäß: Pico Glass Vial (Canberra-Packard GmbH, Dreieich, D)

Wattetupfer 150 mm lang (neo lab, Heidelberg, D)

7.7.3. Biologisches Material

Die für die HET-CAM-Versuche verwendeten Hühnereier (50-60 g) der Rasse „New Hampshire“ wurden am Legetag durch das Nutztierwissenschaftliche Zentrum der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg bereitgestellt.

Die verwendete Humanhaut (Mamma-, Ohr-, Nabel-, Rücken- und juvenile Vorhaut) wurde von der Universitätsklinik und Poliklinik für Dermatologie und Venerologie, Abteilung Experimentelle Dermatologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg zur Verfügung gestellt.

7.8. Chemikalien

[³ H]-Palmitoyl-GEKG-OH	RC Tritec AG, Teufen, CH
[³ H]-Palmitoyl-PKEK-OH	RC Tritec AG, Teufen, CH
[³ H]-PKEK-OH	RC Tritec AG, Teufen, CH
[Gly-1- ¹⁴ C]-GEKG	Perkin Elmer Life and Analytical Science Inc., Boston, USA
1,3-Butandiol	Fagron GmbH, Barsbüttel, D
Aceton	Merck KGaA, Darmstadt, D
Acetonitril	HiPerSolv CHROMANORM, VWR International, Leuven, B
Aerosil 200	Degussa AG, Frankfurt (Main), D
Aluminiumstearat	Caesar & Loretz GmbH, Hilden, D
Ameisensäure	Merck KGaA, Darmstadt, D
Ammoniumacetat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Basiscreme DAC	Bombastus-Werke AG, Freital, D
Chinidin	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
Citronensäure, wasserfrei	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
Dimethylsulfoxid	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Merck KGaA, Darmstadt, D
GEKG	Bachem AG, Bubendorf, CH
Gelatine, weiß, gemahlen	RUF Lebensmittelwerk KG, Quakenbrück, D
Glycerin	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
Hionic Fluor	Canberra-Packard GmbH, Dreieich, D
Hydriol PGC.3	Hydriol AG, Wettingen, CH
Hydriol PGO	Hydriol AG, Wettingen, CH
Hydrocortisonbutyrat (mikron.)	Synopharm GmbH, Barsbüttel, D
ISOLAN® GO 33	Evonik Industries AG, Essen, D
ISOLAN® GPS	Evonik Industries AG, Essen, D
ISOLAN® PDI	Evonik Industries AG, Essen, D
Isopropylpalmitat	Cognis GmbH, Düsseldorf, D
LPA	EMC microcollections GmbH, Tübingen, D
LPBG	EMC microcollections GmbH, Tübingen, D

7. Experimenteller Teil

LPT	EMC microcollections GmbH, Tübingen, D
Methanol (Penetration, radioaktiv)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
Methanol	HiPerSolv CHROMANORM, VWR International, Leuven, B
Mometasonfuroat	Hermal, Reinbeck, D
Natriumazid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Natriumborat	Merck KGaA, Darmstadt, D
Natriumhydroxid	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
Pal-GEKG	Bachem AG, Bubendorf, CH
Pal-PKEK	Bachem AG, Bubendorf, CH
Phosal® 50 SA+	PHOSPHOLIPID GmbH, Köln, D
Phosal® 53 MCT	PHOSPHOLIPID GmbH, Köln, D
Phospholipon® 90 G	PHOSPHOLIPID GmbH, Köln, D
PKEK	Bachem AG, Bubendorf, CH
POPOP	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
PPO	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
Salzsäure	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
Soluene®	Canberra-Packard GmbH, Dreieich, D
Soluphor® P	BASF, Ludwigshafen, D
Span 80	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
TEGO® Care PL 4	Evonik Industries AG, Essen, D
TEGO® SMO V	Evonik Industries AG, Essen, D
TEGOSOFT® DC	Evonik Industries AG, Essen, D
TEGOSOFT® P	Evonik Industries AG, Essen, D
Toluol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
Wasser, gereinigt	Hausleitung des Instituts für Pharmazie der Martin-Luther- Universität Halle-Wittenberg
Weißes Wachs	Fagron GmbH, Barsbüttel, D

8. Literatur

- [1] Zhang, L. und Falla, T. J.: Cosmeceuticals and peptides, *Clin Dermatol* 27 (5) (2009) 485-94
- [2] Lupo, M. P. und Cole, A. L.: Cosmeceutical peptides, *Dermatol Ther* 20 (5) (2007) 343-9
- [3] Gorouhi, F. und Maibach, H. I.: Role of topical peptides in preventing or treating aged skin, *Int J Cosmetic Sci* 31 (2009) 327-345
- [4] Elias, P. M.: Epidermal Lipids, Barrier Function, and Desquamation, *J Invest Dermatol* 80 (Suppl) (1983) 44s-49s
- [5] Landmann, L.: Die Permeabilitätsbarriere der Haut, *Pharmazie in unserer Zeit* 20 (4) (1991) 155-163
- [6] Neubert, R. H. H., Wohlrab, W. A. und Marsch, W.: Dermatopharmazie: Vehikel - Wirkstoffe - Pharmakologie, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart (2001)
- [7] Wertz, P. W., Swartzendruber, D. C., Kitko, D. J., Madison, K. C. und Downing, D. T.: The Role of the Corneocyte Lipid Envelopes in Cohesion of the Stratum Corneum, *Journal of Investigative Dermatology* 93 (1) (1989) 169-172
- [8] Elias, P. M., Gruber, R., Crumrine, D., Menon, G., Williams, M. L., et al.: Formation and functions of the corneocyte lipid envelope (CLE), *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1841 (3) (2014) 314-318
- [9] Neubert, R. H. H. und Wepf, R.: Stratum corneum - Struktur und Morphologie einer Barriere, *Pharmazeutische Zeitung* 152 (2007) 1506-1513
- [10] Uitto, J., Olsen, D. R. und Fazio, M. J.: Extracellular-Matrix of the Skin - 50 Years of Progress, *J Invest Dermatol* 92 (4) (1989) S61-S77
- [11] Frantz, C., Stewart, K. M. und Weaver, V. M.: The extracellular matrix at a glance, *J Cell Sci* 123 (24) (2010) 4195-4200
- [12] Thews, G., Mutschler, E. und Vaupel, P.: Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mgH, Stuttgart (1999)
- [13] Barry, B. W.: Novel mechanisms and devices to enable successful transdermal drug delivery, *Eur J Pharm Sci* 14 (2) (2001) 101-114
- [14] Benson, H. A. E., Caccetta, R., Chen, Y., Kearns, P. und Toth, I.: Transdermal delivery of a tetrapeptide: Evaluation of passive diffusion, *Lett Pept Sci* 10 (5-6) (2003) 615-620
- [15] Barry, B. W.: Skin Penetrations Enhancers - The Chemical Approach, 119-128 in: *Dermal and Transdermal Drug Delivery: New Insights and Perspectives*, (ed Gurny, R. and Teubner, A.), Band 31, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart (1993)
- [16] Barry, B. W.: Mode of Action of Penetration Enhancers in Human Skin, *J Control Release* 6 (1987) 85-97
- [17] Cullander, C. und Guy, R. H.: (D) Routes of Delivery: Case-Studies: (6) Transdermal Delivery of Peptides and Proteins, *Adv Drug Deliver Rev* 8 (2-3) (1992) 291-329
- [18] Kerscher, M.: Funktion und Aufbau der Haut, 1-24 in: *Dermatocosmetik*, (ed 2, Steinkopff Verlag, Heidelberg) (2009)
- [19] Lademann, J., Richter, H., Schanzer, S., Knorr, F., Meinke, M., et al.: Penetration and storage of particles in human skin: Perspectives and safety aspects, *Eur J Pharm Biopharm* 77 (3) (2011) 465-468
- [20] Scheuplein, R. J.: Mechanism of Percutaneous Absorption: II. Transient Diffusion and the Relative Importance of Various Routes of Skin Penetration, *J Invest Dermatol* 48 (1) (1967) 79-88

- [21] Trommer, H. und Neubert, R. H. H.: Overcoming the stratum corneum: The modulation of skin penetration - A review, *Skin Pharmacol Phys* 19 (2) (2006) 106-121
- [22] Ziegenmeyer, J.: Biopharmazeutische Aspekte bei der Anwendung von Dermatika, 243-307 in: *Dermatika: Therapeutischer Einsatz, Pharmakologie und Pharmazie*, (ed Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart (1992)
- [23] Bos, J. D. und Meinardi, M. M. H. M.: The 500 Dalton rule for the skin penetration of chemical compounds and drugs, *Exp Dermatol* 9 (3) (2000) 165-169
- [24] Abraham, M. H., Chadha, H. S. und Mitchell, R. C.: The Factors that Influence Skin Penetration of Solutes, *J. Pharm. Pharmacol.* 47 (1) (1995) 8-16
- [25] Cronin, M. T. D., Dearden, J. C., Moss, G. P. und Murray-Dickson, G.: Investigation of the mechanism of flux across human skin in vitro by quantitative structure-permeability relationships, *Eur J Pharm Sci* 7 (4) (1999) 325-330
- [26] Pugh, W. J., Roberts, M. S. und Hadgraft, J.: Epidermal permeability - Penetrant structure relationships .3. The effect of hydrogen bonding interactions and molecular size on diffusion across the stratum corneum, *Int J Pharm* 138 (2) (1996) 149-165
- [27] Roberts, M. S., Pugh, W. J. und Hadgraft, J.: Epidermal permeability: Penetrant structure relationships .2. The effect of H-bonding groups in penetrants on their diffusion through the stratum corneum, *Int J Pharm* 132 (1-2) (1996) 23-32
- [28] Kelder, J., Grootenhuis, P. D. J., Bayada, D. M., Delbressine, L. P. C. und Ploemen, J. P.: Polar molecular surface as a dominating determinant for oral absorption and brain penetration of drugs, *Pharmaceut Res* 16 (10) (1999) 1514-1519
- [29] van de Waterbeemd, H. und Kansy, M.: Hydrogen-Bonding Capacity and Brain Penetration, *Chimia* 46 (7-8) (1992) 299-303
- [30] Palm, K., Luthman, K., Ungell, A. L., Strandlund, G. und Artursson, P.: Correlation of drug absorption with molecular surface properties, *J Pharm Sci-U.S.* 85 (1) (1996) 32-39
- [31] Zakeri-Milani, P., Tajerzadeh, H., Islambolchilar, Z., Barzegar, S. und Valizadeh, H.: The relation between molecular properties of drugs and their transport across the intestinal membrane, *DARU* 14 (4) (2006) 164-171
- [32] Pranitha, A. und Lakshmi, P. K.: Towards a Correlation between Polar Surface Area of Drugs with Ex-vivo Transdermal Flux Variability, *Iranian Journal of Pharmaceutical Sciences* 10 (2) (2014) 47-60
- [33] Ates, G., Steinmetz, F. P., Doktorova, T. Y., Madden, J. C. und Rogiers, V.: Linking existing in vitro dermal absorption data to physicochemical properties: Contribution to the design of a weight-of-evidence approach for the safety evaluation of cosmetic ingredients with low dermal bioavailability, *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 76 (2016) 74-78
- [34] Scientific Committee on Consumer Safety: The SCCS's Notes of Guidance for the Testing of Cosmetic Substances and their Safety Evaluation [SCCS/1564/15], Version: 9th Revision, (2016)
- [35] Benson, H. A. E. und Namjosh, S.: Proteins and peptides: Strategies for delivery to and across the skin, *J Pharm Sci-U.S.* 97 (9) (2008) 3591-3610
- [36] Badenhorst, T., Svirskis, D. und Wu, Z.: Pharmaceutical Strategies for the Topical Dermal Delivery of Peptides/Proteins for Cosmetic and Therapeutic Applications, *Austin J Pharmacol Ther.* 2 (6) (2014) 1036
- [37] Kalluri, H. und Banga, A. K.: Transdermal Delivery of Proteins, *Aaps Pharmscitech* 12 (1) (2011) 431-441
- [38] Schuetz, Y. B., Naik, A., Guy, R. H. und Kalia, Y. N.: Emerging strategies for the transdermal delivery of peptide and protein drugs, *Expert Opin Drug Deliv* 2 (3) (2005) 533-546

- [39] Amsden, B. G. und Goosen, M. F. A.: Transdermal Delivery of Peptide and Protein Drugs - an Overview, *Aiche J* 41 (8) (1995) 1972-1997
- [40] Antosova, Z., Mackova, M., Kral, V. und Macek, T.: Therapeutic application of peptides and proteins: parenteral forever?, *Trends Biotechnol* 27 (11) (2009) 628-635
- [41] Bruno, B. J., Miller, G. D. und Lim, C. S.: Basics and recent advances in peptide and protein drug delivery, *Ther Deliv* 4 (11) (2013) 1443-1467
- [42] Herwadkar, A. und Banga, A. K.: Kapitel 4: Transdermal Delivery of Peptides and Proteins, 69-86 in: Peptide and Protein Delivery, (ed Van der Walle, C.), Elsevier Inc., London (2011)
- [43] Münch, S., Wohlrab, J. und Neubert, R. H. H.: Dermal and transdermal delivery of pharmaceutically relevant macromolecules, *Eur J Pharm Biopharm* 119 (Supplement C) (2017) 235-242
- [44] Caccetta, R., Blanchfield, J. T., Harrison, J., Toth, I. und Benson, H. A. E.: Epidermal penetration of a therapeutic peptide by lipid conjugation; Stereo-selective peptide availability of a topical diastereomeric lipopeptide, *Int J Pept Res Ther* 12 (3) (2006) 327-333
- [45] Foldvari, M., Attah-Poku, S., Hu, J. P., Li, Q. M., Hughes, H., et al.: Palmitoyl derivatives of interferon alpha: Potential for cutaneous delivery, *J Pharm Sci-Us* 87 (10) (1998) 1203-1208
- [46] Johnson, W. J. und Heldreth, B.: Safety Assessment of Tripeptide-1, Hexapeptide-12, their Metal Salts and Fatty Acyl Derivatives, and Palmitoyl Tetrapeptide-7 as Used in Cosmetics, Version: Final Report 30.06.2014, CIR Expert Panel Washington, DC (2014) 1-30
- [47] Lautenschläger, H.: Peptide - mehr als Botenstoffe und Hormone, *Kosmetik International* 9 (2007) 14-17
- [48] Lintner, K.: Promoting production in the extracellular matrix without compromising barrier, *Cutis* 70 (6) (2002) 13-16
- [49] Muranishi, S., Sakai, A., Yamada, K., Murakami, M., Takada, K., et al.: Lipophilic Peptides - Synthesis of Lauroyl Thyrotropin-Releasing-Hormone and Its Biological-Activity, *Pharmaceut Res* 8 (5) (1991) 649-652
- [50] Yamamoto, A., Setoh, K., Murakami, M., Shironoshita, M., Kobayashi, T., et al.: Enhanced transdermal delivery of phenylalanyl-glycine by chemical modification with various fatty acids, *Int J Pharm* 250 (1) (2003) 119-128
- [51] Abla, N., Naik, A., Guy, R. H. und Kalia, Y. N.: Effect of charge and molecular weight on transdermal peptide delivery by iontophoresis, *Pharmaceut Res* 22 (12) (2005) 2069-2078
- [52] Donnelly, A., Kellaway, I. W., Farr, S. J., Taylor, G., Tudball, N., et al.: The influence of lipophilicity upon the nasal absorption of a series of hexapeptides, *Int J Pharm* 135 (1-2) (1996) 191-197
- [53] Geotti-Bianchini, P., Moretto, A., Peggion, C., Beyrath, J., Bianco, A., et al.: Replacement of Ala by Aib improves structuration and biological stability in thymine-based alpha-nucleopeptides, *Org Biomol Chem* 8 (6) (2010) 1315-1321
- [54] Kessler, H., Chatterjee, J., Doedens, L., Operrer, F., Biron, E., et al.: New Perspective in Peptide Chemistry by N-Alkylation, *Adv Exp Med Biol* 611 (2009) 229-231
- [55] Pegova, A., Abe, H. und Boldyrev, A.: Hydrolysis of carnosine and related compounds by mammalian carnosinases, *Comp Biochem Phys B* 127 (4) (2000) 443-446
- [56] Werle, M. und Bernkop-Schnuerch, A.: Strategies to improve plasma half life time of peptide and protein drugs., *Amino Acids* 30 (4) (2006) 351-367

- [57] Choi, H. K., Flynn, G. L. und Amidon, G. L.: Transdermal delivery of bioactive peptides: the effect of n-decylmethyl sulfoxide, pH, and inhibitors on enkephalin metabolism and transport, *Pharmaceutical research* 7 (11) (1990) 1099-106
- [58] Lee, V. H. L.: Protease Inhibitors and Penetration Enhancers as Approaches to Modify Peptide Absorption, *J Control Release* 13 (2-3) (1990) 213-223
- [59] Engelbrecht, T. N., Schroeter, A., Hauss, T. und Neubert, R. H. H.: Lipophilic penetration enhancers and their impact to the bilayer structure of stratum corneum lipid model membranes: Neutron diffraction studies based on the example Oleic Acid, *BBA - Biomembranes* 1808 (12) (2011) 2798-2806
- [60] Engelbrecht, T. N., Deme, B., Dobner, B. und Neubert, R. H. H.: Study of the Influence of the Penetration Enhancer Isopropyl Myristate on the Nanostructure of Stratum Corneum Lipid Model Membranes Using Neutron Diffraction and Deuterium Labelling, *Skin Pharmacol Phys* 25 (4) (2012) 200-207
- [61] Williams, A. C. und Barry, B. W.: Penetration enhancers, *Adv Drug Deliver Rev* 64 (2012) 128-137
- [62] Williams, A. C. und Barry, B. W.: Penetration enhancers, *Adv Drug Deliver Rev* 56 (5) (2004) 603-618
- [63] Goebel, A. S. B., Schmaus, G., Neubert, R. H. H. und Wohlrab, J.: Dermal Peptide Delivery Using Enhancer Molecules and Colloidal Carrier Systems - Part I: Carnosine, *Skin Pharmacol Phys* 25 (6) (2012) 281-287
- [64] Kikwai, L., Babu, R. J., Prado, R., Kolot, A., Armstrong, C. A., et al.: In vitro and in vivo evaluation of topical formulations of Spantide II, *Aaps Pharmscitech* 6 (4) (2005)
- [65] Karande, P., Jain, A. und Mitragotri, S.: Discovery of transdermal penetration enhancers by high-throughput screening, *Nat Biotechnol* 22 (2) (2004) 192-197
- [66] Ruland, A., Kreuter, J. und Rytting, J. H.: Transdermal Delivery of the Tetrapeptide Hisetal (Melanotropin (6-9)) .2. Effect of Various Penetration Enhancers - in-Vitro Study across Human Skin, *Int J Pharm* 103 (1) (1994) 77-80
- [67] Bodde, H. E., Verhoef, J. C. und Ponec, M.: Transdermal Peptide Delivery, *Biochem Soc T* 17 (5) (1989) 943-945
- [68] Barry, B. W. und Bennett, S. L.: Effect of Penetration Enhancers on the Permeation of Mannitol, Hydrocortisone and Progesterone through Human-Skin, *J Pharm Pharmacol* 39 (7) (1987) 535-546
- [69] Brinkmann, I. und Muller-Goymann, C. C.: An attempt to clarify the influence of glycerol, propylene glycol, isopropyl myristate and a combination of propylene glycol and isopropyl myristate on human stratum corneum, *Pharmazie* 60 (3) (2005) 215-220
- [70] Heuschkel, S., Wohlrab, J., Schmaus, G. und Neubert, R. H. H.: Modulation of Dihydroavenanthramide D release and skin penetration by 1,2-alkanediols, *Eur J Pharm Biopharm* 70 (1) (2008) 239-247
- [71] Hoelgaard, A. und Møllgaard, B.: Dermal drug delivery - Improvement by choice of vehicle or drug derivative, *J Control Release* 2 (1985) 111-120
- [72] Kalia, Y. N., Naik, A., Garrison, J. und Guy, R. H.: Iontophoretic drug delivery, *Adv Drug Deliver Rev* 56 (5) (2004) 619-658
- [73] Chien, Y. W., Lelawongs, P., Siddiqui, O., Sun, Y. und Shi, W. M.: Facilitated Transdermal Delivery of Therapeutic Peptides and Proteins by Iontophoretic Delivery Devices, *J Control Release* 13 (2-3) (1990) 263-278

- [74] Mize, N. K., Buttery, M., Ruis, N., Leung, I., Cormier, M., et al.: Antiflammin 1 peptide delivered noninvasively by iontophoresis reduces irritant-induced inflammation in vivo, *Exp Dermatol* 6 (4) (1997) 181-185
- [75] Raiman, J., Koljonen, M., Huikko, K., Kostianen, R. und Hirvonen, J.: Delivery and stability of LHRH and Nafarelin in human skin: the effect of constant/pulsed iontophoresis, *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 21 (2-3) (2004) 371-377
- [76] Ruland, A., Rohr, U. und Kreuter, J.: Transdermal Delivery of the Tetrapeptide Hisetal (Melanotropin(6-9)) and Amino Acids - Their Contribution to the Elucidation of the Existence of an 'Aqueous Pore' Pathway, *Int J Pharm* 107 (1) (1994) 23-28
- [77] Chien, Y. W.: Systemic Delivery of Peptide-based Pharmaceuticals by Transdermal Periodic Iontotherapeutic System, 129-152 in: *Dermal and Transdermal Drug Delivery: New Insights and Perspectives*, (ed Gurny, R. and Teubner, A.), Band 31, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart (1993)
- [78] Denet, A. R., Vanbever, R. und Preat, V.: Skin electroporation for transdermal and topical delivery, *Adv Drug Deliver Rev* 56 (5) (2004) 659-674
- [79] Prausnitz, M. R., Edelman, E. R., Gimm, J. A., Langer, R. und Weaver, J. C.: Transdermal Delivery of Heparin by Skin Electroporation, *Bio-Technol* 13 (11) (1995) 1205-1209
- [80] Mitragotri, S., Blankshtein, D. und Langer, R.: Ultrasound-Mediated Transdermal Protein Delivery, *Science* 269 (5225) (1995) 850-853
- [81] Park, E. J., Werner, J. und Smith, N. B.: Ultrasound mediated transdermal insulin delivery in pigs using a lightweight transducer, *Pharmaceut Res* 24 (7) (2007) 1396-1401
- [82] Tezel, A., Sens, A. und Mitragotri, S.: Description of transdermal transport of hydrophilic solutes during low-frequency sonophoresis based on a modified porous pathway model, *J Pharm Sci-US* 92 (2) (2003) 381-393
- [83] Namjoshi, S., Chen, Y., Edwards, J. und Benson, H. A. E.: Enhanced transdermal delivery of a dipeptide by dermaporation, *Biopolymers* 90 (5) (2008) 655-662
- [84] Cormier, M., Johnson, B., Ameri, M., Nyam, K., Libiran, L., et al.: Transdermal delivery of desmopressin using a coated microneedle array patch system, *J Control Release* 97 (3) (2004) 503-511
- [85] Ito, Y., Hagiwara, E., Saeki, A., Sugioka, N. und Takada, K.: Feasibility of microneedles for percutaneous absorption of insulin, *Eur J Pharm Sci* 29 (1) (2006) 82-88
- [86] Martanto, W., Davis, S. P., Holiday, N. R., Wang, J., Gill, H. S., et al.: Transdermal delivery of insulin using microneedles in vivo, *Pharmaceut Res* 21 (6) (2004) 947-952
- [87] Zhang, S., Qiu, Y. und Gao, Y.: Enhanced delivery of hydrophilic peptides in vitro by transdermal microneedle pretreatment, *Acta Pharm Sin B* 4 (1) (2014)
- [88] Levin, G., Gershonowitz, A., Sacks, H., Stern, M., Sherman, A., et al.: Transdermal delivery of human growth hormone through RF-microchannels, *Pharmaceut Res* 22 (4) (2005) 550-555
- [89] Nelson, J. S., McCullough, J. L., Glenn, T. C., Wright, W. H., Liaw, L. H. L., et al.: Midinfrared Laser Ablation of Stratum-Corneum Enhances Invitro Percutaneous Transport of Drugs, *J Invest Dermatol* 97 (5) (1991) 874-879
- [90] Mitragotri, S.: Innovation - Current status and future prospects of needle-free liquid jet injectors, *Nat Rev Drug Discov* 5 (7) (2006) 543-548
- [91] Badkar, A. V., Smith, A. M., Eppstein, J. A. und Banga, A. K.: Transdermal delivery of interferon alpha-2B using microporation and iontophoresis in hairless rats, *Pharm Res* 24 (7) (2007) 1389-95

- [92] Bommannan, D. B., Tamada, J., Leung, L. und Potts, R. O.: Effect of Electroporation on Transdermal Iontophoretic Delivery of Luteinizing-Hormone-Releasing Hormone (Lhrh) in-Vitro, *Pharmaceut Res* 11 (12) (1994) 1809-1814
- [93] Le, L., Kost, J. und Mitragotri, S.: Combined effect of low-frequency ultrasound and iontophoresis: Applications for transdermal heparin delivery, *Pharmaceut Res* 17 (9) (2000) 1151-1154
- [94] Mitragotri, S., Ray, D., Farrell, J., Tang, H., Yu, B., et al.: Synergistic effect of low-frequency ultrasound and sodium lauryl sulfate on transdermal transport, *J Pharm Sci-Us* 89 (7) (2000) 892-900
- [95] Pillai, O. und Panchagnula, R.: Transdermal delivery of insulin from poloxamer gel: ex vivo and in vivo skin permeation studies in rat using iontophoresis and chemical enhancers, *J Control Release* 89 (1) (2003) 127-140
- [96] Srinivasan, V., Su, M. H., Higuchi, W. I. und Behl, C. R.: Iontophoresis of Polypeptides - Effect of Ethanol Pretreatment of Human Skin, *J Pharm Sci-Us* 79 (7) (1990) 588-591
- [97] Goebel, A. und Neubert, R. H. H.: Dermal peptide delivery using colloidal carrier systems, *Skin Pharmacol Phys* 21 (1) (2008) 3-9
- [98] Rawat, M., Singh, D., Saraf, S. und Saraf, S.: Lipid carriers: A versatile delivery vehicle for proteins and peptides, *Yakugaku Zasshi* 128 (2) (2008) 269-280
- [99] Witting, M., Obst, K., Friess, W. und Hedtrich, S.: Recent advances in topical delivery of proteins and peptides mediated by soft matter nanocarriers, *Biotechnol. Adv.* 33 (6) (2015) 1355-1369
- [100] Russel-Jones, G., Lee, S. R., McMenigall, K., Luke, M. und Himes, R.: Effective Topical Delivery of Peptides and Proteins Following Formulation in a Water-in-Oil Microemulsion, *Expert Opin Drug Deliv* 8 (4) (2011) 537-546
- [101] Getie, M., Wohlrab, J. und Neubert, R. H. H.: Dermal delivery of desmopressin acetate using colloidal carrier systems, *J Pharm Pharmacol* 57 (4) (2005) 423-427
- [102] Jahn, K.: Moderne galenische Zubereitungen zur dermalen Anwendung von Ciclosporin A und Mycophenolatmofetil, *Dissertation*, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle (2002)
- [103] Brown, G. L., Curtsinger, L. J., White, M., Mitchell, R. O., Pietsch, J., et al.: Acceleration of tensile strength of incisions treated with EGF and TGF-beta, *Ann Surg* 208 (6) (1988) 788-94
- [104] Guo, J. X., Ping, Q. N. und Zhang, L.: Transdermal delivery of insulin in mice by using lecithin vesicles as a carrier, *Drug Deliv* 7 (2) (2000) 113-116
- [105] Cevc, G., Gebauer, D., Stieber, J., Schatzlein, A. und Blume, G.: Ultraflexible vesicles, Transfersomes, have an extremely low pore penetration resistance and transport therapeutic amounts of insulin across the intact mammalian skin, *Biochim Biophys Acta* 1368 (2) (1998) 201-15
- [106] Foldvari, M., Badea, I., Wettig, S., Baboolal, D., Kumar, P., et al.: Topical Delivery of Interferon Alpha by Biphasic Vesicles: Evidence for a Novel Nanopathway across the Stratum Corneum, *Mol Pharmaceut* 7 (3) (2010) 751-762
- [107] Scriven, L. E.: Equilibrium Bicontinuous Structure, *Nature* 263 (5573) (1976) 123-125
- [108] Moulik, S. P. und Paul, B. K.: Structure, dynamics and transport properties of microemulsions, *Adv Colloid Interfac* 78 (2) (1998) 99-195
- [109] Attwood, D.: Microemulsions, 31-71 in: *Colloidal Drug Delivery Systems*, (ed Kreuter, J.), 66, Marcel Dekker, Inc., New York (1994)

- [110] Hoar, T. P. und Schulman, J. H.: Transparent Water-in Oil Dispersions: the Oleopathic Hydro-Micelle, *Nature (London, United Kingdom)* 152 (1943) 102-103
- [111] Heuschkel, S., Goebel, A. und Neubert, R. H. H.: Microemulsions - Modern colloidal carrier for dermal and transdermal drug delivery, *J Pharm Sci-U.S.* 97 (2) (2008) 603-631
- [112] Heuschkel, S. und Neubert, R. H. H.: Microemulsions for dermal application of drugs, *Chem-Ing-Tech* 77 (3) (2005) 239-243
- [113] Lam, A. C. und Schechter, R. S.: The Theory of Diffusion in Microemulsion, *J Colloid Interf Sci* 120 (1) (1987) 56-63
- [114] Lawrence, M. J. und Rees, G. D.: Microemulsion-based media as novel drug delivery systems, *Adv Drug Deliver Rev* 45 (1) (2000) 89-121
- [115] Prince, L. M.: Schulman's Microemulsions, 1-20 in: *Microemulsions: Theory and Practice*, (ed Prince, L. M.), Academic Press, Inc., New York (1977)
- [116] Tondre, C.: Dynamic Processes in Microemulsions, in: *Dynamics of Surfactant Self-Assemblies*, (ed Zana, R.), Surfactant Science Series, 125, CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton (2005)
- [117] Zana, R. und Lang, J.: Dynamics of Microemulsions, 153-172 in: *Microemulsions: structure and dynamics*, (ed Frigerg, S. and Bothorel, P.), CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida (1987)
- [118] Malmsten, M.: Microemulsions in Pharmaceuticals, 755-771 in: *Handbook of Microemulsion Science and Technology*, 1. Auflage (ed Kumar, P. and Mittal, K. L.), Marcel Dekker, Inc., New York (1999)
- [119] Aikens, P. A. und Friberg, S. E.: Microemulsions in Cosmetics, 773-787 in: *Handbook of Microemulsion Science and Technology*, 1. Auflage (ed Kumar, P. and Mittal, K. L.), Marcel Dekker, Inc., New York (1999)
- [120] Deckner, G.: Microemulsions Explained, Prospector Knowledge Center (2015), <http://knowledge.ulprospector.com/3118/pcc-microemulsions-explained/> [abgerufen am: 30.10.2015]
- [121] Boonme, P.: Applications of microemulsions in cosmetics, *J Cosmet Dermatol* 6 (4) (2007) 223-228
- [122] Friberg, S. E.: Micelles, Microemulsions, Liquid-Crystals, and the Structure of Stratum-Corneum Lipids, *J Soc Cosmet Chem* 41 (3) (1990) 155-171
- [123] Delgado-Charro, M. B., Iglesias-Vilas, G., Blanco-Méndez, J., López-Quintela, M. A., Marty, J. P., et al.: Delivery of a hydrophilic solute through the skin from novel microemulsion systems, *Eur J Pharm Biopharm* 43 (1) (1997) 37-42
- [124] Changez, M., Varshney, M., Chander, J. und Dinda, A. K.: Effect of the composition of lecithin/n-propanol/isopropyl myristate/water microemulsions on barrier properties of mice skin for transdermal permeation of tetracaine hydrochloride: In vitro, *Colloid Surface B* 50 (1) (2006) 18-25
- [125] Osborne, D. W., Ward, A. J. I. und O'Neill, K. J.: Microemulsions as Topical Drug Delivery Vehicles - Invitro Transdermal Studies of a Model Hydrophilic Drug, *J Pharm Pharmacol* 43 (6) (1991) 451-454
- [126] Kreilgaard, M., Pedersen, E. J. und Jaroszewski, J. W.: NMR characterisation and transdermal drug delivery potential of microemulsion systems, *J Control Release* 69 (3) (2000) 421-33
- [127] Peltola, S., Saarinen-Savolainen, R., Kiesvaara, J., Suhonen, T. M. und Urtti, A.: Microemulsions for topical delivery of estradiol, *Int J Pharm* 254 (2) (2003) 99-107

- [128] Sintov, A. C. und Botner, S.: Transdermal drug delivery using microemulsion and aqueous systems: Influence of skin storage conditions on the in vitro permeability of diclofenac from aqueous vehicle systems, *Int J Pharm* 311 (1-2) (2006) 55-62
- [129] Russell-Jones, G. und Himes, R.: Water-in-oil microemulsions for effective transdermal delivery of proteins, *Expert Opinion on Drug Delivery* 8 (4) (2011) 537-546
- [130] Wohlrab, J., Neubert, R. H. H. und Jahn, K.: Pharmaceutical Formulations comprising Cyclosporin and use thereof, Pub. No.: US008568748B2, 29.10.2013, Jagotec AG, United States (2013)
- [131] Boinpally, R. R., Zhou, S. L., Devraj, G., Anne, P. K., Poondru, S., et al.: Iontophoresis of lecithin vesicles of cyclosporin A, *Int J Pharm* 274 (1-2) (2004) 185-190
- [132] Liu, H. Z., Li, S. M., Wang, Y. J., Han, F. und Dong, Y.: Bicontinuous water-AOT/Tween85-isopropyl myristate microemulsion: A new vehicle for transdermal delivery of cyclosporin A, *Drug Dev Ind Pharm* 32 (5) (2006) 549-557
- [133] Graf, A., Ablinger, E., Peters, S., Zimmer, A., Hook, S., et al.: Microemulsions containing lecithin and sugar-based surfactants: Nanoparticle templates for delivery of proteins and peptides, *Int J Pharm* 350 (1-2) (2008) 351-360
- [134] Wohlrab, J., Neubert, R. H. und Goebel, A.: Cutaneous bioavailability of dipeptides modulate by enhancer and colloidal carrier system, *Exp Dermatol* 22 (3) (2013) E36-E36
- [135] Degim, I. T. und Celebi, N.: Controlled delivery of peptides and proteins, *Curr Pharm Design* 13 (1) (2007) 99-117
- [136] Sewald, N. und Jakubke, H.-D.: 9. Application of Peptides and Proteins, 403-425 in: Peptides: Chemistry and Biology, (ed Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim (2002)
- [137] Vlieghe, P., Lisowski, V., Martinez, J. und Khrestchatsky, M.: Synthetic therapeutic peptides: science and market, *Drug Discov Today* 15 (1-2) (2010) 40-56
- [138] Loffet, A.: Peptides as drugs: Is there a market?, *J Pept Sci* 8 (1) (2002) 1-7
- [139] Albericio, F. und Kruger, H. G.: Therapeutic peptides FOREWORD, *Future Med Chem* 4 (12) (2012) 1527-1531
- [140] Pettit, D. K. und Gombotz, W. R.: The development of site-specific drug-delivery systems for protein and peptide biopharmaceuticals, *Trends Biotechnol* 16 (8) (1998) 343-349
- [141] Ratnaparkhi, M. P., Chaudhari, S. P. und Pandya, V. A.: Peptides and Proteins in Pharmaceuticals, *International Journal of Current Pharmaceutical Research* 3 (2) (2011) 1-9
- [142] Mackay, M.: Delivery of recombinant peptide and protein drugs, *Biotechnol Genet Eng Rev* 8 (1990) 251-278
- [143] Jitendra, Sharma, P. K., Bansal, S. und Banik, A.: Noninvasive routes of proteins and peptides drug delivery, *Indian J Pharm Sci* 73 (4) (2011) 367-375
- [144] Rote Liste® online, Rote Liste® Service GmbH (2014), http://www.rote-liste.de/Online/jsearch_stoffe?WIRKSTOFF [abgerufen am: 19.02.2014]
- [145] Korting, H. C., Schöllmann, C., Stauss-Grabo, M. und Schäfer-Korting, M.: Antimicrobial Peptides and Skin: A Paradigm of Translational Medicine, *Skin Pharmacol Phys* 25 (6) (2012) 323-334
- [146] Lee, J. P., Jalili, R. B., Tredget, E. E., Demare, J. R. und Ghahary, A.: Antifibrogenic effects of liposome-encapsulated IFN-alpha 2b cream on skin wounds in a fibrotic rabbit ear model, *J Interf Cytok Res* 25 (10) (2005) 627-631

- [147] Lee, P. H. A., Rudisill, J. A., Lin, K. H., Zhang, L. J., Harris, S. M., et al.: HB-107, a nonbacteriostatic fragment of the antimicrobial peptide cecropin B, accelerates murine wound repair, *Wound Repair Regen* 12 (3) (2004) 351-358
- [148] Namjoshi, S., Caccetta, R. und Benson, H. A. E.: Skin peptides: Biological activity and therapeutic opportunities, *J Pharm Sci-U.S.* 97 (7) (2008) 2524-2542
- [149] Oren, Z., Lerman, J. C., Gudmundsson, G. H., Agerberth, B. und Shai, Y.: Structure and organization of the human antimicrobial peptide LL-37 in phospholipid membranes: relevance to the molecular basis for its non-cell-selective activity, *Biochem J* 341 (1999) 501-513
- [150] Zhang, L. J. und Falla, T. J.: Antimicrobial peptides: therapeutic potential, *Expert Opin Pharmacol Ther* 7 (6) (2006) 653-663
- [151] Pereira, P.: Kapitel 12: Peptide and Protein Application in Tissue Repair and Regeneration, 291-312 in: Peptide and Protein Delivery, (ed Van der Walle, C.), Elsevier Inc., London (2011)
- [152] Rielke, S. und Püllen-Lanckohr, C.: Regranex Gel - Einstellung des Vertriebs in Europa, Janssen-Cilag GmbH (2011), veröffentlicht unter: http://www.bfarm.de/SharedDocs/Risikoinformationen/Pharmakovigilanz/DE/RHB/2011/info-regranex.pdf?__blob=publicationFile&v=5 [abgerufen am: 24.01.2016, 19:04 Uhr]
- [153] Hsu, T. und Mitragotri, S.: Delivery of siRNA and other macromolecules into skin and cells using a peptide enhancer, *P Natl Acad Sci USA* 108 (38) (2011) 15816-15821
- [154] Kumar, S., Sahdev, P., Perumal, O. und Tummala, H.: Identification of a Novel Skin Penetration Enhancement Peptide by Phage Display Peptide Library Screening, *Mol Pharmaceut* 9 (5) (2012) 1320-1330
- [155] Kumar, S., Zakrewsky, M., Chen, M., Menegatti, S., Muraski, J. A., et al.: Peptides as skin penetration enhancers: Mechanisms of action, *J Control Release* 199 (2015) 168-178
- [156] Gennari, C. G. M., Franze, S., Pellegrino, S., Corsini, E., Vistoli, G., et al.: Skin Penetrating Peptide as a Tool to Enhance the Permeation of Heparin through Human Epidermis, *Biomacromolecules* 17 (1) (2016) 46-55
- [157] Rothbard, J. B., Garlington, S., Lin, Q., Kirschberg, T., Kreider, E., et al.: Conjugation of arginine oligomers to cyclosporin A facilitates topical delivery and inhibition of inflammation, *Nat Med* 6 (11) (2000) 1253-1257
- [158] Lupu, M. P.: Cosmeceutical peptides, *Dermatol Surg* 31 (7 Pt 2) (2005) 832-6
- [159] GenScript: Custom cosmetic peptides, http://www.genscript.de/custom_cosmetic_peptide_synthesis.html?src=footer [abgerufen am: 09.12.2014; 18.47 Uhr]
- [160] Draeos, Z. D.: From Proteins to Peptides - What They Mean to the Dermatologist, *US Dermatology Review* (2006) 1-3
- [161] Lintner, K. und Peschard, O.: Biologically active peptides: from a laboratory bench curiosity to a functional skin care product, *International Journal of Cosmetic Science* 22 (2000) 207-218
- [162] Blanes-Mira, C., Clemente, J., Jodas, G., Gil, A., Fernández-Ballester, G., et al.: A synthetic hexapeptide (Argireline) with antiwrinkle activity, *International Journal of Cosmetic Science* 24 (5) (2002) 303-310
- [163] Farwick, M., Maczkiewitz, U., Lersch, P., Falla, T., Grether-Beck, S., et al.: An ECM-derived tetrapeptide to counterbalance ECM degeneration., *Cosmet. Toiletries* 124 (6) (2009) 51-54

- [164] Pavicic, T., Liekfeld, P. und Kresken, J.: Dermokosmetik gegen Hautalterung, Version: Leitlinie der GD Gesellschaft für Dermopharmazie e. V. 01.03.2012, GD Gesellschaft für Dermopharmazie Köln (2012) 1-24
- [165] Heidl, M.: Peptides for prolonging youth, *Adv Exp Med Biol* 611 (2009) 263-264
- [166] Pickart, L. und Margolina, A.: GHK-Copper Peptide in Skin Remodeling and Anti-Aging, *SOFW-Journal* 136 (6) (2010) 2-9
- [167] Byrne, A. J., Al-Bader, T., Kerrigan, D., Hickey, S., Laloef, A., et al.: Synergistic action of a triple peptide complex on an essential extracellular matrix protein exhibits significant anti-aging benefits, *J Cosmet Dermatol* 9 (2) (2010) 108-116
- [168] Harris, S. M., Falla, T. J. und Zhang, L.: Peptide fragments for inducing synthesis of extracellular matrix proteins and uses in promoting wound healing of damaged skin., Pub. No.: WO2007146269A2, 2007/12/21/, Helix Biomedix Inc., USA (2007)
- [169] Harris, S. M., Zhang, L. und Falla, T.: Short bio-active peptides for cellular and immunological modulation, Pub. No.: US 2008/0206160 A1, 28.08.2008, Helix BioMedix, Inc., USA (2008)
- [170] Katayama, K., Armendarizborunda, J., Raghov, R., Kang, A. H. und Seyer, J. M.: A Pentapeptide from Type-I Procollagen Promotes Extracellular-Matrix Production, *J Biol Chem* 268 (14) (1993) 9941-9944
- [171] Lee, M., Park, H., Jeon, S. W., Bang, J., Chung, K. Y., et al.: Novel anti-melanogenic hexapeptoids, PAL-10 and PAL-12, *Arch Dermatol Res* 307 (3) (2015) 249-257
- [172] Ohara, H., Ichikawa, S., Matsumoto, H., Akiyama, M., Fujimoto, N., et al.: Collagen-derived dipeptide, proline-hydroxyproline, stimulates cell proliferation and hyaluronic acid synthesis in cultured human dermal fibroblasts, *J Dermatol* 37 (4) (2010) 330-338
- [173] Tsai, W. C., Hsu, C. C., Chung, C. Y., Lin, M. S., Li, S. L., et al.: The pentapeptide KTTKS promoting the expressions of type I collagen and transforming growth factor-beta of tendon cells, *J Orthop Res* 25 (12) (2007) 1629-1634
- [174] Puig, A., Garcia Antón, J. M. und Mangues, M.: A new decorin-like tetrapeptide for optimal organization of collagen fibres, *International Journal of Cosmetic Science* 30 (2) (2008) 97-104
- [175] Farwick, M., Grether-Beck, S., Marini, A., Maczkiewitz, U., Lange, J., et al.: Bioactive tetrapeptide GEKG boosts extracellular matrix formation: in vitro and in vivo molecular and clinical proof, *Exp Dermatol* 20 (7) (2011) 602-604
- [176] Farwick, M., Maczkiewitz, U., Lersch, P., Summers, B. und Rawlings, A. V.: Facial skin-lightening benefits of the tetrapeptide Pro-Lys-Glu-Lys on subjects with skin types V-VI living in South Africa, *J Cosmet Dermatol* 10 (3) (2011) 217-223
- [177] Fu, J. J. J., Hillebrand, G. G., Raleigh, P., Li, J., Marmor, M. J., et al.: A randomized, controlled comparative study of the wrinkle reduction benefits of a cosmetic niacinamide/peptide/retinyl propionate product regimen vs. a prescription 0.02% tretinoin product regimen, *Brit J Dermatol* 162 (3) (2010) 647-654
- [178] Marini, A., Farwick, M., Grether-Beck, S., Jaenicke, T., Weber, M., et al.: Modulation of skin pigmentation by the tetrapeptide PKEK: In-vitro and in-vivo evidence for skin whitening effects, *J Dtsch Dermatol Ges* 9 (11) (2011) 990-990
- [179] Mentel, M., Schild, J., Maczkiewitz, U., Koehler, T. und Farwick, M.: Innovative Peptide Technologies for Even, Young and Healthy Looking Skin, *SOFW-Journal* 138 (3) (2012) 22-33

- [180] Robinson, L. R., Fitzgerald, N. C., Doughty, D. G., Dawes, N. C., Berge, C. A., et al.: Topical palmitoyl pentapeptide provides improvement in photoaged human facial skin, *Int J Cosmet Sci* 27 (3) (2005) 155-60
- [181] Varvaresou, A., Papageorgiou, S., Protopapa, E. und Katsarou, A.: Efficacy and Tolerance Study of an Oligopeptide with Potential Anti-Aging Activity, *Journal of Cosmetics, Dermatological Sciences and Applications* 1 (4) (2011) 133-140
- [182] Wang, Y., Wang, M., Xiao, S., Pan, P., Li, P., et al.: The Anti-Wrinkle Efficacy of Argireline, a Synthetic Hexapeptide, in Chinese Subjects, *American Journal of Clinical Dermatology* 14 (2) (2013) 147-153
- [183] Mazurowska, L. und Mojski, M.: Biological activities of selected peptides: Skin penetration ability of copper complexes with peptides, *J Cosmet Sci* 59 (1) (2008) 59-69
- [184] Ruland, A., Kreuter, J. und Rytting, J. H.: Transdermal Delivery of the Tetrapeptide Hisetal (Melanotropin (6-9)) .1. Effect of Various Penetration Enhancers - in-Vitro Study across Hairless Mouse Skin, *Int J Pharm* 101 (1-2) (1994) 57-61
- [185] Farwick, M. und Lersch, P.: Personal care and cosmetic composition containing tetrapeptides with the motifs GX1X2G, PX1X2P, or PX1X2K, Pub. No.: EP2065029A1 / WO2009068351A2, 03.06.2009, Evonik Goldschmidt GmbH, Germany, (2009)
- [186] Datenblatt für TEGO® Pep 4-17, Version: B 04/09, Evonik Industries AG (2009)
- [187] Datenblatt für TEGO® Pep 4-even, Version: B 03/11, Evonik Industries AG (2011)
- [188] Farwick, M., Maczkiewitz, U. und Köhler, T.: Tetrapeptide zur Aufhellung der Haut, Pub. No.: WO/2011/06102 A1, 26.05.2011, Evonik Goldschmidt GmbH, (2011)
- [189] Soeberdt, M., Knie, U. und Abels, C.: Anti-Inflammatory Tripeptides, Pub. No.: WO 2015/040235 A1, 26.03.2015, Dr. August Wolff GmbH & Co. KG Arzneimittel, (2015)
- [190] Sternemann, C., Soeberdt, M., Brzoska, T., Auriemma, M., Abels, C., et al.: The immunomodulatory tripeptide K(D)PT, related to the C-terminal sequence of alpha-melanocyte-stimulating hormone, ameliorates ongoing psoriasis by inducing tolerogenic DC, *Exp Dermatol* 21 (3) (2012) e29-e29
- [191] Soeberdt, M., Auriemma, M., Brzoska, T., Luger, T. A., Abels, C., et al.: K(D) PT, a tripeptide related to the C-terminal sequence of alpha-melanocyte-stimulating hormone, efficiently ameliorates ongoing psoriasis in a humanized mouse model, *Exp Dermatol* 20 (2) (2011) 167-167
- [192] Mykicky, N., Klenner, L., Baumann, C., Auriemma, M., Sternemann, C., et al.: The tripeptide KdPT ameliorates ongoing psoriasis-like skin inflammation in murine and human skin, *Exp Dermatol* 26 (4) (2017) 328-334
- [193] Klepárník, K., Šlais, K. und Bocek, P.: Determination of the isoelectric points of low and high molecular mass ampholytes by capillary electrophoresis, *ELECTROPHORESIS* 14 (1) (1993) 475-479
- [194] Jorgenson, J. W.: Capillary Zone Electrophoresis, 182-198 in: *New Directions in Electrophoretic Methods*, (ed Jorgenson, J. W. and Phillips, M.), ACS Symposium Series, Vol. 335, American Chemical Society, Washington, D.C. (1987)
- [195] Engelhardt, H., Beck, W., Kohr, J. und Schmitt, T.: Kapillarelektrophorese: Methoden und Möglichkeiten, *Angewandte Chemie* 105 (5) (1993) 659-680
- [196] Szisz, D.: Isoelectric point (pI) calculation, ChemAxon (2015), <https://docs.chemaxon.com/display/docs/Isoelectric+point+%28pI%29+calculation> [abgerufen am: 11.07.2017]
- [197] Öhman, H. und Vahlquist, A.: In vivo studies concerning a pH gradient in human stratum corneum and upper epidermis, *Acta Derm Venereol* 74 (5) (1994) 375-379

- [198] SciFinder®: Substanzinformationen für Glycine, glycy-L-a-glutamyl-L-lysyl- (CAS: 960608-17-7), American Chemical Society, Columbus (USA) <https://scifinder.cas.org/scifinder/view/scifinder/scifinderExplore.jsf> [abgerufen am: 25.11.2010, 18:07 Uhr]
- [199] SciFinder®: Substanzinformationen für L-Lysine, L-prolyl-L-lysyl-L-a-glutamyl- (CAS: 1036207-61-0), American Chemical Society, Columbus (USA) <https://scifinder.cas.org/scifinder/view/scifinder/scifinderExplore.jsf> [abgerufen am: 22.10.2010, 18:11 Uhr]
- [200] SciFinder®: Substanzinformationen für antientzündliches Tripeptid (CAS: 1682652-87-4), American Chemical Society, Columbus (USA) <https://scifinder.cas.org/scifinder/view/scifinder/scifinderExplore.jsf> [abgerufen am: 16.05.2015 18:39 Uhr]
- [201] SciFinder®: Substanzinformationen für antientzündliches Tripeptid (CAS: 1682652-99-8), American Chemical Society, Columbus (USA) <https://scifinder.cas.org/scifinder/view/scifinder/scifinderExplore.jsf> [abgerufen am: 16.05.2015 18:45 Uhr]
- [202] SciFinder®: Substanzinformationen für antientzündliches Tripeptid (CAS: 1682652-97-6), American Chemical Society, Columbus (USA) <https://scifinder.cas.org/scifinder/view/scifinder/scifinderExplore.jsf> [abgerufen am: 16.05.2015, 6:50 Uhr]
- [203] Viswanadhan, V. N., Ghose, A. K., Revankar, G. R. und Robins, R. K.: Atomic Physicochemical Parameters for 3 Dimensional Structure Directed Quantitative Structure - Activity Relationships 4. Additional Parameters for Hydrophobic and Dispersive Interactions and Their Application for an Automated Superposition of Certain Naturally-Occurring Nucleoside Antibiotics, *J Chem Inf Comp Sci* 29 (3) (1989) 163-172
- [204] Szisz, D.: LogP and logD calculations, ChemAxon (2015), <https://docs.chemaxon.com/display/docs/LogP+and+logD+calculations> [abgerufen am: 11.07.2017]
- [205] Wester, R. C. und Maibach, H. I.: Cutaneous Pharmacokinetics - 10 Steps to Percutaneous-Absorption, *Drug Metab Rev* 14 (2) (1983) 169-205
- [206] Pannatier, A., Jenner, P., Testa, B. und Etter, J. C.: Skin as a Drug-Metabolizing Organ, *Drug Metab Rev* 8 (2) (1978) 319-343
- [207] Kao, J., Patterson, F. K. und Hall, J.: Skin Penetration and Metabolism of Topically Applied Chemicals in 6 Mammalian-Species, Including Man - an Invitro Study with Benzo[a]Pyrene and Testosterone, *Toxicol Appl Pharm* 81 (3) (1985) 502-516
- [208] Wilkinson, S. C. und Williams, F. M.: Cutaneous Metabolism, 89-115 in: Dermal Absorption and Toxicity Assessment, Second Edition (ed Roberts, M. S. and Walters, K. A.), Drugs and the Pharmaceutical Sciences, 177, Informa Healthcare USA, Inc., New York (2008)
- [209] Martin, R. J., Denyer, S. P. und Hadgraft, J.: Skin Metabolism of Topically Applied Compounds, *Int J Pharm* 39 (1-2) (1987) 23-32
- [210] Steinsträsser, I. und Merkle, H. P.: Dermal metabolism of topically applied drugs: Pathway and models reconsidered, *Pharmaceutica Acta Helvetiae* 70 (1) (1995) 3-24
- [211] Higo, N., Hinz, R. S., Lau, D. T. W., Benet, L. Z. und Guy, R. H.: Cutaneous Metabolism of Nitroglycerin in Vitro. I. Homogenized Versus Intact Skin, *Pharmaceut Res* 9 (2) (1992) 187-191
- [212] Henrikus, B. M. und Kampffmeyer, H. G.: Ester Hydrolysis and Conjugation Reactions in Intact Skin and Skin Homogenate, and by Liver Esterase of Rabbits, *Xenobiotica* 22 (12) (1992) 1357-1366

- [213] Higo, N., Hinz, R. S., Lau, D. T. W., Benet, L. Z. und Guy, R. H.: Cutaneous Metabolism of Nitroglycerin in Vitro. II. Effects of Skin Condition and Penetration Enhancement, *Pharmaceut Res* 9 (3) (1992) 303-306
- [214] Altenbach, M., Schnyder, N., Zimmermann, C. und Imanidis, G.: Cutaneous metabolism of a dipeptide influences the iontophoretic flux of a concomitant uncharged permeant, *Int J Pharm* 307 (2) (2006) 308-317
- [215] Rao, Y. F., Zheng, F. Y., Zhang, X. G., Gao, J. Q. und Liang, W. Q.: In Vitro Percutaneous Permeation and Skin Accumulation of Finasteride Using Vesicular Ethosomal Carriers, *Aaps Pharmscitech* 9 (3) (2008) 860-865
- [216] Vashisth, I., Ahad, A., Aqil, M. und Agarwal, S. P.: Investigating the potential of essential oils as penetration enhancer for transdermal losartan delivery: Effectiveness and mechanism of action, *Asian Journal of Pharmaceutical Science* 9 (5) (2014) 260-267
- [217] Schramm, G. und Leube, I.: Über die Bildung von Diketopiperazinen aus Polypeptiden, *Die Makromolekulare Chemie* 13 (1) (1954) 117-117
- [218] Kind, T.: Mass Spectrometry Adduct Calculator Metabolomics Fiehn Laboratory, part of the UC Davis, Genome Center (<http://fiehnlab.ucdavis.edu/staff/kind/Metabolomics/MS-Adduct-Calculator/>), (2010)
- [219] Huang, N., Siegel, M. M., Kruppa, G. H. und Laukien, F. H.: Automation of a Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometer for acquisition, analysis, and E-mailing of high-resolution exact-mass electrospray ionization mass spectral data, *J Am Soc Mass Spectr* 10 (11) (1999) 1166-1173
- [220] Imanidis, G., Hartner, K. C. und Mazer, N. A.: Intestinal Permeation and Metabolism of a Model Peptide (Leuprolide) and Mechanisms of Permeation Enhancement by Nonionic Surfactants, *Int J Pharm* 120 (1) (1995) 41-50
- [221] Ogiso, T., Iwaki, M., Tanino, T., Nishioka, S., Higashi, K., et al.: In vitro skin penetration and degradation of enkephalin, elcatonin and insulin, *Biol Pharm Bull* 20 (1) (1997) 54-60
- [222] CIR Expert Panel: Safety Assessment of PEG Diesters as Used in Cosmetics (Final Amended Report), (2015), http://www.cir-safety.org/sites/default/files/PEGDie_032015.pdf [abgerufen am: 21.07.2017]
- [223] CIR Expert Panel: Safety Assessment of Polyglyceryl Fatty Acid Esters as Used in Cosmetics, Draft Report for Panel Review, (2016), <http://www.cir-safety.org/sites/default/files/PGlyFE122015SLR.pdf> [abgerufen am: 21.07.2017]
- [224] Fahr, A.: Voigt Pharmazeutische Technologie für Studium und Beruf, Deutscher Apotheker Verlag, Stuttgart (2015)
- [225] Kato, T., Nakamura, T., Yamashita, M., Kawaguchi, M., Kato, T., et al.: Surfactant properties of purified polyglycerol monolaurates, *J Surfactants Deterg* 6 (4) (2003) 331-337
- [226] Wenk, H. H. und Meyer, J.: Polyglycerol - A Versatile Building Block for Sustainable Cosmetic Raw Materials, *SOFW Journal* 135 (8-2009) (2009) 25-30
- [227] de Campos Araújo, L. M. P., Thomazine, J. A. und Lopez, R. F. V.: Development of microemulsions to topically deliver 5-aminolevulinic acid in photodynamic therapy, *Eur J Pharm Biopharm* 75 (1) (2010) 48-55
- [228] Djordjevic, L., Primorac, M., Stupar, M. und Krajisnik, D.: Characterization of caprylocaproyl macrogolglycerides based microemulsion drug delivery vehicles for an amphiphilic drug, *Int J Pharm* 271 (1) (2004) 11-19
- [229] Djordjevic, L., Primorac, M. und Stupar, M.: In vitro release of diclofenac diethylamine from caprylocaproyl macrogolglycerides based microemulsions, *Int J Pharm* 296 (1) (2005) 73-79

- [230] Escribano, E., Calpena, A. C., Queralt, J., Obach, R. und Doménech, J.: Assessment of diclofenac permeation with different formulations: anti-inflammatory study of a selected formula, *Eur J Pharm Sci* 19 (4) (2003) 203-210
- [231] Jurkovic, P., Šentjurc, M., Gašperlin, M., Kristl, J. und Pecar, S.: Skin protection against ultraviolet induced free radicals with ascorbyl palmitate in microemulsions, *Eur J Pharm Biopharm* 56 (1) (2003) 59-66
- [232] Kreilgaard, M.: Dermal Pharmacokinetics of Microemulsion Formulations Determined by In Vivo Microdialysis
10.1023/A:1011067300397, *Pharmaceut Res* 18 (3) (2001) 367-373
- [233] Kreilgaard, M., Kemme, M. J. B., Burggraaf, J., Schoemaker, R. C. und Cohen, A. F.: Influence of a Microemulsion Vehicle on Cutaneous Bioequivalence of a Lipophilic Model Drug Assessed by Microdialysis and Pharmacodynamics
10.1023/A:1011068907416, *Pharmaceut Res* 18 (5) (2001) 593-599
- [234] Kristl, J., Volk, B., Gašperlin, M., Šentjurc, M. und Jurkovic, P.: Effect of colloidal carriers on ascorbyl palmitate stability, *Eur J Pharm Sci* 19 (4) (2003) 181-189
- [235] Pradhan, R., Kim, Y. I., Jeong, J. H., Choi, H. G., Yong, C. S., et al.: Fabrication, characterization and pharmacokinetic evaluation of doxorubicin-loaded water-in-oil-in-water microemulsions using a membrane emulsification technique, *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 62 (9) (2014) 875-82
- [236] Shah, R. R., Magdum, C. S., Patil, S. S. und Niakwade, N. S.: Preparation and Evaluation of Aceclofenac Topical Microemulsion, *Iran J Pharm Res* 9 (1) (2010) 5-11
- [237] Špiclin, P., Gašperlin, M. und Kmetec, V.: Stability of ascorbyl palmitate in topical microemulsions, *Int J Pharm* 222 (2) (2001) 271-279
- [238] Ho, H. O., Hsiao, C. C. und Sheu, M. T.: Preparation of microemulsions using polyglycerol fatty acid esters as surfactant for the delivery of protein drugs, *J Pharm Sci-U.S.* 85 (2) (1996) 138-143
- [239] Mehrnia, M.-A., Jafari, S.-M., Makhmal-Zadeh, B. S. und Maghsoudlou, Y.: Crocin loaded nano-emulsions: Factors affecting emulsion properties in spontaneous emulsification, *International Journal of Biological Macromolecules* 84 (2016) 261-267
- [240] Nouraei, M. und Acosta, E. J.: Predicting solubilisation features of ternary phase diagrams of fully dilutable lecithin linker microemulsions, *J Colloid Interf Sci* 495 (2017) 178-190
- [241] Naumann, S.: Modulation der ungleichen und dermalen Penetration von pharmazeutischen Problemwirkstoffen durch den Einsatz moderner Drug Delivery Systeme, *Dissertation*, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle (Saale) (2016)
- [242] Sahle, F. F.: Development and Biopharmaceutical Evaluation of Microemulsions for Targeted Delivery of Ceramides and other Stratum Corneum Lipids into the Stratum Corneum, *Dissertation*, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle (Saale) (2012)
- [243] Sahle, F. F., Metz, H., Wohlrab, J. und Neubert, R. H. H.: Polyglycerol fatty acid ester surfactant-based microemulsions for targeted delivery of ceramide AP into the stratum corneum: Formulation, characterisation, in vitro release and penetration investigation, *Eur J Pharm Biopharm* 82 (1) (2012) 139-150
- [244] Sahle, F. F., Wohlrab, J. und Neubert, R. H. H.: Controlled penetration of ceramides into and across the stratum corneum using various types of microemulsions and formulation associated toxicity studies, *Eur J Pharm Biopharm* 86 (2) (2014) 244-250
- [245] Comelles, F.: Influence of 1,3-butylenglycol on the formation of microemulsions O/W in the system with water, sodium dodecyl sulfate and pentanol, *J Disper Sci Technol* 20 (4) (1999) 1071-1084

- [246] Aboofazeli, R., Lawrence, C. B., Wicks, S. R. und Lawrence, M. J.: Investigations into the formation and characterization of phospholipid microemulsions. III. Pseudo-ternary phase diagrams of systems containing water-lecithin-isopropyl myristate and either an alkanolic acid, amine, alkanediol, polyethylene glycol alkyl ether or alcohol as cosurfactant, *Int J Pharm* 111 (1) (1994) 63-72
- [247] Duracher, L., Blasco, L., Hubaud, J.-C., Vian, L. und Marti-Mestres, G.: The influence of alcohol, propylene glycol and 1,2-pentanediol on the permeability of hydrophilic model drug through excised pig skin, *Int J Pharm* 374 (1) (2009) 39-45
- [248] Constantinides, P. P., Scalart, J. P., Lancaster, C., Marcello, J., Marks, G., et al.: Formulation and Intestinal-Absorption Enhancement Evaluation of Water-in-Oil Microemulsions Incorporating Medium-Chain Glycerides, *Pharmaceut Res* 11 (10) (1994) 1385-1390
- [249] Göbel, A. S. B.: Mikroemulsionen als moderne Formulierungen zum Einsatz bei chronisch entzündlichen Hauterkrankungen am Beispiel Tacrolimus und Linolsäure, *Dissertation*, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle (Saale) (2009)
- [250] Alany, R. G., Rades, T., Agatonovic-Kustrin, S., Davies, N. M. und Tucker, I. G.: Effects of alcohols and diols on the phase behaviour of quaternary systems, *Int J Pharm* 196 (2) (2000) 141-145
- [251] Heuschkel, S.: Untersuchungen zum Mechanismus der Penetrationserhöhung durch Mikroemulsionen und neue Enhancer bei der dermalen Applikation von Wirkstoffen, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle (Saale) (2009)
- [252] Aboofazeli, R., Patel, N., Thomas, M. und Lawrence, M. J.: Investigations into the formation and characterization of phospholipid microemulsions. IV. Pseudo-ternary phase diagrams of systems containing water-lecithin-alcohol and oil; The influence of oil, *Int J Pharm* 125 (1) (1995) 107-116
- [253] Kahlweit, M., Strey, R., Haase, D., Kunieda, H., Schmeling, T., et al.: How to Study Microemulsions, *J Colloid Interf Sci* 118 (2) (1987) 436-453
- [254] Alany, R. G., Tucker, I. G., Davies, N. M. und Rades, T.: Characterizing colloidal structures of pseudoternary phase diagrams formed by oil/water/amphiphile systems, *Drug Dev Ind Pharm* 27 (1) (2001) 31-38
- [255] Davis, H. T., Bodet, J. F., Scriven, L. E. und Miller, W. G.: Microstructure and Transport in Midrange Microemulsions, *Physica A* 157 (1) (1989) 470-481
- [256] Ray, S. und Moulik, S. P.: Phase-Behavior, Transport-Properties, and Thermodynamics of Water/AOT/Alkanol Microemulsion Systems, *J Colloid Interf Sci* 173 (1) (1995) 28-33
- [257] Boned, C., Clause, M., Lagourette, B., Peyrelasse, J., Mcclean, V. E. R., et al.: Detection of Structural Transitions in Water-in-Oil Microemulsion-Type Systems through Conductivity and Permittivity Studies, *J Phys Chem* 84 (12) (1980) 1520-1525
- [258] Falco, J. W., Walker, R. D. und Shah, D. O.: Effect of Phase-Volume Ratio and Phase-Inversion on Viscosity of Microemulsions and Liquid-Crystals, *Aiche J* 20 (3) (1974) 510-514
- [259] Gradzielski, M. und Hoffman, H.: Rheological Properties of Microemulsions, 357-386 in: *Handbook of Micremulsion Science and Technology*, 1. Auflage (ed Kumar, P. and Mittal, K. L.), Marcel Dekker Inc, New York (1999)
- [260] Ajith, S., John, A. C. und Rakshit, A. K.: Physiochemical Studies of Microemulsions, *Pure Appl Chem* 66 (3) (1994) 509-514
- [261] Mehta, S. K., Dewan, R. K. und Bala, K.: Percolation Phenomenon and the Study of Conductivity, Viscosity, and Ultrasonic Velocity in Microemulsions, *Phys Rev E* 50 (6) (1994) 4759-4762

- [262] Mehta, S. K. und Bala, K.: Volumetric and Transport-Properties in Microemulsions and the Point-of-View of Percolation Theory, *Phys Rev E* 51 (6) (1995) 5732-5737
- [263] Sicherheitsdatenblatt (nach EG-Verordnung 1907/2006) für TEGO® SMO V, Version: 1.0, 27.10.2007, Evonik Industries AG Essen (2007) 1-7
- [264] Sicherheitsdatenblatt (nach EG-Verordnung 1907/2006) für TEGO® Care PL 4, Version: 1.1, 16.02.2009, Evonik Industries AG Essen (2009) 1-6
- [265] Paasch, S., Schambil, F. und Schwuger, M. J.: Rheological properties of lamellar lyotropic liquid crystals, *Langmuir* 5 (6) (1989) 1344-1346
- [266] Sicherheitsdatenblatt (nach EG-Verordnung 1907/2006) für TEGOSOFT® PC 31, Version: 1.2, 22.08.2012, Evonik Industries AG Essen (2012) 1-10
- [267] Bumajdad, A. und Eastoe, J.: Conductivity of water-in-oil microemulsions stabilized by mixed surfactants, *J Colloid Interf Sci* 274 (1) (2004) 268-276
- [268] Clause, M., Peyrelasse, J., Heil, J., Boned, C. und Lagourette, B.: Bicontinuous Structure Zones in Microemulsions, *Nature* 293 (5834) (1981) 636-638
- [269] Lagourette, B., Peyrelasse, J., Boned, C. und Clause, M.: Percolative Conduction in Microemulsion Type Systems, *Nature* 281 (5726) (1979) 60-62
- [270] Borkovec, M., Eicke, H. F., Hammerich, H. und Dasgupta, B.: Two Percolation Processes in Microemulsions, *J Phys Chem* 92 (1) (1988) 206-211
- [271] Boonme, P., Krauel, K., Graf, A., Rades, T. und Junyaprasert, V. B.: Characterization of microemulsion structures in the pseudoternary phase diagram of isopropyl palmitate/water/Brij 97:1-butanol, *Aaps Pharmscitech* 7 (2) (2006) E99-E104
- [272] Spornath, A., Aserin, A. und Garti, N.: Phase transition induced by water dilution in phospholipid U-type food-grade microemulsions studied by DSC, *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* 83 (2) (2006) 297-308
- [273] Podlogar, F., Gagperlin, M., Tomsic, M., Jamnik, A. und Rogac, M. B.: Structural characterisation of water-Tween 40® /Imwitor 308®-isopropyl myristate microemulsions using different experimental methods, *Int J Pharm* 276 (1-2) (2004) 115-128
- [274] Senatra, D., Guarini, G. G. T., Gabrielli, G. und Zoppi, M.: Low temperature study of w/o microemulsions by differential scanning calorimetry and dielectric measurements, *J. Phys. France* 45 (7) (1984) 1159-1174
- [275] Garti, N., Aserin, A., Tiunova, I. und Fanun, M.: A DSC study of water behavior in water-in-oil microemulsions stabilized by sucrose esters and butanol, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 170 (1) (2000) 1-18
- [276] Hathout, R. M., Woodman, T. J., Mansour, S., Mortada, N. D., Geneidi, A. S., et al.: Microemulsion formulations for the transdermal delivery of testosterone, *Eur J Pharm Sci* 40 (3) (2010) 188-196
- [277] Schulz, P. C.: DSC analysis of the state of water in surfactant-based microstructures, *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* 51 (1) (1998) 135-149
- [278] Senatra, D., Lendinara, L. und Giri, M. G.: W/O microemulsions as model systems for the study of water confined in microenvironments: Low resolution 1H magnetic resonance relaxation analysis, *Progr Colloid Polym Sci* 84 (1991) 122-128
- [279] Senatra, D.: Procedures for DSC analysis of percolative microemulsions, *Thermochimica Acta* 345 (1) (2000) 39-46
- [280] Senatra, D.: Dielectric analysis and Differential Scanning Calorimetry of water-in-oil microemulsions, *Adv Colloid Interfac* 123 (2006) 415-424

- [281] Yagmur, A., Aserin, A., Tiunova, I. und Garti, N.: Sub-zero temperature behaviour of non-ionic microemulsions in the presence of propylene glycol by DSC, *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* 69 (1) (2002) 163-177
- [282] Bauer, K. und Bruchhausen, F. v.: Glycerol in HagerROM 2015, Hagers Handbuch der Drogen und Arzneistoffe, 10.7, Programmentwicklung: illucIT Software GmbH, Springer Verlag, Heidelberg (2015), <http://emedia.bibliothek.uni-halle.de/html5/start.html> [abgerufen am: 10.08.2017]
- [283] CIR Expert Panel: Final Report on the Safety Assessment of Octyl Palmitate, Cetyl Palmitate and Isopropyl Palmitate, *J Am Coll Toxicol* 1 (2) (1982) 13-35
- [284] Produktspezifikation für Tegosoft P (Substanznummer: 300104), Version: 3, 27.04.2005, Evonik Industries AG Essen (2005)
- [285] Shukla, A., Janich, M., Jahn, K. und Neubert, R. H. H.: Microemulsions for dermal drug delivery studied by dynamic light scattering: Effect of interparticle interactions in oil-in-water microemulsions, *J Pharm Sci-Us* 92 (4) (2003) 730-738
- [286] Shukla, A., Graener, H. und Neubert, R. H. H.: Observation of two diffusive relaxation modes in microemulsions by dynamic light scattering, *Langmuir* 20 (20) (2004) 8526-8530
- [287] Shukla, A., Janich, M., Jahn, K., Krause, A., Kiselev, M. A., et al.: Investigation of pharmaceutical oil/water microemulsions by small-angle scattering, *Pharmaceut Res* 19 (6) (2002) 881-886
- [288] Provencher, S. W.: CONTIN: A general purpose constrained regularization program for inverting noisy linear algebraic and integral equations, *Computer Physics Communications* 27 (3) (1982) 229-242
- [289] Provencher, S. W.: A constrained regularization method for inverting data represented by linear algebraic or integral equations, *Computer Physics Communications* 27 (3) (1982) 213-227
- [290] Scotti, A., Liu, W., Hyatt, J. S., Herman, E. S., Choi, H. S., et al.: The CONTIN algorithm and its application to determine the size distribution of microgel suspensions, *J Chem Phys* 142 (23) (2015) 234905
- [291] Chang, N. J. und Kaler, E. W.: Quasi-elastic light scattering study of five-component microemulsions, *Langmuir* 2 (2) (1986) 184-190
- [292] Hou, M. J., Kim, M. und Shah, D. O.: A light scattering study on the droplet size and interdroplet interaction in microemulsions of AOT-oil-water system, *J Colloid Interf Sci* 123 (2) (1988) 398-412
- [293] Heunemann, P., Prevost, S., Grillo, I., Marino, C. M., Meyer, J., et al.: Formation and structure of slightly anionically charged nanoemulsions obtained by the phase inversion concentration (PIC) method, *Soft Matter* 7 (12) (2011) 5697-5710
- [294] Smith, R. M. und Hansen, D. E.: The pH-Rate Profile for the Hydrolysis of a Peptide Bond, *J. Am. Chem. Soc.* 120 (35) (1998) 8910-8913
- [295] Martínez-Pla, J. J., Martín-Biosca, Y., Sagrado, S., Villanueva-Camañas, R. M. und Medina-Hernández, M. J.: Evaluation of the pH effect of formulations on the skin permeability of drugs by biopartitioning micellar chromatography, *J. Chromatogr. A* 1047 (2) (2004) 255-262
- [296] CIR Expert Panel: Final Report on the Safety Assessment of Sorbitan Stearate, Sorbitan Laurate, Sorbitan Sesquioleate, Sorbitan Oleate, Sorbitan Tristearate, Sorbitan Palmitate, and Sorbitan Trioleate, *J Am Coll Toxicol* 4 (3) (1985) 65-121
- [297] CIR Expert Panel: Final Report on the Safety Assessment of Butylene Glycol, Hexylene Glycol, Ethoxydiglycol, and Dipropylene Glycol, *J Am Coll Toxicol* 4 (5) (1985) 223-248

- [298] Diegenant, C., Constandt, L. und Goossens, A.: Allergic contact dermatitis due to 1,3-butylene glycol, *Contact Dermatitis* 43 (4) (2000) 234-235
- [299] Sicherheitsdatenblatt für 1,3-Butylenglykol (Cosmetic Quality), 10010A, Version: 3.00, 05.04.2013, OXEA (2013)
- [300] CIR Expert Panel: Safety Assessment of 1,2-Glycols as Used in Cosmetics, *International Journal of Toxicology* 31 (5) (2012) 147-168
- [301] Fiume, M. M., Heldreth, B. A., Bergfeld, W. F., Belsito, D. V., Hill, R. A., et al.: CIR Expert Panel: Safety Assessment of Alkyl Esters as Used in Cosmetics, *Int J Toxicol* 34 (Suppl 2) (2015) 5S-69S
- [302] Das neue Einstufungs- und Kennzeichnungssystem für Chemikalien nach GHS - kurz erklärt -, Leitfaden zur Anwendung der GHS-Verordnung, Umweltbundesamt, Dessau (2009)
- [303] ECHA-Datenbank: Registrierungsdossier für Isopropyl palmitate, Europäische Chemikalienagentur (2017), <https://echa.europa.eu/de/registration-dossier/-/registered-dossier/15814> [abgerufen am: 03.08.2017]
- [304] Luepke, N. P.: Hens Egg Chorioallantoic Membrane Test for Irritation Potential, *Food Chem Toxicol* 23 (2) (1985) 287-291
- [305] Steiling, W., Bracher, M., Courtellemont, P. und de Silva, O.: The HET-CAM, a useful in vitro assay for assessing the eye irritation properties of cosmetic formulations and ingredients, *Toxicol in Vitro* 13 (2) (1999) 375-384
- [306] Gettings, S. D., Dipasquale, L. C., Bagley, D. M., Casterton, P. L., Chudkowski, M., et al.: The CTFA evaluation of alternatives program: An evaluation of in vitro alternatives to the draize primary eye irritation test. (Phase II) oil/water emulsions, *Food Chem Toxicol* 32 (10) (1994) 943-976
- [307] ICCVAM: Current Status of In Vitro Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Hen's Egg Test - Chorioallantoic Membrane Test Method, NIH Publication No. 06-4515, The National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM) (2006), http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocudocs/ocu_brd.htm#hetcam [abgerufen am: 26.03.2014]
- [308] Spielmann, H. und Liebsch, M.: HET-CAM Test INVITTOX protocol n°47, ECVAM DB-ALM (1992), http://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/ocutox_docs/ocubrd/hetcam/hetcamappA1.pdf [abgerufen am: 25.03.2014]
- [309] Debbasch, C., Ebenhahn, C., Dami, N., Pericoi, M., Van den Berghe, C., et al.: Eye irritation of low-irritant cosmetic formulations: correlation of in vitro results with clinical data and product composition, *Food Chem Toxicol* 43 (1) (2005) 155-165
- [310] Franz, T. J.: Percutaneous absorption on the relevance of in vitro data, *J Invest Dermatol* 64 (3) (1975) 190-5
- [311] OECD: Test Guideline 428: Skin Absorption: in vitro Method, Version: 13. April 2004, OECD/OCDE Paris (2004) 8
- [312] Franz, T. J., Lehman, P. A. und Raney, S. G.: Use of Excised Human Skin to Assess the Bioequivalence of Topical Products, *Skin Pharmacol Phys* 22 (5) (2009) 276-286
- [313] Maibach, H. I. und Wester, R. C.: Percutaneous Absorption - In vivo Methods in Humans and Animals, *J Am Coll Toxicol* 8 (5) (1989) 803-813

- [314] Bronaugh, R. L., Wester, R. C., Bucks, D., Maibach, H. I. und Sarason, R.: In vivo Percutaneous Absorption of Fragrance Ingredients in Rhesus-Monkeys and Humans, *Food Chem Toxicol* 28 (5) (1990) 369-373
- [315] Bartek, M. J., Labudde, J. A. und Maibach, H. I.: Skin Permeability in-Vivo - Comparison in Rat, Rabbit, Pig and Man, *J Invest Dermatol* 58 (3) (1972) 114-&
- [316] Skelly, J. P., Shah, V. P., Maibach, H. I., Guy, R. H., Wester, R. C., et al.: FDA and AAPS Report of the Workshop on Principles and Practices of Invitro Percutaneous Penetration Studies - Relevance to Bioavailability and Bioequivalence, *Pharmaceut Res* 4 (3) (1987) 265-267
- [317] Kemppainen, B. W., Riley, R. T., Pace, J. G. und Hoerr, F. J.: Effects of skin storage conditions and concentration of applied dose on [3H]T-2 toxin penetration through excised human and monkey skin, *Food Chem Toxicol* 24 (3) (1986) 221-7
- [318] Ademola, J. I., Chow, C. A., Wester, R. C. und Maibach, H. I.: Metabolism of Propranolol During Percutaneous-Absorption in Human Skin, *J Pharm Sci-Us* 82 (8) (1993) 767-770
- [319] Bronaugh, R. L., Stewart, R. F. und Simon, M.: Methods for in vitro Percutaneous Absorption Studies. VII: Use of Excised Human Skin, *J Pharm Sci-Us* 75 (11) (1986) 1094-1097
- [320] Astley, J. P. und Levine, M.: Effect of Dimethyl-Sulfoxide on Permeability of Human Skin Invitro, *J Pharm Sci-Us* 65 (2) (1976) 210-215
- [321] Harrison, S. M., Barry, B. W. und Dugard, P. H.: Effects of Freezing on Human-Skin Permeability, *J Pharm Pharmacol* 36 (4) (1984) 261-262
- [322] Swarbrick, J., Lee, G. und Brom, J.: Drug Permeation through Human Skin: I. Effect of Storage-Conditions of Skin, *J Invest Dermatol* 78 (1) (1982) 63-66
- [323] Ahlstrom, L. A., Cross, S. E. und Mills, P. C.: The effects of freezing skin on transdermal drug penetration kinetics, *J Vet Pharmacol Ther* 30 (5) (2007) 456-463
- [324] Nielsen, J. B., Plasencia, I., Sorensen, J. A. und Bagatolli, L. A.: Storage Conditions of Skin Affect Tissue Structure and Subsequent in vitro Percutaneous Penetration, *Skin Pharmacol Phys* 24 (2) (2011) 93-102
- [325] Langguth, P.: Angewandte Biopharmazie und Pharmakokinetik in der Arzneimittelentwicklung, in: Biopharmazie, (ed Langguth, P., Fricker, G. and Wunderli-Allenspach, H.), WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim (2004)
- [326] Scott, R. C. und Ramsey, J. D.: Comparison of the In vivo and In vitro Percutaneous Absorption of a Lipophilic Molecule (Cypermethrin, a Pyrethroid Insecticide), *J Invest Dermatol* 89 (2) (1987) 142-146
- [327] Scott, R. C., Batten, P. L., Clowes, H. M., Jones, B. K. und Ramsey, J. D.: Further Validation of an In vitro Method to Reduce the Need for In vivo Studies for Measuring the Absorption of Chemicals through Rat Skin, *Fund Appl Toxicol* 19 (4) (1992) 484-492
- [328] Hotchkiss, S. A. M., Hewitt, P., Caldwell, J., Chen, W. L. und Rowe, R. R.: Percutaneous Absorption of Nicotinic-Acid, Phenol, Benzoic-Acid and Triclopyr Butoxyethyl Ester through Rat and Human Skin Invitro - Further Validation of an In vitro Model by Comparison with In vivo Data, *Food Chem Toxicol* 30 (10) (1992) 891-899
- [329] Ramsey, J. D., Woollen, B. H., Auton, T. R. und Scott, R. C.: The Predictive Accuracy of in Vitro Measurements for the Dermal Absorption of a Lipophilic Penetrant (Fluazifop-Butyl) through Rat and Human Skin, *Fund Appl Toxicol* 23 (2) (1994) 230-236
- [330] Alvarez-Figueroa, M. J. und Blanco-Mendez, J.: Transdermal delivery of methotrexate: iontophoretic delivery from hydrogels and passive delivery from microemulsions, *Int J Pharm* 215 (1-2) (2001) 57-65

- [331] Dalpozzo, A., Kanai, K., Kereszturi, G. und Calabrese, G.: H-Gly-Hisy(NHC0)Lys-OH, partially modified retro-inverso analogue of the growth factor glycyl-L-histidyl-L-lysine with enhanced enzymatic stability, *Int J Pept Protein Res* 41 (6) (1993) 561-566
- [332] Haering, G. und Luisi, P. L.: Hydrocarbon Gels from Water-in-Oil Microemulsions, *J Phys Chem* 90 (22) (1986) 5892-5895
- [333] Rozman, B. und Gasperlin, M.: Stability of vitamins C and E in topical microemulsions for combined antioxidant therapy, *Drug Delivery* 14 (4) (2007) 235-245
- [334] Hadgraft, J., Peck, J., Williams, D. G., Pugh, W. J. und Allan, G.: Mechanisms of action of skin penetration enhancers/retarders: Azone and analogues, *Int J Pharm* 141 (1) (1996) 17-25
- [335] Cornwell, P. A., Tubek, J., van Gompel, H. A. H. P., Little, C. J. und Wiechers, J. W.: Glyceryl monocaprylate/caprate as a moderate skin penetration enhancer, *Int J Pharm* 171 (2) (1998) 243-255
- [336] Johnson, W.: CIR Expert Panel: Final report of the amended safety assessment of Glyceryl Laurate, Glyceryl Laurate SE, Glyceryl Laurate/Oleate, Glyceryl Adipate, Glyceryl Alginate, Glyceryl Arachidate, Glyceryl Arachidylolinate, Glyceryl Behenate, Glyceryl Caprate, Glyceryl Caprylate, Glyceryl Caprylate/Caprate, [...], *Int J Toxicol* 23 (2004) 55-94
- [337] Schmidt, P. C. und Lang, S.: Pharmazeutische Hilfsstoffe: Eigenschaften, Anwendung und Handelsprodukte, 1. Auflage, Govi-Verlag, Freiburg (2013)
- [338] Fiedler, H. P.: Lexikon der Hilfsstoffe für Pharmazie, Kosmetik und angrenzende Gebiete, Editio Cantor Verlag für Medizin und Naturwissenschaften GmbH, Aulendorf, Aulendorf (1996)
- [339] Endo, M., Yamamoto, T. und Ijuin, T.: Effect of Nonionic Surfactans on the Percutaneous Absorption of Tenoxicam, *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 44 (4) (1996) 865-867
- [340] Cheong, H.-A. und Choi, H.-K.: Effect of ethanolamine salts and enhancers on the percutaneous absorption of piroxicam from a pressure sensitive adhesive matrix, *Eur J Pharm Sci* 18 (2) (2003) 149-153
- [341] Goebel, A. S. B., Schmaus, G., Wohlrab, J., Pillai, R. und Neubert, R.: 1,2-pentanediol enhances cutaneous penetration and bioavailability of active ingredients, *J Am Acad Dermatol* 60 (3) (2009) Ab82-Ab82
- [342] Erker, T.: 2-Pyrrolidon in HagerROM 2015, Hagers Handbuch der Drogen und Arzneistoffe, 10.7, Programmentwicklung: illucIT Software GmbH, Springer Verlag, Heidelberg (2015), <http://emedi.bibliothek.uni-halle.de/html5/start.html> [abgerufen am: 25.08.2017]
- [343] Southwell, D. und Barry, B. W.: Penetration enhancement in human skin; effect of 2-pyrrolidone, dimethylformamide and increased hydration on finite dose permeation of aspirin and caffeine, *Int J Pharm* 22 (2) (1984) 291-298
- [344] ECHA-Datenbank: Registrierungsdossier für 2-pyrrolidone, Europäische Chemikalienagentur (2017), <https://echa.europa.eu/de/registration-dossier/-/registered-dossier/14900/1> [abgerufen am: 25.08.2017]
- [345] Elpelt, A.: Untersuchung der Interaktionen zwischen dermal angewendeten Tetrapeptiden und Penetrationenhancern, *Wissenschaftliche Arbeit zum Praktischen Studiensemester*, Hochschule Lausitz, Senftenberg (2013)
- [346] Mueller, J., Oliveira, J. S. L., Barker, R., Trapp, M., Schroeter, A., et al.: The effect of urea and taurine as hydrophilic penetration enhancers on stratum corneum lipid models, *BBA - Biomembranes* 1858 (9) (2016) 2006-2018
- [347] Eichner, A., Stahlberg, S., Sonnenberger, S., Lange, S., Dobner, B., et al.: Influence of the penetration enhancer isopropyl myristate on stratum corneum lipid model membranes

- revealed by neutron diffraction and ²H NMR experiments, *BBA - Biomembranes* 1859 (5) (2017) 745-755
- [348] Xcalibur 2.0.7, Thermo Fisher Scientific Inc., San José, USA (1998-2007)
- [349] OriginPro 8G SR3, OriginLab Corporation, Northampton, USA
- [350] Schmitt, G. und Herbold, M.: DINTEST - Auswertung der Kalibrationsgerade nach DIN 32645 Version 2004 DE, Institut für Rechtsmedizin und Verkehrsmedizin der Universität, Heidelberg (2004)
- [351] MassLynx V4.0 SP4, Micromass Ltd. (Tochtergesellschaft der Waters Corporation), Wilmslow, UK (2004)
- [352] ChemStation for LC 3D system Rev.B.03.02[341], Agilent Technologies, Waldbronn, Germany (2001-2008)
- [353] EMEA: Guideline on Validation of Bioanalytical Methods, Version: London (2009)
- [354] 32 Karat™ Software, Version 5.0, Beckman Coulter, Inc., Brea, USA
- [355] Rauscher, K., Voigt, J., Wilke, I., Wilke, K.-T. und Friebe, R.: Chemische Tabellen und Rechentafeln für die analytische Praxis, Edt. 11, Verlag Harri Deutsch, Frankfurt am Main (2000)
- [356] Marvin 17.15.0, ChemAxon (<http://www.chemaxon.com>), (2017)
- [357] Physica Rheo Plus 3.4, Anton Paar GmbH, Graz, A
- [358] Product Datasheet für Isopropylpalmitat, Version: 1.1, Cognis, Nutrition & Health Düsseldorf 1-3
- [359] Busse, K.: DLSkonv 2, Martin-Luther-Universität, Halle (Saale), D
- [360] Wohlrab, J.: Präklinische Validierung der Schleimhaut- und Hautverträglichkeit einer flüssigen Präparation zur epikutanen Applikation im HET-CAM-Modell, Version: V1-22-05-12, Bericht 25.03.2014, Institut für angewandte Dermatopharmazie e.V. an der Universitätsklinik und Poliklinik für Dermatologie und Venerologie Halle (2012) 1-6
- [361] Vargas, M. H.: inerSTAT-a v1.3, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (México), (1999)
- [362] Dunnett, C. W.: A Multiple Comparison Procedure for Comparing Several Treatments with a Control, *J Am Stat Assoc* 50 (272) (1955) 1096-1121
- [363] Ph. Eur. European Pharmacopoeia Online 7th Edition, 7.8, The European Directorate for the Quality of Medicines & Health Care (2013), http://online6.edqm.eu/ep708/#doc_1_of_25 [abgerufen am: 14.05.2013]
- [364] Rote Liste® online, Rote Liste® Service GmbH (2013), http://www.rote-liste.de/Online/jsearch_stoffe?HILFSSTOFF [abgerufen am: 14.05.2013]
- [365] Sicherheitsdatenblatt (nach EG-Verordnung 1907/2006) für ISOLAN® GO 33, Version: 1.0, 09.10.2010, Evonik Industries AG Essen (2007) 1-6
- [366] Rote Liste® online, Rote Liste® Service GmbH (2013), <http://www.rote-liste.de/Online/search> [abgerufen am: 15.05.2013]
- [367] Gelbe Liste Pharmindex, Medizinische Medien Informations GmbH (2013), http://www.gelbe-liste.de/wirkstoffe/w/name/polyglycerololeat_22109 [abgerufen am: 15.05.2013]
- [368] Andrysek, T.: Excipients and their role in absorption: influencing bioavailability of cyclosporine by triglycerides and polyglycerol esters, *Biomedical Papers of the Faculty of Medicine of Palacký University, Olomouc Czech Republic* 150 (2) (2006) 227-233

- [369] Ding, Z. Y., Hao, A. Y. und Wang, Z. N.: Water-in-gasoline microemulsions stabilized by polyglycerol esters, *Fuel* 86 (4) (2007) 597-602
- [370] Datenblatt für TEGOSOFT® PC 31, Version: D 05/08, Evonik Industries AG (2008)
- [371] CIR Expert Panel, Annual review of Cosmetic Ingredient safety assessments - 2004/2005, *International Journal of Toxicology* 25 (Suppl. 2) (2006) 1-89
- [372] Akedo, M., Sinskey, A. J. und Gomez, R.: Antimicrobial Action of Aliphatic Diols and Their Esters, *J Food Sci* 42 (3) (1977) 699-701
- [373] Fagron: Prüfprotokoll für 1,3-Butandiol (gemäß § 11 ApBetrO), (2008)
- [374] Fischer, L., Kopf, R., Loeser, A. und Meyer, G.: Chemische Konstitution und pharmakologische Wirkung der Glykole unter besonderer Berücksichtigung von 1,3-Butylenglykol, *Z Ges Exp Med* 115 (1-2) (1949) 22-39
- [375] Hoffmann, T.: Analysenzertifikat 14111750 für Hydrolite® 5, Version: 16.03.2011, Symrise AG Holzminden (2011) 1-2
- [376] Kahlweit, M., Busse, G., Faulhaber, B. und Eibl, H.: Preparing Nontoxic Microemulsions, *Langmuir* 11 (11) (1995) 4185-4187
- [377] Sicherheitsdatenblatt (nach EG-Verordnung 1907/2006) für TEGOSOFT® P, Version: 1.1, 12.08.2011, Evonik Industries AG Essen (2011) 1-9

9. Anhang

Anhang A: Eigenschaften der Mikroemulsionsbestandteile

Um beurteilen zu können, wie die Bestandteile der ME1 und ME2 in den Systemen angeordnet sind, ist es notwendig, deren physikochemische Eigenschaften und Struktur zu kennen. Daher werden diese nachfolgend vorgestellt. Weiterhin werden die Anwendungsgebiete der Hilfsstoffe beleuchtet, sodass deutlich wird, ob diese als Bestandteile von ME für den kosmetischen und pharmazeutischen Bereich geeignet sind. Die dazugehörigen Strukturformeln sind in Abbildung 56 dargestellt.

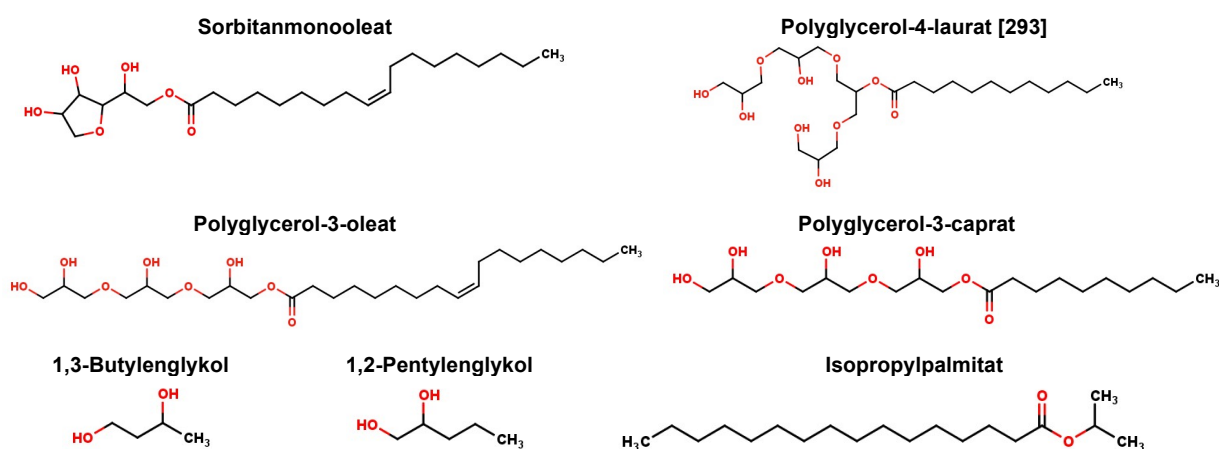


Abbildung 56: Strukturformeln der Bestandteile von ME1 und ME2

Sorbitanmonooleat (Ph. Eur.: Sorbitani oleas; INCI: Sorbitan Oleate; Handelsnamen: TEGO® SMO V / Span 80; Summenformel: $C_{24}H_{44}O_6$; M: 428,6 g/mol) ist ein flüssiger, gelb- bis bernsteinfarbener, nichtionischer W/O-Emulgator mit typisch fettartigem Geruch und einem leicht bitteren bis butterähnlichen Geschmack. Der HLB-Wert liegt bei 4,3. Es ist unlöslich, jedoch dispergierbar in Wasser, mischbar mit Ethanol (96 %), sowie löslich in Isopropanol, Paraffinöl, tierischen und pflanzlichen Ölen. Die dynamische Viskosität beträgt bei 25 °C 800–1200 mPa·s und die Dichte bei 20 °C circa 1 g/cm³. Sorbitanmonooleat gehört zur Klasse der Sorbitanfettsäureester. Dabei handelt es sich um Mischungen partieller Fettsäureester des Sorbitols, sowie seiner Mono- und Dianhydride mit verschiedenen Fettsäuren (Öl-, Palmitin- und Stearinsäure). Die für den Namen verwendete Ölsäure stellt in diesem Fall mit mindestens 65 bis 88 % den Hauptanteil dar. Es wird in Lebensmitteln, Arzneimitteln (Cremes, Gele, Kapseln und Tabletten) und Kosmetika (0,1–5,0 %, vereinzelt bis 25 %) eingesetzt [263, 296, 337, 338, 363, 364]. In der ME1 nimmt das hydrophobe Sorbitanmonooleat den größeren Emulgatoranteil an und wird daher die Phasenlage der ME bestimmen. Dennoch sind Übergänge zu bikontinuierlichen Systemen möglich.

Polyglycerol-4-laurat (INCI: Polyglyceryl-4 Laurate, Handelsname: TEGO® Care PL 4; Summenformel: $C_{24}H_{48}O_{10}$; M: 496 g/mol) gehört zur Gruppe der PGFE. Es ist eine farblose, viskose Substanz. Als nichtionogener O/W-Emulgator (HLB ~ 11) wird es zur Stabilisierung

von Emulsionen und Lotionen in der kosmetischen Industrie in Konzentrationen bis 0,47 % eingesetzt. Außerdem ist es zur Herstellung von ME geeignet. Die dynamische Viskosität beträgt bei 25 °C ca. 38000 mPa·s und die Dichte bei 20 °C 1,11 g/cm³. Es ist wasserlöslich und schmilzt zwischen 0–16 °C [223, 225, 242-244, 264, 338]. In der ME1 nimmt Polyglycerol-4-laurat den kleineren Emulgatoranteil ein. An der Grenzschicht zwischen hydrophiler und lipophiler Phase kann es sich zwischen die Sorbitanoleat-Moleküle lagern, die Krümmung und Fluidität erhöhen und somit die Grenzflächenstabilität reduzieren.

Polyglycerol-3-oleat (INCI: Polyglyceryl-3 Oleate, Handelsname: ISOLAN® GO 33; Summenformel: C₂₇H₅₂O₈; M: 504,7 g/mol) ist ebenfalls der Gruppe der PGFE zuzuordnen. Allerdings ist der Polyglycerolrest in diesem Fall mit einer ungesättigten Fettsäure verestert. Zur Herstellung von Polyglycerol-3-oleat werden natürliche Rohstoffe verwendet. Es handelt sich um eine gelblich, viskose Flüssigkeit von schwachem Geruch und einer Dichte von ca. 0,9 g/cm³ (bei 20 °C). Es ist unlöslich in Wasser und wird als nichtionogener W/O-Emulgator (HLB ~ 5) in Konzentrationen bis 1,5 % zur Stabilisierung von kosmetischen und pharmazeutischen Emulsionen benutzt. Der Hersteller empfiehlt Einsatzkonzentrationen von 2,5–4,0 %. Außerdem wird es in der Nahrungsmittelindustrie verwendet. Aufgrund seiner solubilisierenden Eigenschaften führt es zur besseren Bioverfügbarkeit von Ciclosporin nach oraler Applikation und ist folglich in Weichkapseln mit diesem Wirkstoff (Ciclosporin Pro) enthalten. Im technischen Bereich wurde Polyglycerol-3-oleat bereits erfolgreich zur Herstellung von ME eingesetzt [223, 365-369]. In ME2 lagert sich der Emulgator an die Grenzfläche zwischen hydrophiler und lipophiler Phase.

Polyglycerol-3-caprat (INCI: Polyglyceryl-3 Caprate, Handelsname: Hydriol® PGC.3, TEGOSOFT® PC 31; Summenformel: C₁₉H₃₈O₈, M: 394,5 g/mol) ist ein PGFE mit gesättigter Fettsäure. Es ist eine gelbe, viskose Substanz von charakteristischem Geruch mit einer Dichte von ca. 1 g/cm³ (bei 25 °C) und einer dynamischen Viskosität von 3100–4100 mPa·s (bei 25 °C). Polyglycerol-3-caprat ist dispergierbar in Wasser und in Ethanol löslich. Aufgrund seiner rückfettenden und hautglättenden Eigenschaften wird der nichtionogene O/W-Emulgator (HLB ~ 10) in kosmetischen Formulierungen verarbeitet. In Shampoos und Duschgelen trägt es zur Viskositätserhöhung bei [266, 370]. In ME2 wird es zwischen den Polyglycerol-3-oleat-Molekülen lokalisiert sein und dort die Krümmung und Fluidität der Grenzfläche erhöhen. Aufgrund des fast ausgeglichenen Verhältnisses gegenüber dem hydrophoben Emulgator (Oleat:Caprat, 2:3) wird angenommen, dass neben W/O-ME auch bikontinuierliche und O/W-ME mit dem Emulgatormischung herstellbar sind.

Bei **1,3-Butandiol** (INCI: Butylene Glycol, Summenformel: C₄H₁₀O₂; M: 90,12 g/mol) handelt es sich um eine farblose, hygroskopische, viskose Flüssigkeit. Der zweiwertige Alkohol ist sehr gut in Wasser und Alkoholen löslich. In Ether und fetten Ölen ist es hingegen unlöslich. Die Dichte beträgt 1,001±0,06 g/cm³ und die dynamische Viskosität bei 25 °C 121 mPa·s. Es besitzt solubilisierende Eigenschaften und bewirkt aufgrund seines guten

Verteilungsvermögens eine bessere Verteilung des Konservierungsmittels in einer Formulierung. Zudem verfügt es selbst über konservierende Eigenschaften. Es wirkt gegen gram-positive und -negative Organismen, sowie Schimmel- und Hefepilze. Anwendung findet es als Feuchthalte- und Lösungsmittel, sowie Co-Tensid. In kosmetischen und pharmazeutischen Formulierungen ist es in Konzentrationsbereichen zwischen 0,00007 % bis 89 % enthalten. In MEs kann es als Zusatz zur hydrophilen Phase zu einem vergrößerten isotropen Bereich innerhalb des Phasendiagramms beitragen [245, 297, 338, 366, 371-374]. Möglicherweise lagert sich ein geringer Anteil an der Grenzfläche zwischen die hydrophilen Kopfgruppen der Emulgatoren an und erhöht dort die Fluidität. Als relativ kurzkettiges Glykol wird sich 1,3-Butandiol jedoch vermutlich überwiegend in der Wasserphase aufhalten und kann in ME1 somit zur Solubilisierung der Peptide beitragen [246].

1,2-Pentandiol (INCI: Pentylene Glycol, Summenformel: $C_5H_{12}O_2$; M: 104,1 g/mol) ist eine farblose, klare, viskose Flüssigkeit mit einer relativen Dichte von ca. 0,97 g/cm³ [375]. Wie 1,3-BuG wirkt es solubilisierend und wird daher als Cosolvens in kosmetischen Formulierungen (bis zu 5 %), aber auch in ME eingesetzt [300, 376]. 1,2-PeG penetriert selbst gut in die Haut (57,1 %) und wirkt penetrationsfördernd für sowohl lipophile, als auch hydrophile Substanzen [63, 70, 300, 341]. In ME2 kann es sich einerseits in der hydrophilen Phase aufhalten und dort die Peptide solubilisieren. Weiterhin ist aufgrund der Kettenlänge eine Einlagerung in die emulgatorreiche Grenzschicht anzunehmen [246].

IPP (INCI: Isopropyl Palmitate, Handelsname: TEGOSOFT® P, Summenformel: $C_{19}H_{38}O_2$, M: 298 g/mol) ist eine ölige, farb- und geruchlose, oxidations-stabile Flüssigkeit. Es gehört zur Gruppe der flüssigen synthetischen Wachse, wobei es den Isopropylester der Palmitinsäure darstellt. Die dynamische Viskosität beträgt 5–6 mPa·s bei 20 °C und die Dichte 0,854 g/cm³. Mischbar ist es mit pflanzlichen Ölen und Fette, sowie Mineralölen. In Wasser, Glycerin und PrG ist es nicht löslich. IPP wird als lipophile Komponente in Dermatika eingesetzt – sowohl in kosmetischen Formulierungen (bis 60 %) als auch in Arzneimitteln. Es besitzt ein gutes Spreitungs- und Permeationsvermögen und wird leicht von der Haut aufgenommen, ohne einen fettigen Glanz zu hinterlassen. Außerdem wirkt es penetrationsfördernd für lipophile Substanzen [301, 337, 338, 363, 366, 377].

Anhang B: Zusammensetzung der Mikroemulsionen für die physikochemische Charakterisierung

In Tabelle 24 ist die prozentuale Zusammensetzung der ME entlang der Dilutionsreihen a-e aufgeführt.

Tabelle 24: Zusammensetzung der ME entlang der Dilutionsreihen a bis e (TC PL4 = Tego Care PL4, HPGC.3 = Hydriol PGC.3, H₂O = Wasser); Mengenangaben in % (m/m)

Mischung	Emulgatorgemisch		Hydrophiler Anteil		Lipophiler Anteil
	Tego SMO V TC PL4 (1:2)	Isolan GO 33 HPGC.3 (2:3)	H ₂ O/BuG (1:1)	H ₂ O/PeG (2:1)	IPP
a¹	25,0 %		5,0 %		70,0 %
a² = b¹	25,0 %		10,0 %		65,0 %
a³	25,0 %		15,0 %		60,0 %
a⁴	25,0 %		20,0 %		55,0 %
a⁵	25,0 %		25,0 %		50,0 %
a⁶	25,0 %		30,0 %		45,0 %
b⁰	20,0 %		10,0 %		70,0 %
b²	30,0 %		10,0 %		60,0 %
b³	40,0 %		10,0 %		50,0 %
b⁴	50,0 %		10,0 %		40,0 %
b⁵	60,0 %		10,0 %		30,0 %
c¹		25,0 %		5,0 %	70,0 %
c²		30,0 %		10,0 %	60,0 %
c³		35,0 %		15,0 %	50,0 %
c⁴		40,0 %		20,0 %	40,0 %
c⁵ = d²		45,0 %		25,0 %	30,0 %
c⁶		50,0 %		30,0 %	20,0 %
c⁷ = e³		55,0 %		35,0 %	10,0 %
d¹		40,0 %		25,0 %	35,0 %
d³		50,0 %		25,0 %	25,0 %
d⁴ = e¹		55,0 %		25,0 %	20,0 %
e²		55,0 %		30,0 %	15,0 %
e⁴		55,0 %		40,0 %	5,0 %

Anhang C: HET-CAM-Ergebnisse

Einen Überblick über die Teilergebnisse aus den HET-CAM-Versuchen mit den Sekunden, die bis zum Auftreten der irritativen Ereignisse vergangen sind, bieten die Tabelle 25 bis Tabelle 27.

Tabelle 25: HET-CAM-Ergebnis der visuellen Beobachtung der CAM nach Applikation der ME1 und ME2 ohne Peptid, sowie ME mit je 1 % der Peptide GEKG und PKEK - Sekunden bis Eintritt der Ereignisse Hämorrhagie (H), Gefäßlyse (L) und Gerinnung (C); Wdh.: Wiederholungsversuch, n.b. = nicht beobachtet

Ei-Nr.	ME1			ME2			GEKG in ME1			GEKG in ME1, Wdh.			PKEK in ME1		
	Sekunden bis Ereignisbeginn			Sekunden bis Ereignisbeginn			Sekunden bis Ereignisbeginn			Sekunden bis Ereignisbeginn			Sekunden bis Ereignisbeginn		
	H	L	C	H	L	C	H	L	C	H	L	C	H	L	C
1	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
2	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
3	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	241	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
4	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	245	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
5	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
6	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.

Tabelle 26: HET-CAM-Ergebnis der visuellen Beobachtung der CAM nach Applikation der ME1 mit je 1 % der Peptide LPA, LPBG und LPT - Sekunden bis Eintritt der Ereignisse Hämorrhagie (H), Gefäßlyse (L) und Gerinnung (C); Wdh. = Wiederholungsversuch, n.b. = nicht beobachtet

Ei-Nr.	LPA in ME1			LPBG in ME1			LPT in ME1			LPT in ME1, Wdh.		
	Sekunden bis Ereignisbeginn			Sekunden bis Ereignisbeginn			Sekunden bis Ereignisbeginn			Sekunden bis Ereignisbeginn		
	H	L	C	H	L	C	H	L	C	H	L	C
1	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	138	n.b.	n.b.
2	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	87	n.b.	n.b.	102	n.b.	n.b.
3	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	47	n.b.	n.b.
4	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	121	n.b.	n.b.	74	n.b.	n.b.
5	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	82	n.b.	n.b.	92	n.b.	n.b.
6	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.

Tabelle 27: HET-CAM-Ergebnis der visuellen Beobachtung der CAM nach Applikation der BC ohne Peptid und mit je 1 % der Peptide LPA, LPBG und LPT - Sekunden bis Eintritt der Ereignisse Hämorrhagie (H), Gefäßlyse (L) und Gerinnung (C); n.b. = nicht beobachtet

Ei-Nr.	BC			LPA in BC			LPBG in BC			LPT in BC		
	Sekunden bis Ereignisbeginn			Sekunden bis Ereignisbeginn			Sekunden bis Ereignisbeginn			Sekunden bis Ereignisbeginn		
	H	L	C	H	L	C	H	L	C	H	L	C
1	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
2	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
3	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
4	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
5	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
6	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.

Anhang D: Übersicht über das verwendete radioaktiv markierte Material**Tabelle 28: Eigenschaften des radioaktiven Materials**

Peptid	GEKG	Pal-GEKG	PKEK	Pal-PKEK
Radioaktive Markierung	[Gly-1- ¹⁴ C]-GEKG	[³ H]-Palmitoyl-GEKG-OH	[³ H]-PKEK-OH	[³ H]-Palmitoyl-PKEK-OH
Radiochemische Reinheit	> 99 %	> 98 %	> 98 %	> 98 %
Spezifische Aktivität	56,1 mCi/mmol	62 Ci/mmol	35,8 Ci/mmol	75 Ci/mmol
Konzentration	0,93 mCi/mL	0,5 mCi/mL	0,5 mCi/mL	0,5 mCi/mL
Lösungsmittel	Wasser/Ethanol (1:1)	Ethanol	Wasser/Ethanol (1:1)	Ethanol
Eingesetztes Volumen pro Hautstück	5 µL	40 µL	40 µL	40 µL
Stoffmenge des Tracers pro Hautstück	0,08 µmol	0,32 nmol	0,56 nmol	0,27 nmol
Gehalt des Tracers in der Formulierung	1613,8 ppm	10,1 ppm	14,0 ppm	9,9 ppm

Anhang E: Zusammensetzung der O/W-Emulsionen

Tabelle 29 zeigt die quantitative Zusammensetzung der O/W-Emulsionen, die im 1. Screening mit GEKG untersucht wurden. Formulierung 1 ist die Standard-O/W-Emulsion ohne zusätzlichen Enhancer, die auch für die Vollprofile (Kapitel 5.1.1. GEKG, 5.1.2. PKEK, 5.2.1. Palmitoyl-GEKG und 5.2.2. Palmitoyl-PKEK) verwendet wurde. Die Formulierungen 2-8 enthalten jeweils 5 % verschiedener Enhancer.

Tabelle 29: Zusammensetzung der Formulierungen für das 1. Screening mit GEKG

Substanz (Handelsname)	INCI	Menge in % (m/m)							
		Formulierung							
		1	2	3	4	5	6	7	8
Tego® Care 450	Polyglyceryl-3 Methylglucose Distearate	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0
Tego® Alkanol 18	Stearyl Alcohol	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
TEGIN® M Pellets	Glyceryl Stearate	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
TEGOSOFT® TN	C12-15 Alkyl Benzoate	9,5	9,5	9,5	9,5	9,5	9,5	9,5	9,5
TEGOSOFT® CT	Caprylic/Capric Triglyceride	9,5	4,5	9,5	9,5	9,5	9,5	9,5	9,5
1,3-Butandiol	Butylene Glycol	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
Glycerin	Glycerin	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
WB 4662	Glyceryl Caprylate/Caprinate (2.0x)		5,0						
WB 4661	Glyceryl Caprylate/Caprinate (1.5x)			5,0					
TEGOSOFT® PC31	Polyglyceryl-3 Caprate				5,0				
TEGO® Care PL4	Polyglyceryl-4 Laurate					5,0			
TEGO® Cosmo P813	Polyglyceryl-3 Caprylate						5,0		
1,2-Pentandiol	Pentylene Glycol							5,0	
Soluphor P	2-Pyrrolidone								5,0
Wasser	Aqua	65,2	65,2	60,2	60,2	60,2	60,2	60,2	60,2
Microcare MEM	Methylisothiazolinone, Methylparaben, Ethylparaben	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8
GEKG	Tetrapeptide-21	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005
Wasser	Aqua	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0

95 % Basisformulierung

5 % Lösung

Tabelle 30 zeigt die quantitative Zusammensetzung der O/W-Emulsionen, die für das 2. Screening mit GEKG verwendet wurden. Neben GEKG-haltigen Formulierungen ohne (Formulierung 1) und mit 5 % Penetrationenhancer (Formulierungen 2-4) wurde eine O/W-Emulsion untersucht, die Pal-GEKG enthielt (Formulierung 5).

Tabelle 30: Zusammensetzung der Formulierungen für das 2. Screening mit GEKG

Substanz (Handelsname)	INCI	Menge in % (m/m)				
		Formulierung				
		1	2	3	4	5
Tego® Care 450	Polyglyceryl-3 Methylglucose Distearate	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0
Tego® Alkanol 18	Stearyl Alcohol	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
TEGIN® M Pellets	Glyceryl Stearate	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
TEGOSOFT® TN	C12-15 Alkyl Benzoate	9,5	9,5	9,5	9,5	9,5
TEGOSOFT® CT	Caprylic/Capric Triglyceride	9,5	4,5	9,5	9,5	9,5
1,3-Butandiol	Butylene Glycol	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
Glycerin	Glycerin	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
WB 4662	Glyceryl Caprylate/Caprate (2.0x)		5,0	5,0		
WB 4661	Glyceryl Caprylate/Caprate (1.5x)				5,0	
Wasser	Aqua	65,2	65,2	60,2	60,2	60,2
Microcare MEM	Methylisothiazolinone, Methylparaben, Ethylparaben	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8
GEKG	Tetrapeptide-21	0,005	0,005	0,005	0,005	
Pal-GEKG						0,005
Wasser	Aqua	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0

95 % Basisformulierung

5 % Lösung

Tabelle 31 zeigt die quantitative Zusammensetzung der O/W-Emulsionen, die für das 1. Screening mit PKEK verwendet wurden. Untersucht wurden PKEK-haltige Formulierungen ohne und mit 5 % Penetrationsenhancer.

Tabelle 31: Zusammensetzung der Formulierungen für das 1. Screening mit PKEK

Substanz (Handelsname)	INCI	Menge in % (m/m)					
		Formulierung					
		1	2	3	4	5	6
Tego® Care 450	Polyglyceryl-3 Methylglucose Distearate	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0
Tego® Alkanol 18	Stearyl Alcohol	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
TEGIN® M Pellets	Glyceryl Stearate	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
TEGOSOFT® TN	C12-15 Alkyl Benzoate	9,5	9,5	9,5	9,5	9,5	9,5
TEGOSOFT® CT	Caprylic/Capric Triglyceride	9,5	4,5	9,5	9,5	9,5	9,5
1,3-Butandiol	Butylene Glycol	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
Glycerin	Glycerin	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
WB 4662	Glyceryl Caprylate/Caprates (2.0x)		5,0				
WB 4661	Glyceryl Caprylate/Caprates (1.5x)			5,0			
TEGOSOFT® PC 31	Polyglyceryl-3 Caprate				5,0		
1,2-Pentandiol	Pentylene Glycol					5,0	
Soluphor® P	2-Pyrrolidone						5,0
Wasser	Aqua	65,2	65,2	60,2	60,2	60,2	60,2
Microcare MEM	Methylisothiazolinone, Methylparaben, Ethylparaben	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8
PKEK	Tetrapeptide-30	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004
Wasser	Aqua	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0

95 % Basisformulierung

5 % Lösung

9. Anhang

Tabelle 32 zeigt die quantitative Zusammensetzung der O/W-Emulsionen, die für das 2. Screening mit PKEK verwendet wurden. Untersucht wurden PKEK-haltige Formulierungen ohne (Formulierung 4 und 5) und mit 5 % der Penetrationenhancer Polyglyceryl-3 Caprate (Formulierungen 1-3), sowie 2-Pyrrolidon (Formulierung 6).

Tabelle 32: Zusammensetzung der Formulierungen für das 2. Screening mit PKEK

Substanz (Handelsname)	INCI	Menge in % (m/m)						
		Formulierung						
		1	2	3	4	5	6	
TEGO® Care 450	Polyglyceryl-3 Methylglucose Distearate	3,0					3,0	95 % Basisformulierung
TEGO® Alkanol 18	Stearyl Alcohol	1,0					1,0	
TEGIN® M Pellets	Glyceryl Stearate	2,0					2,0	
TEGOSOFT® TN	C12-15 Alkyl Benzoate	9,5					9,5	
TEGOSOFT® CT	Caprylic/Capric Triglyceride	9,5	5,0	5,0	5,0	5,0	9,5	
TEGO® Care CG 90	Cetearyl Glucoside		1,0		1,0			
TEGO® Care LTP	Sorbitan Laurate, Polyglyceryl-4 Laurate, Dilauryl Citrate			2,0		2,0		
TEGOSOFT® DEC	Diethylhexyl Carbonate		5,0	5,0	5,0	5,0		
TEGO® Carbomer 140	Carbomer			0,15		0,15		
TEGO® Carbomer 141	Carbomer			0,15		0,15		
KELTROL® F [E]	Xanthan Gum			0,1		0,1		
Wasser	Aqua	60,2	73,2	72,8	78,2	77,8	60,2	
1,3-Butandiol	Butylene Glycol	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	
Glycerin	Glycerin	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	
TEGOSOFT® PC 31	Polyglyceryl-3 Caprate	5,0	5,0	5,0				
Soluphor® P	2-Pyrrolidone						5,0	
SEPIGEL 305	Polyacrylamide, C13-14 Isoparaffin, Laureth-7		1,0		1,0			
Microcare® MEM	Methylisothiazolinone, Methylparaben, Ethylparaben	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	
PKEK	Tetrapeptide-30	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	5 % Lösung
Wasser	Aqua	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	

Anhang F: Übersicht über die Penetrationsdaten

Tabelle 33: Penetrationsergebnisse von GEKG aus der O/W-Emulsion mit 5000 ppm Peptidgehalt als absoluten Anteil in % der Ausgangskonzentration in den untersuchten Proben inklusive Angabe der jeweils verwendeten Hautproben (MA = Mammahaut)

5000 ppm GEKG in O/W-Emulsion	30 Minuten									100 Minuten									300 Minuten										
	Haut (Dicke der Epidermis)			MA 164 (60,0 µm)			MA 171 (58,7 µm)			MA 174 (86,03 µm)			MA 164 (60,0 µm)			MA 171 (58,7 µm)			MA 174 (86,03 µm)			MA 164 (60,0 µm)			MA 171 (58,7 µm)			MA 174 (86,03 µm)	
Tupfer	59,96			77,36			68,83			69,61			73,80			61,16			62,83			72,38			68,34				
SC	9,87			6,02			5,56			5,53			10,98			6,11			6,62			11,65			4,73				
Epidermis	0,01	0,09	0,02	0,01	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,02	0,04	0,28	0,02	0,03	0,01	0,01	0,01	0,11	0,00	0,09	0,23	0,08	0,07	0,37	0,13	0,07	0,06		
Dermis	0,18	1,34	0,41	0,24	0,02	0,01	0,04	0,05	0,06	0,22	0,53	0,37	0,17	0,21	0,08	0,08	1,10	0,74	0,20	0,89	1,74	1,91	0,95	5,41	0,51	0,77	0,79		
Stumpf	0,45	0,35	0,17	0,54	0,21	0,09	0,37	0,12	0,41	0,23	1,10	0,17	1,30	5,40	0,53	0,70	2,80	0,52	0,10	0,18	0,34	1,68	1,69	7,63	0,34	0,03	0,69		
Gaze	0,62			0,74			2,98			0,38			2,48			3,96			0,00			0,33			5,13				
Akzeptor	0,13			0,29			0,03			0,43			0,42			0,05			0,02			0,24			0,55				

Tabelle 34: Penetrationsergebnisse von GEKG aus der O/W-Emulsion mit 5000 ppm Peptidgehalt als relativen Anteil in den untersuchten Proben ohne Gaze, sowie die Ergebnisse des Dunnett's Test auf signifikante Unterschiede zwischen den Versuchszeiten, n.s. = nicht signifikant für p > 0,05

5000 ppm GEKG in O/W-Emulsion	Tupfer		SC		lebende Hautschichten		Akzeptor		Epidermis		Dermis		Stumpf		WFR [%]	
	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD
relative Menge [%]																
30 min	89,53	3,80	9,50	3,30	0,78	0,71	0,19	0,13	0,02	0,04	0,36	0,60	0,40	0,21	76,60	6,72
100 min	87,76	3,41	9,52	2,36	2,35	2,06	0,37	0,23	0,08	0,12	0,52	0,50	1,75	1,93	77,90	9,30
300 min	86,72	5,86	9,51	2,86	3,43	4,04	0,34	0,31	0,15	0,12	1,73	1,58	1,55	2,46	78,78	10,66
p _{30 min vs. 100 min}	n.s.		n.s.		< 0,05		n.s.		n.s.		n.s.		n.s.			
p _{100 min vs. 300 min}	n.s.		n.s.		n.s.		n.s.		n.s.		< 0,05		n.s.			
p _{30 min vs. 300 min}	n.s.		n.s.		n.s.		n.s.		< 0,01		< 0,05		n.s.			

9. Anhang

Tabelle 35: Penetrationsergebnisse von GEKG aus der O/W-Emulsion mit 5000 ppm Peptidgehalt als relativen Anteil in den untersuchten Proben inklusive Gaze, sowie die Ergebnisse des Dunnett's Test auf signifikante Unterschiede zwischen den Versuchszeiten, n.s. = nicht signifikant für $p > 0,05$

5000 ppm GEKG in O/W-Emulsion	Tupfer		SC		lebende Hautschichten		Gaze		Akzeptor		Epidermis		Dermis		Stumpf		WFR [%]	
	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD
relative Menge [%]																		
30 min	87,84	3,31	9,35	3,33	0,77	0,71	1,86	1,48	0,19	0,13	0,02	0,04	0,36	0,59	0,39	0,20	78,05	6,60
100 min	85,25	4,28	9,23	2,27	2,27	1,98	2,88	2,13	0,36	0,23	0,08	0,12	0,50	0,47	1,69	1,86	80,17	8,93
300 min	84,67	4,82	9,36	3,01	3,38	4,04	2,27	3,13	0,32	0,29	0,15	0,12	1,70	1,59	1,53	2,45	80,60	10,26
p _{30 min vs. 100 min}	n.s.		< 0,05		n.s.		n.s.		n.s.		n.s.		n.s.		n.s.			
p _{100 min vs. 300 min}	n.s.		n.s.		n.s.		n.s.		n.s.		n.s.		0,05		n.s.			
p _{30 min vs. 300 min}	n.s.		n.s.		n.s.		n.s.		n.s.		< 0,05		< 0,05		n.s.			

Tabelle 36: Penetrationsergebnisse von PKEK aus der O/W-Emulsion mit 5000 ppm Peptidgehalt als absoluten Anteil in % der Ausgangskonzentration in den untersuchten Proben inklusive Angabe der jeweils verwendeten Hautproben (MA = Mammahaut)

5000 ppm PKEK in O/W-Emulsion	30 Minuten									100 Minuten									300 Minuten											
	Haut (Dicke der Epidermis)			MA 94 (60,0 µm)			MA 96 (58,7 µm)			MA 97 (86,0 µm)			MA 94 (60,0 µm)			MA 96 (58,7 µm)			MA 97 (86,0 µm)			MA 94 (60,0 µm)			MA 96 (58,7 µm)			MA 97 (86,0 µm)		
Tupfer				29,02			36,78			34,72			64,93			68,44			48,92			107,47			128,29			88,20		
SC				9,59			8,13			23,95			36,78			35,13			19,00			107,50			34,75			87,88		
Epidermis	0,26	0,59	0,12	0,01	0,20	0,02	0,02	0,31	0,24	1,27	0,91	0,31	0,72	0,15	0,27	1,08	0,08	0,39	0,57	3,10	1,14	0,50	1,63	0,97	1,15	0,88	1,11			
Dermis	1,63	6,82	1,95	0,06	1,38	0,76	0,13	0,83	1,40	1,07	5,17	0,91	1,26	0,29	0,96	2,41	0,32	2,87	2,19	6,32	4,85	1,98	3,63	5,77	3,91	3,16	5,02			
Stumpf	0,59	2,62	1,44	0,52	0,76	2,88	0,34	0,54	1,24	2,55	1,31	0,33	2,66	0,71	0,29	3,49	0,52	2,14	1,12	1,27	1,35	0,61	0,53	1,16	1,21	1,59	1,34			
Akzeptor				4,98			79,71			29,83			4,65			5,87			7,17			6,05			9,13			16,89		

9. Anhang

Tabelle 37: Penetrationsergebnisse von PKEK aus der O/W-Emulsion mit 5000 ppm Peptidgehalt als relativen Anteil in den untersuchten Proben, sowie die Ergebnisse des Dunnett's Test auf signifikante Unterschiede zwischen den Versuchszeiten, n.s. = nicht signifikant für $p > 0,05$

5000 ppm PKEK in O/W-Emulsion	Tupfer		SC		lebende Hautschichten		Akzeptor		Epidermis		Dermis		Stumpf		WFR [%]	
	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD
relative Menge [%]																
30 min	42,36	13,76	17,55	8,91	4,70	5,72	35,39	22,86	0,30	0,35	2,75	4,00	1,64	1,52	88,65	38,97
100 min	60,44	2,11	29,49	4,31	3,91	2,82	6,15	2,21	0,57	0,44	1,72	1,55	1,61	1,35	100,78	18,43
300 min	54,49	13,34	36,90	13,08	3,19	1,00	5,42	2,53	0,60	0,34	2,03	0,73	0,56	0,16	201,84	25,36
p30 min vs. 100 min	n.s.		n.s.		n.s.		n.s.		n.s.		n.s.		n.s.			
p100 min vs. 300 min	n.s.		n.s.		n.s.		n.s.		n.s.		n.s.		< 0,05			
p30 min vs. 300 min	n.s.		n.s.		n.s.		n.s.		n.s.		n.s.		< 0,05			

Tabelle 38: Penetrationsergebnisse von PKEK aus der O/W-Emulsion mit 40 ppm Peptidgehalt als absoluten Anteil in % der Ausgangskonzentration in den untersuchten Proben inklusive Angabe der jeweils verwendeten Hautproben (MA = Mammahaut)

40 ppm PKEK in O/W-Emulsion	30 Minuten									100 Minuten									300 Minuten										
	Haut (Dicke der Epidermis)			MA 94 (60,0 µm)			MA 96 (58,7 µm)			MA 93 (98,9 µm)			MA 94 (60,0 µm)			MA 96 (58,7 µm)			MA 93 (98,9 µm)			MA 94 (60,0 µm)			MA 96 (58,7 µm)			MA 93 (98,9 µm)	
Tupfer	7,72			1,60			12,01			8,41			26,62			44,69			3,69			15,38			3,60				
SC	30,17			70,60			26,77			81,21			5,44			21,71			26,97			24,42			85,56				
Epidermis	0,18	0,20	0,04	0,60	0,43	0,02	1,05	0,27	0,85	0,84	1,26	0,97	0,04	0,00	0,00	0,74	0,04	0,22	0,10	0,02	0,34	0,48	0,22	0,22	2,39	1,27	7,13		
Dermis	1,00	1,29	1,82	4,74	5,11	0,17	7,98	3,94	4,70	4,39	6,47	4,33	1,00	0,02	0,05	4,54	0,39	1,31	0,56	0,37	6,41	5,70	2,36	0,56	19,39	6,73	11,16		
Stumpf	0,26	0,32	0,79	1,22	1,58	0,08	0,46	0,30	0,58	0,32	0,45	0,53	1,30	0,07	0,21	1,59	0,21	0,36	0,12	0,05	1,07	0,57	0,14	0,11	0,71	0,46	0,66		
Akzeptor	0,96			2,00			0,00			0,25			0,23			0,06			2,00			2,05			2,93				

9. Anhang

Tabelle 39: Penetrationsergebnisse von PKEK aus der O/W-Emulsion mit 40 ppm Peptidgehalt als relativen Anteil in den untersuchten Proben, sowie die Ergebnisse des Dunnett's Test auf signifikante Unterschiede zwischen den Versuchszeiten, sowie zwischen der PKEK-haltigen O/W-Emulsionen mit 40 ppm und 5000 ppm Peptidanteil, n.s. = nicht signifikant für $p > 0,05$

40 ppm PKEK in O/W-Emulsion relative Menge [%]	Tupfer		SC		lebende Hautschichten		Akzeptor		Epidermis		Dermis		Stumpf		WFR [%]	
	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD
30 min	15,81	10,86	74,19	13,59	8,38	5,76	1,63	1,23	0,78	0,75	6,50	4,93	1,09	0,61	55,06	18,02
100 min	51,10	32,59	43,97	30,91	4,58	3,44	0,35	0,27	0,52	0,52	3,06	2,54	1,00	1,19	66,39	27,52
300 min	15,93	13,99	69,75	12,96	10,02	7,57	4,30	1,34	1,44	1,96	7,84	6,12	0,73	0,78	63,24	34,66
p _{30 min vs. 100 min}	n.s.		n.s.		n.s.		n.s.		n.s.		n.s.		n.s.			
p _{100 min vs. 300 min}	n.s.		n.s.		n.s.		< 0,01		n.s.		n.s.		n.s.			
p _{30 min vs. 300 min}	n.s.		n.s.		n.s.		n.s.		n.s.		n.s.		n.s.			
p _{30min: 40 ppm vs. 5000 ppm}	n.s.		< 0,01		n.s.		n.s.		n.s.		n.s.		n.s.			
p _{100min: 40 ppm vs. 5000 ppm}	n.s.		n.s.		n.s.		< 0,05		n.s.		n.s.		n.s.			
p _{300min: 40 ppm vs. 5000 ppm}	< 0,05		< 0,05		< 0,05		n.s.		n.s.		< 0,05		n.s.			

Tabelle 40: Penetrationsergebnisse von LPA, LPBG und LPT aus der BC mit 1 % Peptidgehalt als absoluten Anteil in % der Ausgangskonzentration in den untersuchten Proben inklusive Angabe der jeweils verwendeten Hautproben (OA = Oberarm)

1 % Peptid in BC absolute Menge [%]	Tupfer	SC		lebende Hautschichten		Gaze	Akzeptor	Epidermis		Dermis		Stumpf		WFR [%]	Haut
		MW	SD	MW	SD			MW	SD	MW	SD	MW	SD		
LPA	31,34	0,68	0,60	1,01	1,10	0,04	< LOQ	0,59	0,91	0,42	0,25	0,00	0,00	33,08	OA 178
LPBG	25,21	15,82	3,76	7,25	0,33	< LOQ	< LOQ	3,96	1,47	3,30	1,75	0,00	0,00	48,28	OA 178
LPT	24,53	23,72	7,37	15,11	4,95	< LOQ	< LOQ	8,48	1,25	6,37	3,91	0,25	0,07	63,55	OA 178

9. Anhang

Tabelle 41: Penetrationsergebnisse von Pal-GEKG aus der O/W-Emulsion mit 5000 ppm Peptidgehalt als absoluten Anteil in % der Ausgangskonzentration in den untersuchten Proben inklusive Angabe der jeweils verwendeten Hautproben (BA = Bauch, OA = Oberarm, OS = Oberschenkel)

5000 ppm Pal-GEKG in O/W-Emulsion	30 Minuten									100 Minuten									300 Minuten									
	Haut (Dicke der Epidermis)	OA 167 (44,7 µm)			Ba 168 (48,8 µm)			OS 169 (53,6 µm)			OA 167 (44,7 µm)			Ba 168 (48,8 µm)			OS 169 (53,6 µm)			OA 167 (44,7 µm)			Ba 168 (48,8 µm)			OS 169 (53,6 µm)		
Tupfer		153,34			142,31			118,59			123,72			155,06			179,32			152,82			145,86			141,81		
SC		8,85			8,17			20,56			8,26			11,51			13,27			9,08			9,40			12,68		
Epidermis		0,05	0,03	0,07	0,01	0,03	0,10	0,44	0,51	0,73	0,11	0,07	0,11	0,93	0,05	0,29	0,07	0,13	0,09	0,10	0,06	0,05	0,01	0,13	0,06	0,64	0,09	0,28
Dermis		0,16	0,14	0,21	0,12	0,16	0,33	1,02	1,88	1,09	1,28	0,31	1,26	1,61	0,20	0,32	0,66	1,28	1,09	0,25	0,26	0,21	1,22	0,36	0,53	1,16	0,28	0,89
Stumpf		0,19	0,13	0,11	0,65	0,60	0,65	1,46	1,55	0,61	1,06	1,03	0,91	0,44	1,17	1,15	1,13	5,85	1,50	0,42	0,89	0,52	2,49	2,34	4,11	0,49	2,75	0,48
Akzeptor		0,59			6,20			7,54			6,05			1,72			1,11			3,07			2,25			1,01		

Tabelle 42: Penetrationsergebnisse von Pal-GEKG aus der O/W-Emulsion mit 5000 ppm Peptidgehalt als relativen Anteil in den untersuchten Proben, sowie die Ergebnisse des Dunnett's Test auf signifikante Unterschiede zwischen den Versuchszeiten, sowie zwischen Pal-GEKG und GEKG in der O/W-Emulsion, n.s. = nicht signifikant für p > 0,05

5000 ppm Pal-GEKG in O/W-Emulsion	Tupfer		SC		lebende Hautschichten		Akzeptor		Epidermis		Dermis		Stumpf		WFR [%]	
	relative Menge [%]	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW
30 min	87,83	6,68	8,11	4,21	0,95	0,89	3,11	2,12	0,14	0,18	0,37	0,42	0,43	0,36	156,83	6,70
100 min	90,03	1,48	6,46	0,42	1,55	0,85	1,96	1,78	0,12	0,16	0,53	0,33	0,89	0,77	169,35	28,78
300 min	90,80	1,08	6,44	1,20	1,46	0,85	1,30	0,53	0,10	0,13	0,36	0,26	1,00	0,84	161,67	4,04
p _{30 min vs. 100 min}	n.s.		n.s.		n.s.		n.s.		n.s.		n.s.		n.s.		n.s.	
p _{100 min vs. 300 min}	n.s.		n.s.		n.s.		n.s.		n.s.		n.s.		n.s.		n.s.	
p _{30 min vs. 300 min}	n.s.		n.s.		n.s.		n.s.		n.s.		n.s.		n.s.		n.s.	
p _{30min: GEKG vs. Pal-GEKG}	n.s.		n.s.		n.s.		n.s.		n.s.		n.s.		n.s.		n.s.	
p _{100min: GEKG vs. Pal-GEKG}	n.s.		n.s.		n.s.		n.s.		n.s.		n.s.		n.s.		n.s.	
p _{300min: GEKG vs. Pal-GEKG}	n.s.		n.s.		n.s.		n.s.		n.s.		n.s.		< 0,05		n.s.	

9. Anhang

Tabelle 43: Penetrationsergebnisse von Pal-PKEK aus der O/W-Emulsion mit 5000 ppm Peptidgehalt als absoluten Anteil in % der Ausgangskonzentration in den untersuchten Proben inklusive Angabe der jeweils verwendeten Hautproben (MA = Mammahaut)

5000 ppm Pal-PKEK in O/W-Emulsion	30 Minuten									100 Minuten									300 Minuten									
	Haut (Dicke der Epidermis)	MA 94 (60,0 µm)			MA 96 (58,7 µm)			MA 97 (86,0 µm)			MA 94 (60,0 µm)			MA 96 (58,7 µm)			MA 97 (86,0 µm)			MA 94 (60,0 µm)			MA 96 (58,7 µm)			MA 97 (86,0 µm)		
Tupfer		124,55			122,95			124,85			57,50			86,75			75,75			95,72			101,96			108,66		
SC		10,84			11,12			9,96			2,46			2,31			7,88			16,88			14,64			12,07		
Epidermis	0,21	0,14	0,14	0,09	0,05	0,05	0,24	0,18	0,07	0,08	0,05	0,04	0,02	0,02	0,02	0,04	0,05	0,09	0,22	0,27	0,16	0,12	0,05	0,07	0,16	0,10	0,05	
Dermis	0,80	0,57	0,75	0,49	0,39	0,28	0,77	1,54	0,91	0,31	0,31	0,27	0,21	0,15	0,15	0,40	0,45	0,54	0,82	0,53	0,48	0,31	0,26	0,39	0,75	0,58	0,62	
Stumpf	0,58	0,55	0,21	0,62	0,37	0,25	0,41	0,67	0,32	0,46	0,24	0,24	0,35	0,35	0,11	0,32	0,10	0,24	0,80	1,96	0,51	0,15	0,19	0,34	0,22	0,57	0,38	
Akzeptor		1,25			0,79			0,63			1,16			0,93			1,44			1,93			2,65			4,24		

Tabelle 44: Penetrationsergebnisse von Pal-PKEK aus der O/W-Emulsion mit 5000 ppm Peptidgehalt als relativen Anteil in den untersuchten Proben, sowie die Ergebnisse des Dunnett's Test auf signifikante Unterschiede zwischen den Versuchszeiten, sowie zwischen Pal-PKEK und PKEK in der O/W-Emulsion, n.s. = nicht signifikant für $p > 0,05$

5000 ppm Pal-PKEK in O/W-Emulsion	Tupfer		SC		lebende Hautschichten		Akzeptor		Epidermis		Dermis		Stumpf		WFR [%]	
	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD
relative Menge [%]																
30 min	90,64	0,41	7,77	0,41	0,94	0,37	0,65	0,20	0,09	0,05	0,53	0,27	0,32	0,12	136,94	1,13
100 min	92,41	3,35	5,24	3,02	0,82	0,30	1,53	0,38	0,06	0,04	0,40	0,17	0,35	0,18	79,35	15,39
300 min	84,47	1,79	12,09	2,14	1,03	0,61	2,41	0,76	0,11	0,07	0,44	0,16	0,48	0,48	120,81	4,90
p _{30 min vs. 100 min}	n.s.		n.s.		n.s.		< 0,05		n.s.		n.s.		n.s.		n.s.	
p _{100 min vs. 300 min}	< 0,05		< 0,05		n.s.		n.s.		n.s.		n.s.		n.s.		n.s.	
p _{30 min vs. 300 min}	< 0,01		< 0,05		n.s.		< 0,05		n.s.		n.s.		n.s.		n.s.	
p _{30min: PKEK vs. Pal-PKEK}	< 0,01		n.s.		n.s.		n.s.		n.s.		n.s.		n.s.		< 0,05	
p _{100min: PKEK vs. Pal-PKEK}	< 0,01		< 0,01		< 0,01		< 0,05		< 0,01		< 0,05		< 0,05		< 0,05	
p _{300min: PKEK vs. Pal-PKEK}	< 0,05		< 0,05		< 0,01		n.s.		< 0,01		< 0,01		n.s.		n.s.	

9. Anhang

Tabelle 45: Penetrationsergebnisse von GEKG aus der ME1 mit 5000 ppm Peptidgehalt als absoluten Anteil in % der Ausgangskonzentration in den untersuchten Proben inklusive Angabe der jeweils verwendeten Hautproben (MA = Mammahaut)

5000 ppm GEKG in ME1	30 Minuten									100 Minuten									300 Minuten									
	Haut (Dicke der Epidermis)	MA 164 (60,0 µm)			MA 171 (58,7 µm)			MA 174 (86,0 µm)			MA 164 (60,0 µm)			MA 171 (58,7 µm)			MA 174 (86,0 µm)			MA 164 (60,0 µm)			MA 171 (58,7 µm)			MA 174 (86,0 µm)		
Tupfer		37,51			37,26			39,57			25,23			47,00			35,65			7,96			11,00			17,02		
SC		14,47			12,31			8,36			5,62			9,09			4,32			9,00			13,34			7,97		
Epidermis	0,17	0,04	0,21	0,01	0,10	0,08	0,05	0,02	0,05	0,23	0,08	0,08	0,09	0,24	0,11	0,04	0,03	0,05	0,19	0,10	0,10	0,22	0,17	0,09	0,29	0,23	0,14	
Dermis	0,62	0,62	3,05	0,08	1,19	0,49	1,49	0,57	0,99	3,42	1,42	1,47	1,12	4,06	1,87	0,43	0,56	0,28	5,52	1,97	1,45	2,44	1,97	1,73	2,79	0,99	1,27	
Stumpf	1,80	0,32	1,77	0,42	0,89	1,21	1,72	0,52	0,52	3,63	2,66	1,52	1,11	2,08	0,88	2,30	1,59	1,21	6,04	0,83	1,99	2,47	2,30	1,45	3,27	1,02	1,25	
Gaze		11,00			8,91			6,93			11,35			10,84			9,19			21,25			9,91			8,61		
Akzeptor		6,21			12,08			18,38			20,18			38,86			17,88			27,39			42,28			46,74		

Tabelle 46: Penetrationsergebnisse von GEKG aus der ME1 mit 5000 ppm Peptidgehalt als relativen Anteil in den untersuchten Proben inklusive Gaze, sowie die Ergebnisse des Dunnett's Test auf signifikante Unterschiede zwischen den Versuchszeiten, sowie zwischen der ME1 und O/W-Emulsion mit je 5000 ppm GEKG, n.s. = nicht signifikant für $p > 0,05$

5000 ppm GEKG in ME1	Tupfer		SC		lebende Hautschichten		Gaze		Akzeptor		Epidermis		Dermis		Stumpf		WFR [%]		
	relative Menge [%]	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD
30 min	52,14	0,97	16,09	3,97	2,87	1,84	12,28	2,63	16,61	6,86	0,11	0,09	1,37	1,16	1,39	0,83	73,11	1,83	
100 min	43,99	6,15	7,63	1,06	4,58	2,65	13,36	3,04	30,44	4,22	0,13	0,09	1,95	1,50	2,51	1,43	82,02	23,94	
300 min	15,00	4,11	12,86	3,08	5,96	3,75	17,41	9,34	48,76	8,08	0,21	0,07	2,85	1,74	2,90	2,05	78,85	6,44	
$p_{30 \text{ min vs. } 100 \text{ min}}$	n.s.	< 0,05		n.s.		n.s.		< 0,05		n.s.		n.s.		n.s.		n.s.		n.s.	
$p_{100 \text{ min vs. } 300 \text{ min}}$	< 0,01	n.s.		0,05		n.s.		< 0,01		< 0,05		< 0,05		< 0,05		n.s.		n.s.	
$p_{30 \text{ min vs. } 300 \text{ min}}$	< 0,01	< 0,05		n.s.		n.s.		< 0,05		< 0,05		< 0,05		n.s.		n.s.		n.s.	
$p_{30 \text{ min: O/W-Emulsion vs. ME}}$	< 0,01	n.s.		< 0,01		< 0,01		< 0,05		< 0,05		< 0,05		< 0,05		< 0,01		n.s.	
$p_{100 \text{ min: O/W-Emulsion vs. ME}}$	< 0,01	n.s.		n.s.		< 0,01		< 0,01		< 0,01		n.s.		< 0,05		n.s.		n.s.	
$p_{300 \text{ min: O/W-Emulsion vs. ME}}$	< 0,01	n.s.		n.s.		n.s.		n.s.		< 0,01		n.s.		n.s.		n.s.		n.s.	

9. Anhang

Tabelle 47: Penetrationsergebnisse von PKEK aus der ME1 mit 5000 ppm Peptidgehalt als absoluten Anteil in % der Ausgangskonzentration in den untersuchten Proben inklusive Angabe der jeweils verwendeten Hautproben (MA = Mammahaut)

5000 ppm PKEK in ME1	30 Minuten									100 Minuten									300 Minuten									
	Haut (Dicke der Epidermis)	MA 94 (60,0 µm)			MA 96 (58,7 µm)			MA 97 (86,0 µm)			MA 94 (60,0 µm)			MA 96 (58,7 µm)			MA 97 (86,0 µm)			MA 94 (60,0 µm)			MA 96 (58,7 µm)			MA 97 (86,0 µm)		
Tupfer		13,11			25,35			53,47			15,71			4,72			7,86			26,01			18,76			11,34		
SC		17,58			13,31			15,96			24,21			17,41			9,34			27,59			22,17			17,43		
Epidermis	0,06	0,40	0,12	0,36	0,29	0,26	0,08	0,11	0,05	0,10	0,16	0,70	0,73	0,39	0,16	0,04	0,07	0,09	0,39	0,30	0,95	2,54	0,19	1,52	0,20	0,10	0,11	
Dermis	0,22	4,57	0,37	0,35	0,53	0,60	0,59	0,66	0,57	1,36	2,40	2,69	3,62	3,03	1,27	0,75	1,05	1,17	3,80	3,29	5,20	4,17	0,99	5,18	1,98	1,43	1,73	
Stumpf	0,27	1,82	0,25	0,05	0,12	0,22	1,00	1,35	0,83	2,05	4,64	1,80	2,89	3,10	0,41	1,25	1,78	2,26	3,89	3,07	1,95	1,06	1,05	1,54	2,00	1,66	1,44	
Akzeptor		106,35			1,04			2,95			120,73			183,95			136,06			104,29			84,35			161,86		

Tabelle 48: Penetrationsergebnisse von PKEK aus der ME1 mit 5000 ppm Peptidgehalt als relativen Anteil in den untersuchten Proben, sowie die Ergebnisse des Dunnett's Test auf signifikante Unterschiede zwischen den Versuchszeiten, sowie zwischen der ME1 und O/W-Emulsion mit je 5000 ppm PKEK, n.s. = nicht signifikant für p > 0,05

5000 ppm PKEK in ME1	Tupfer		SC		lebende Hautschichten		Akzeptor		Epidermis		Dermis		Stumpf		WFR [%]	
	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD
relative Menge [%]																
30 min	47,97	29,24	22,29	8,76	2,18	1,28	27,56	36,45	0,33	0,32	1,08	0,89	0,76	0,63	84,83	50,41
100 min	5,58	3,16	9,60	3,87	2,48	1,08	82,34	7,22	0,14	0,14	1,06	0,48	1,28	0,68	177,77	29,43
300 min	11,95	4,63	14,18	3,91	3,67	1,87	70,20	9,92	0,49	0,64	1,98	1,20	1,20	0,55	163,68	31,45
p _{30 min vs. 100 min}	n.s.		n.s.		n.s.		n.s.		n.s.		n.s.		n.s.		n.s.	
p _{100 min vs. 300 min}	n.s.		n.s.		n.s.		n.s.		n.s.		n.s.		< 0,05		n.s.	
p _{30 min vs. 300 min}	n.s.		n.s.		n.s.		n.s.		n.s.		n.s.		n.s.		n.s.	
p _{30min: O/W-Emulsion vs. ME}	n.s.		n.s.		n.s.		n.s.		n.s.		n.s.		n.s.		n.s.	
p _{100min: O/W-Emulsion vs. ME}	< 0,01		< 0,01		n.s.		< 0,01		< 0,05		n.s.		n.s.		n.s.	
p _{300min: O/W-Emulsion vs. ME}	< 0,01		< 0,05		n.s.		< 0,01		n.s.		n.s.		< 0,01		n.s.	

9. Anhang

Tabelle 49: Penetrationsergebnisse von LPA, LPBG und LPT aus der ME1 mit 1 % Peptidgehalt als absoluten Anteil in % der Ausgangskonzentration in den untersuchten Proben inklusive Angabe der jeweils verwendeten Hautproben (OA = Oberarm)

1 % Peptid in ME1 absolute Menge [%]	Tupfer	SC		lebende Hautschichten		Gaze	Akzeptor	Epidermis		Dermis		Stumpf		WFR [%]	Haut
		MW	SD	MW	SD			MW	SD	MW	SD	MW	SD		
LPA	12,20	0,52	0,18	0,56	0,17	5,52	13,80	0,06	0,02	0,33	0,17	0,16	0,05	32,50	OA 178
LPBG	10,46	2,30	0,47	4,18	0,95	6,44	25,69	1,39	0,68	2,78	0,99	0,00	0,00	49,07	OA 178
LPT	19,49	6,47	2,42	14,44	5,29	15,05	10,21	3,49	1,67	10,95	4,74	0,00	0,00	65,66	OA 178

Tabelle 50: Penetrationsergebnisse des 1. Screenings von GEKG aus der unmodifizierten O/W-Emulsionen und O/W-Emulsionen mit 5 % verschiedener Penetrationenhancer, sowie aus zwei ME mit je 50 ppm Peptidgehalt als absoluten Anteil in % der Ausgangskonzentration in den untersuchten Proben inklusive Angabe der jeweils verwendeten Hautproben (OS = Oberschenkel)

50 ppm GEKG in modifizierten Formulierungen Haut (Dicke der Epidermis)	unmodifizierte O/W-Emulsion			Glycerylcaprylat/caprat (2,0 x)			Glycerylcaprylat/caprat (1,5 x)			Polyglyceryl-3-caprat			Polyglyceryl-4-laurat			Polyglyceryl-3-caprylat			PeG			2-Pyrrolidon			ME1			ME2		
	OS 177 (22,45 µm)	OS 177 (22,45 µm)	OS 177 (22,45 µm)	OS 177 (22,45 µm)	OS 177 (22,45 µm)	OS 177 (22,45 µm)	OS 177 (22,45 µm)	OS 177 (22,45 µm)	OS 177 (22,45 µm)	OS 177 (22,45 µm)	OS 177 (22,45 µm)	OS 177 (22,45 µm)	OS 177 (22,45 µm)	OS 177 (22,45 µm)	OS 177 (22,45 µm)	OS 177 (22,45 µm)	OS 177 (22,45 µm)	OS 177 (22,45 µm)	OS 177 (22,45 µm)	OS 177 (22,45 µm)	OS 177 (22,45 µm)	OS 177 (22,45 µm)	OS 177 (22,45 µm)	OS 177 (22,45 µm)	OS 177 (22,45 µm)	OS 177 (22,45 µm)	OS 177 (22,45 µm)	OS 177 (22,45 µm)	OS 177 (22,45 µm)	OS 177 (22,45 µm)
Tupfer	27,48			31,64			36,35			22,75			43,73			18,49			18,92			44,97			9,83			7,38		
SC	16,84			16,82			22,53			13,85			24,40			10,26			28,39			35,52			18,73			23,59		
Epidermis	0,01	0,00	0,20	4,12	3,26	1,20	0,24	2,48	0,11	0,33	0,15	0,25	1,64	0,24	0,08	0,27	0,08	0,04	0,46	1,23	0,09	0,29	2,80	0,20	0,17	0,23	0,05	0,21	0,03	0,03
Dermis	0,17	0,40	1,71	7,53	6,44	10,87	1,22	5,88	2,04	3,14	1,53	1,90	8,00	3,41	0,65	1,54	2,97	0,91	4,42	4,82	0,63	2,63	3,35	2,94	0,63	2,82	0,95	1,49	0,50	1,05
Stumpf	0,00	0,01	0,03	0,85	0,87	1,10	0,26	0,27	0,07	0,39	0,25	0,45	0,03	0,22	0,02	0,24	0,37	0,03	0,03	0,55	0,09	0,09	0,15	0,49	0,31	3,85	1,29	2,05	0,91	1,14
Gaze	2,26			11,94			2,23			2,97			5,87			3,32			4,16			5,99			1,36			2,25		
Akzeptor	3,16			17,31			6,55			1,99			10,08			2,23			2,65			3,92			2,39			2,82		

9. Anhang

Tabelle 51: Penetrationsergebnisse des 1. Screenings von GEKG aus O/W-Emulsionen ohne (F1) und mit 5 % verschiedener Penetrationenhancer (F2-F8), sowie aus zwei ME mit je 50 ppm Peptidgehalt als relativen Anteil in den untersuchten Proben inklusive Gaze

50 ppm GEKG in modifizierten Formulierungen	Tupfer	SC	lebende Hautschichten		Gaze	Akzeptor	Epidermis		Dermis		Stumpf		WFR [%]
			MW	SD			MW	SD	MW	SD	MW	SD	
relative Menge [%]													
unmodifizierte O/W-Emulsion	54,34	33,30	1,65	1,84	4,47	6,24	0,13	0,22	1,48	1,59	0,03	0,03	50,57
Glycerylcaprylat/ caprat (2,0 x)	35,25	18,73	13,44	1,31	13,30	19,28	3,19	1,68	9,20	2,45	1,05	0,15	89,79
Glycerylcaprylat/ caprat (1,5 x)	50,68	31,41	5,66	4,92	3,11	9,14	1,25	1,74	4,13	3,16	0,28	0,16	71,85
Polyglyceryl-3-caprat	51,31	31,23	6,28	2,06	6,70	4,48	0,54	0,19	4,92	1,78	0,82	0,23	44,35
Polyglyceryl-4-laurat	49,31	27,51	5,20	4,76	6,62	11,37	0,71	0,91	4,40	3,91	0,10	0,13	88,85
Polyglyceryl-3-caprylat	50,78	28,16	5,82	3,14	9,11	6,12	0,36	0,34	4,90	2,70	0,57	0,46	36,45
PeG	32,55	48,85	6,88	4,86	7,16	4,56	0,99	0,95	5,53	3,80	0,37	0,46	58,23
2-Pyrrolidon	47,49	37,52	4,53	1,74	6,32	4,14	1,14	1,52	3,13	0,32	0,26	0,23	34,71
ME1	27,65	52,65	9,17	7,48	3,82	6,72	0,42	0,25	3,93	2,85	4,82	4,55	35,74
ME2	19,19	61,30	6,36	2,83	5,83	7,32	0,23	0,26	2,60	1,21	3,53	1,44	38,51

9. Anhang

Tabelle 52: Penetrationsergebnisse des 2. Screenings von GEKG und Pal-GEKG aus O/W-Emulsionen ohne Penetrationenhancer (F1, F5) und von GEKG aus O/W-Emulsionen mit 5 % verschiedener Penetrationenhancer (F2-F4), sowie aus ME1 (F6) mit je 50 ppm Peptidgehalt als absoluten Anteil in % der Ausgangskonzentration in den untersuchten Proben inklusive Angabe der jeweils verwendeten Hautproben (MA = Mammahaut)

GEKG: 2. Screening		F1: unmodifizierte O/W-Emulsion									F2: Glyceryl Caprylate/Caprata (2,0 x) - weniger Öl									F3: Glyceryl Caprylate/Caprata (2,0 x) - weniger Wasser								
		MA 100 (57,86 µm)			MA 101 (80,81 µm)			MA 102 (51,60 µm)			MA 100 (57,86 µm)			MA 101 (80,81 µm)			MA 102 (51,60 µm)			MA 100 (57,86 µm)			MA 101 (80,81 µm)			MA 102 (51,60 µm)		
Haut (Dicker der Epidermis)																												
Tupfer																												
SC																												
Epidermis		0,25	0,19	0,10	0,27	1,03	1,55	0,82	0,18	0,50	0,30	0,06	0,64	0,21	0,05	0,26	0,21	0,32	1,92	0,87	1,26	0,15	0,23	0,19	0,07	1,16	0,34	0,16
Dermis		2,59	1,42	0,42	0,60	3,36	3,42	1,78	1,27	5,84	2,07	1,35	1,55	1,60	1,06	5,04	1,22	2,24	3,60	2,15	3,16	1,16	2,30	0,44	0,44	6,76	3,04	1,99
Stumpf		1,65	0,92	0,08	0,33	0,14	0,57	1,23	6,98	1,42	1,45	0,44	0,44	0,75	1,87	3,48	0,96	1,60	0,97	0,63	0,59	0,11	0,71	0,22	0,37	2,42	2,47	1,69
Gaze																												
Akzeptor																												
GEKG: 2. Screening		F4: Glyceryl Caprylate/ Caprate (1,5 x)									F5: unmodifizierte O/W-Emulsion mit Pal-GEKG									F6: ME1								
		MA 100 (57,86 µm)			MA 101 (80,81 µm)			MA 102 (51,60 µm)			MA 100 (57,86 µm)			MA 101 (80,81 µm)			MA 102 (51,60 µm)			MA 100 (57,86 µm)			MA 101 (80,81 µm)			MA 102 (51,60 µm)		
Haut (Dicker der Epidermis)																												
Tupfer																												
SC																												
Epidermis		0,02	0,03	0,18	0,76	0,09	1,62	2,08	8,48	6,04	1,73	1,61	1,29	0,07	0,02	0,59	0,01	0,06	0,06	0,43	0,13	0,16	0,28	0,46	0,54	2,88	2,34	2,11
Dermis		0,10	0,35	0,78	2,09	0,45	1,92	5,92	5,20	6,01	0,53	4,37	2,94	0,23	0,20	2,22	0,13	0,65	0,22	1,58	1,16	0,85	0,81	3,08	2,94	6,84	4,08	9,51
Stumpf		0,02	0,05	0,03	1,37	0,46	0,54	0,66	0,42	2,77	0,33	2,85	0,67	0,46	1,04	1,75	0,34	0,21	0,09	0,10	0,28	0,09	0,18	0,22	4,66	0,78	1,10	2,42
Gaze																												
Akzeptor																												

9. Anhang

Tabelle 53: Penetrationsergebnisse des 2. Screenings von GEKG und Pal-GEKG aus O/W-Emulsionen ohne Penetrationenhancer (F1, F5) und von GEKG aus O/W-Emulsionen mit 5 % verschiedener Penetrationenhancer (F2-F4), sowie aus ME1 (F6) mit je 50 ppm Peptidgehalt als relativen Anteil in den untersuchten Proben inklusive Gaze; Ergebnisse des Dunnett's Test auf signifikante Unterschiede zwischen den Formulierungen

50 ppm GEKG in modifizierten Formulierungen	Tupfer		SC		lebende Hautschichten		Gaze		Akzeptor		Epidermis		Dermis		Stumpf		WFR [%]	
	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW		MW	SD	MW	SD	MW	SD		
F1: unmodifizierte O/W-Emulsion	62,39	16,68	21,97	16,42	5,98	3,42	5,18	2,91	4,48	2,73	0,82	0,83	3,26	2,36	1,90	2,58	71,21	9,89
F2: Glyceryl Caprylate/Caprate (2,0 x) - weniger Öl	50,89	5,88	35,37	4,81	5,01	2,35	3,82	0,53	4,91	2,95	0,56	0,69	2,79	1,38	1,66	1,02	77,44	12,08
F3: Glyceryl Caprylate/Caprate (2,0 x) - weniger Wasser	41,94	5,71	28,89	9,53	4,61	3,33	11,66	5,68	12,90	10,97	0,59	0,57	2,82	2,12	1,20	1,05	83,07	4,10
F4: Glyceryl Caprylate/Caprate (1,5 x)	42,16	5,26	40,53	4,10	6,35	6,66	7,33	2,60	3,64	1,83	2,50	3,52	3,05	2,88	0,81	1,00	76,24	17,05
F5: unmodifizierte O/W-Emulsion mit Pal-GEKG	60,59	4,04	29,73	4,10	4,79	4,68	4,52	0,21	0,37	0,13	1,06	1,28	2,22	2,55	1,50	1,48	53,80	4,67
F6: ME1	13,20	4,27	46,88	10,32	12,95	8,14	10,07	2,52	16,90	8,05	2,17	1,55	7,92	4,28	2,86	4,84	38,32	16,56
p < 0,05			F5 vs. F4		F1 vs. F6 F2 vs. F6 F3 vs. F6		F2 vs. F6 F5 vs. F6		F5 vs. F6		F1 vs. F6 F2 vs. F6 F3 vs. F6		F1 vs. F6 F4 vs. F6					
p < 0,01			F1 vs. F6 F2 vs. F6 F3 vs. F5 F3 vs. F6 F4 vs. F5 F4 vs. F6 F5 vs. F6										F2 vs. F6 F3 vs. F6 F5 vs. F6					

9. Anhang

Tabelle 54: Penetrationsergebnisse des 1. Screenings von PKEK aus O/W-Emulsionen ohne (F1) und mit 5 % verschiedener Penetrationenhancer (F2-F6), sowie aus zwei ME mit je 40 ppm Peptidgehalt als absoluten Anteil in % der Ausgangskonzentration in den untersuchten Proben inklusive Angabe der jeweils verwendeten Hautproben

40 ppm PKEK in modifizierten Formulierungen	F1: unmodifizierte O/W-Emulsion		F2: Glyceryl Caprylate/ Caprate (2,0 x)				F3: Glyceryl Caprylate/ Caprate (1,5 x)				F4: Polyglyceryl-3 Caprate				F5: Pentylene Glycol				F6: 2-Pyrrolidone				ME1		ME2	
	Haut (Dicke der Epidermis) ← ————— Oberschenkel 169 und Bauch 168 (51,2 µm) ————— →																									
Tupfer	14,40		17,15				17,20				1,12				5,36				0,11				0,13		1,54	
SC	5,23		5,64				8,28				21,21				37,51				34,32				14,31		18,12	
Epidermis	0,15	0,02	0,02	0,07	0,09	0,02	0,02	0,01	0,02	0,15	0,26	0,07	0,06	0,03	0,06	0,15	0,49	0,69	0,13	0,08	0,09	0,21	0,73	0,25		
Dermis	3,14	0,18	0,19	0,14	0,17	0,13	0,56	0,68	0,30	0,57	1,53	0,63	0,66	0,61	0,26	0,95	1,70	2,75	4,02	2,23	3,57	7,11	7,68	4,93		
Stumpf	1,70	0,30	0,17	0,16	0,04	0,15	1,44	0,89	0,57	0,06	0,13	0,16	0,08	0,32	0,04	0,34	0,40	0,55	3,08	2,26	1,22	7,07	3,40	1,85		
Gaze	2,42		0,52				1,23				16,45				4,10				14,38				37,85		21,94	
Akzeptor	0,83		0,07				0,86				5,26				2,84				36,14				28,33		49,26	

Tabelle 55: Penetrationsergebnisse des 1. Screenings von PKEK aus O/W-Emulsionen ohne (F1) und mit 5 % verschiedener Penetrationenhancer (F2-F6), sowie aus zwei ME mit je 40 ppm Peptidgehalt als relativen Anteil in den untersuchten Proben inklusive Gaze

40 ppm PKEK in modifizierten Formulierungen	Tupfer	SC	lebende Hautschichten		Gaze	Akzeptor	Epidermis		Dermis		Stumpf		WFR [%]
			MW	SD			MW	SD	MW	SD	MW	SD	
F1: unmodifizierte O/W-Emulsion	58,40	21,22	7,22	9,25	9,81	3,35	0,23	0,26	4,29	6,04	2,71	2,97	24,82
F2: Glyceryl Caprylate/ Caprate (2,0 x)	72,35	23,82	1,36	0,18	2,19	0,28	0,25	0,17	0,63	0,07	0,48	0,29	23,70
F3: Glyceryl Caprylate/ Caprate (1,5 x)	59,18	28,51	5,11	1,88	4,23	2,97	0,05	0,03	1,75	0,64	3,31	1,46	29,07
F4: Polyglyceryl-3 Caprate	2,48	46,91	2,61	1,35	36,38	11,63	0,35	0,20	2,00	1,15	0,25	0,11	45,22
F5: Pentylene Glycol	10,62	74,24	1,40	0,60	8,12	5,61	0,11	0,03	1,00	0,42	0,29	0,29	50,52
F6: 2-Pyrrolidone	0,12	39,17	3,04	1,41	16,42	41,25	0,50	0,30	2,04	1,00	0,49	0,12	87,63
ME1	0,15	16,61	6,43	1,56	43,93	32,88	0,11	0,03	3,79	1,03	2,53	1,04	86,17
ME2	1,51	17,79	10,79	3,31	21,55	48,37	0,39	0,28	6,42	1,26	3,97	2,48	101,93

9. Anhang

Tabelle 56: Penetrationsergebnisse des 2. Screenings von PKEK aus verschiedenen O/W-Emulsionen ohne Penetrationenhancer (F1, F4, F5), aus verschiedenen O/W-Emulsionen mit 5 % Polyglycerol-3 Caprate (F1-F3), sowie mit 5 % Soluphor P mit je 40 ppm Peptidgehalt als absoluten Anteil in % der Ausgangskonzentration in den untersuchten Proben inklusive Angabe der jeweils verwendeten Hautproben (MA = Mammahaut)

40 ppm PKEK in modifizierten Formulierung	F1: Polyglycerol-3 Caprate in O/W-Emulsion 1									F2: Polyglycerol-3 Caprate O/W-Emulsion 2									F3: Polyglycerol-3 Caprate in O/W-Emulsion 3									
	Haut (Dicke der Epidermis)			MA 100 (57,86 µm)	MA 101 (80,81 µm)			MA 102 (51,60 µm)			MA 100 (57,86 µm)			MA 101 (80,81 µm)			MA 102 (51,60 µm)			MA 100 (57,86 µm)			MA 101 (80,81 µm)			MA 102 (51,60 µm)		
Tupfer				20,51	14,20			16,93			10,70			9,40			8,05			8,30			11,24			4,51		
SC				32,43	60,90			49,53			26,47			14,33			16,02			13,71			11,58			12,48		
Epidermis	0,24	1,02	0,03	1,73	3,46	5,65	0,40	0,50	0,11	0,06	0,65	0,62	0,01	0,02	0,21	0,27	0,15	0,09	0,03	0,12	0,05	3,62	4,36	3,26	0,17	0,48	0,47	
Dermis	1,88	3,71	0,52	4,73	10,89	21,26	4,50	4,94	0,81	1,05	3,25	2,30	0,10	0,05	3,76	1,19	0,55	0,73	0,82	0,64	0,19	5,19	6,00	13,88	0,84	1,06	1,29	
Stumpf	0,56	1,35	1,10	2,31	1,38	1,23	21,09	5,75	0,38	4,36	1,23	0,91	0,12	0,08	0,23	0,59	0,09	0,11	0,37	0,24	0,03	1,84	1,62	6,59	0,16	0,08	0,11	
Gaze				3,47	3,23			2,88			3,43			1,76			1,66			0,67			0,51			0,51		
Akzeptor				3,33	6,53			3,49			7,62			1,53			1,60			0,48			0,45			0,76		
40 ppm PKEK in modifizierten Formulierung	F4: O/W-Emulsion 2 (ohne Enhancer)									F5: O/W-Emulsion 3 (ohne Enhancer)									F6: 2-Pyrrolidone in O/W-Emulsion 1									
	Haut (Dicke der Epidermis)			MA 100 (57,86 µm)	MA 101 (80,81 µm)			MA 102 (51,60 µm)			MA 100 (57,86 µm)			MA 101 (80,81 µm)			MA 102 (51,60 µm)			MA 100 (57,86 µm)			MA 101 (80,81 µm)			MA 102 (51,60 µm)		
Tupfer				4,16	11,57			9,46			6,83			3,91			6,66			26,93			20,28			0,90		
SC				41,54	29,91			42,16			12,72			17,38			10,46			40,88			61,10			101,08		
Epidermis	31,43	6,13	4,23	0,20	0,07	0,11	4,03	3,81	0,42	1,86	0,52	0,16	0,00	0,07	0,13	0,04	0,36	0,56	0,64	1,10	1,50	1,34	1,82	0,31	1,49	0,42	5,62	
Dermis	19,23	19,90	19,83	1,05	0,75	1,75	7,15	5,26	5,76	3,74	2,38	0,74	0,12	0,96	0,74	2,77	0,67	0,70	8,25	11,89	2,75	7,38	6,01	3,44	6,73	1,63	4,65	
Stumpf	5,22	2,46	1,03	0,84	2,69	0,22	14,60	14,60	14,60	1,85	0,65	0,57	0,19	0,12	0,34	2,09	0,30	1,08	7,25	12,76	1,32	1,96	0,95	1,42	0,58	0,50	1,18	
Gaze				3,55	4,17			0,52			4,01			0,46			0,38			4,48			4,21			23,55		
Akzeptor				8,21	1,92			0,97			6,60			0,31			0,57			6,77			2,24			2,46		

9. Anhang

Tabelle 57: Penetrationsergebnisse des 2. Screenings von PKEK aus verschiedenen O/W-Emulsionen ohne Penetrationenhancer (F1, F4, F5), aus verschiedenen O/W-Emulsionen mit 5 % Polyglycerol-3 Caprate (F1-F3), sowie mit 5 % Soluphor P mit je 40 ppm Peptidgehalt als relativen Anteil in den untersuchten Proben inklusive Gaze; Ergebnisse des Dunnett's Test auf signifikante Unterschiede zwischen den Formulierungen

40 ppm PKEK in modifizierten Formulierungen	Tupfer		SC		lebende Hautschichten		Gaze		Akzeptor		Epidermis		Dermis		Stumpf		WFR [%]		
	relative Menge [%]	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD
F1: Polyglycerol-3 Caprate in O/W-Emulsion 1	22,16	8,35	56,60	6,48	11,94	9,02	4,03	1,15	5,27	1,08	1,49	1,71	6,19	5,59	4,26	6,67	83,76	18,82	
F2: Polyglycerol-3 Caprate in O/W-Emulsion 2	27,14	5,78	52,13	3,63	6,12	4,51	6,16	0,39	8,45	4,45	0,56	0,46	3,74	3,65	1,82	2,49	36,72	12,30	
F3: Polyglycerol-3 Caprate in O/W-Emulsion 3	28,88	5,71	50,10	15,41	16,45	17,22	2,23	0,70	2,35	1,20	4,00	4,67	9,33	9,27	3,13	4,44	27,68	9,56	
F4: O/W-Emulsion 2 (ohne Enhancer)	13,32	8,08	53,31	7,52	24,42	15,73	4,28	3,34	4,67	3,45	5,71	8,69	10,55	8,72	8,16	8,35	73,53	20,93	
F5: O/W-Emulsion 3 (ohne Enhancer)	23,02	7,06	54,42	17,20	9,57	6,96	5,19	4,95	7,80	8,71	1,40	1,61	5,13	3,79	3,04	2,83	26,06	6,50	
F6: 2-Pyrrolidone in O/W-Emulsion 1	16,80	12,62	60,56	13,99	10,02	6,84	8,84	6,42	3,78	2,60	1,39	1,14	5,57	3,16	3,06	4,07	108,84	20,87	
p < 0,05					F4 vs. F5 F4 vs. F6		F1 vs. F2		F1 vs. F3		F2 vs. F3		F2 vs. F4		F2 vs. F4				
p < 0,01					F2 vs. F4		F2 vs. F3												

10. Publikationsliste

Beiträge in Fachzeitschriften

R.H.H. Neubert, S. Sonnenberger, B. Dobner, C.W. Gray Jr., K.N. Barger, K. Sevi-Maxwell, E. Sommer, J. Wohlrab: Controlled Penetration of a Novel Dimeric Ceramide into and across the Stratum Corneum Using Microemulsions and Various Types of Semisolid Formulations, *Skin Pharmacol Physiol* 29 (2016) 130-134

J. Wohlrab, R.H.H. Neubert, E. Sommer, J. Michael: *Ex vivo* Cutaneous Bioavailability of Topical Mometasone Furoate in an O/W Preparation, *Skin Pharmacol Physiol* 29 (2016) 273-279

J. Wohlrab, R.H.H. Neubert, E. Sommer, J. Michael: Clotrimazol und Ciclopiroxolamin jeweils in Kombination mit Methylprednisolonaceponat in magistralen Rezepturen, *Der Hautarzt* 68 (2017) 307-315

R. H. H. Neubert, E. Sommer, M. Schölzel, B. Tuchscherer, Y. Mrestani, J. Wohlrab: Dermal peptide delivery using enhancer molecules and colloidal carrier systems. Part II: Tetrapeptide PKEK, *Eur J Pharm Biopharm* (eingereicht)

Tagungsbeiträge

E. Busse, A. S. B. Goebel, R. H. H. Neubert:
Colloidal carrier systems for enhanced cutaneous delivery of peptide; *12th International Conference on Perspectives in Percutaneous Penetration, La Grande Motte, France; 2010* (Poster)

E. Busse, H. H. Rüttinger, R. H. H. Neubert:
Analytical methods for quantification of small-sized, highly hydrophilic peptides; *Skin Forum 12th Annual Meeting, Frankfurt (Main), Germany; 2011* (Poster)

E. Busse, J. Wohlrab, R. H. H. Neubert:
Investigations on dermal stability and penetration behavior of peptides; *Gordon Research Conference – Barrier Function of Mammalian Skin, Waterville Valley Resort, USA; 2011* (Poster)

E. Busse, J. Wohlrab, M. Farwick, R. H. H. Neubert:
The effect of formulation and chemical modification on *ex vivo* penetration behavior of peptides; *13th International Conference on Perspectives in Percutaneous Penetration, La Grande Motte, France; 2012* (Poster)

E. Busse, A. Elpelt, Y. Mrestani, M. Mentel, M. Farwick, R. H. H. Neubert:
Investigations of interactions between tetrapeptides and enhancers using capillary electrophoresis, *7th Polish-German Symposium on Pharmaceutical Sciences "Interdisciplinary research for pharmacy"*, Gdańsk, Poland; 2013 (Poster)

E. Busse, J. Wohlrab, M. Mentel, M. Farwick, R. H. H. Neubert:
Dermal penetration enhancement of the tetrapeptide PKEK by employing both chemical and formulation modification; *Skin Forum 13th Annual Meeting, London, UK*; 2013
(Vortrag und Poster)

E. Busse, J. Wohlrab, M. Mentel, M. Farwick, R. H. H. Neubert:
Dermal penetration enhancement of tetrapeptides using different approaches; *Gordon Research Conference – Barrier Function of Mammalian Skin, Waterville Valley Resort, USA*; 2013 (Poster)

11. Danksagung

Am Gelingen dieser Arbeit waren zahlreiche Menschen beteiligt, denen ich an dieser Stelle herzlich danken möchte.

Zuerst gebührt mein Dank Herrn Prof. Dr. Dr. Reinhard H. H. Neubert für die Überlassung der spannenden Thematik, seine beständige Unterstützung, sowie die stets konstruktiven Diskussionen.

Herrn Prof. Dr. Johannes Wohlrab ermöglichte die zahlreichen Penetrationsstudien und HET-CAM-Versuche, die mit Unterstützung von Frau Claudia Bruhne, Frau Ursula Schramm, Frau Sylke Faßhauer und Frau Karin Hölsken umgesetzt wurden. Ich danke dem gesamten Team und Herrn Prof. Dr. Johannes Wohlrab insbesondere für die ständige Diskussionsbereitschaft und seine hilfreichen Anregungen zur Interpretation der Ergebnisse.

Für die gewinnbringende Zusammenarbeit danke ich Herrn Dr. Mike Farwick und Herrn Dr. Matthias Mentel von der Evonik Industries AG, sowie Herrn Dr. Michael Soeberdt, Herrn Dr. Ulrich Knie und Herrn Prof. Dr. Christoph Abels von der Dr. August Wolff GmbH & Co. KG. Der Evonik Industries AG danke ich insbesondere für die Bereitstellung des radioaktiven Materials, ohne das der Großteil der Penetrationsversuche nicht hätte umgesetzt werden können.

Mein herzlichster Dank gilt Frau Manuela Woigk, die mir durch zahlreiche praktische Hinweise die Einarbeitung im Labor erleichtert hat und mich bei den HPLC-Messungen kompetent unterstützt hat. Außerdem danke ich Anke Nies und Heike Rudolf für die technische Unterstützung im Labor und Herrn Dr. Yahya Mrestani für die Hilfe bei den CE-Messungen.

Bei der physikochemischen Charakterisierung der Mikroemulsionen waren mir verschiedene Arbeitsgruppen behilflich. Frau Kerstin Schwarz aus der Arbeitsgruppe Pharmazeutische Technologie danke ich für die Durchführung der DSC-Messungen, Herrn Dr. Klaus Schröter und Frau Katrin Herfurt vom Institut für Physik für die Durchführung der rheologischen Untersuchungen und Herrn Dr. Karsten Busse vom Institut für Chemie für die äußerst hilfreiche Unterstützung bei der Durchführung und Auswertung der Lichtstreuexperimente.

Herrn Prof. Dr. Andreas Wienke vom Institut für Medizinische Epidemiologie, Biometrie und Informatik, sowie Herrn Dr. Hendrik Metz danke ich für ihre nützlichen Hinweise zur statistischen Auswertung der Penetrationsdaten.

11. Danksagung

Ein großes Dankeschön geht auch an Herrn Dieter Reese und seine Mitarbeiter der feinmechanischen Werkstatt für die Anfertigung hilfreicher Gegenstände, die mir die Arbeit im Labor erleichterten.

Darüber hinaus danke ich allen Kollegen der Arbeitsgruppe Biopharmazie für die sehr angenehme Arbeitsatmosphäre und gute Zusammenarbeit, sowie die ständige Hilfsbereitschaft. Namentlich genannt seien Frau Dr. Alexandra Reuhl, die mir bei der Einarbeitung in die Thematik hilfreich zur Seite stand, sowie Frau Dr. Sandy Naumann, der ich zahlreiche produktive Diskussionen, wertvolle Anregungen und eine unvergessliche Zeit im Labor und darüber hinaus verdanke. Auch Frau Dr. Annett Schröter, Frau Josefine Müller und Frau Adina Eichner danke ich für den fachlichen Austausch und insbesondere Frau Adina Eichner für die kritische und sorgfältige Durchsicht des Manuskripts. Ich bin dankbar für die entstandenen Freundschaften, die ich nicht mehr missen möchte.

Ein besonderes Dankeschön gilt meiner Familie und meinen Freunden, die mich stets motiviert haben. Meinen Eltern danke ich für ihre uneingeschränkte Unterstützung. Ihr habt immer an mich geglaubt und gebt mir viel Kraft. Den größten Dank schulde ich meinem Mann und meinem Sohn, die viele Stunden auf mich verzichten mussten. Robert, du hast mich immer in meinem Tun bestärkt und ich bin dir dankbar, dass du mich stets herausforderst, kritisch und neugierig zu bleiben.

12. Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name: Elfi Sommer (geb. Busse)
Geburtsdatum, -ort: 5. März 1984 in Magdeburg
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: verheiratet, ein Kind

Schulbildung

07/2014 Allgemeine Hochschulreife
1998 – 2004 Albert-Einstein-Gymnasium in Magdeburg
1995 – 1998 Integrierte Gesamtschule „Willy Brandt“ in Magdeburg
1991 – 1995 Grundschule „Am Westring“ in Magdeburg

Akademische Ausbildung

12/2009 Erteilung der Approbation als Apothekerin
11/2009 Dritter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
10/2008 Zweiter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
08/2006 Erster Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
10/2004 – 10/2008 Studium der Pharmazie an der Martin-Luther-Universität
Halle Wittenberg

Berufserfahrung

Seit 10/2013 **Skinomics GmbH in Halle (Saale)**
Projektmanagerin Galenik
04/2010 – 03/2014 **AG Biopharmazie, Martin-Luther-Universität Halle Wittenberg**
Wissenschaftliche Mitarbeiterin, Promotionsstudentin
11/2009 – 03/2010 **Universitätsklinik und Poliklinik für Dermatologie und
Venerologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg**
Wissenschaftliche Mitarbeiterin
05/2009 – 11/2009 **Paulus-Apotheke in Halle (Saale)**
Pharmaziepraktikantin
11/2008 – 01/2009 **AG Biopharmazie, Martin-Luther-Universität Halle Wittenberg**
Pharmaziepraktikantin
10/2007 – 06/2008 **AG Biopharmazie, Martin-Luther-Universität Halle Wittenberg**
Studentische Hilfskraft

13. Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe. Die den Werken wörtlich und inhaltlich entnommenen Stellen habe ich als solche kenntlich gemacht.

Ich versichere, dass ich diese Arbeit bisher an keiner anderen Universität oder Hochschule im In- und Ausland vorgelegt habe.

Magdeburg, 28. November 2017

Elfi Sommer