

Dissertation

Entwicklung und Charakterisierung von Trägersystemen zur dermalen Immuntherapie mit Hymenopterenallergenen

Zur Erlangung des akademischen Grades Doktor der Naturwissenschaften

- Dr. rer. nat. -

Der naturwissenschaftlichen Fachbereiche

(Fachbereich 08 – Biologie und Chemie)

der Justus-Liebig-Universität

vorgelegt von:

Christopher Kiselmann, geb. Sack

aus Heuchelheim

Heuchelheim, 2019

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit Mai 2015 – Dezember 2018 am Institut für Bioverfahrenstechnik und Pharmazeutische Technologie der Technischen Hochschule Mittelhessen unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. Frank Runkel angefertigt.

Eidesstattliche Erklärung nach § 17 Abs. 2 Nr. 1 der Promotionsordnung

Ich erkläre: Ich habe die vorliegende Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfsmitteln angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Ich stimme einer evtl. Überprüfung meiner Dissertation durch eine Antiplagiat-Software zu. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Ort, Datum

Unterschrift

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits vorab veröffentlicht:

Kiselmann C, Dobler D, Schmidts T et al (2018) Development of a skin-friendly microemulsion for dermal allergen-specific immunotherapy. International journal of pharmaceutics 550(1-2): 463–469

*Für Lieselotte, Steffi,
Ernst und Ludwig ****

1	Theoretische Grundlagen	- 10 -
1.1	Insektenstichallergien	- 10 -
1.1.1	Funktion und Eigenschaften von Api m 1.....	- 11 -
1.1.2	Pathogenese der allergischen Insektenstichreaktionen.....	- 11 -
1.1.3	Therapiemöglichkeiten allergischer Reaktionen vom Soforttyp	- 13 -
1.1.4	Therapieformen der allergenspezifischen Immuntherapie	- 14 -
1.1.5	Immunologische Mechanismen der allergenspezifischen Immuntherapie ..	- 16 -
1.1.5.1	Funktion der epidermalen Langerhans-Zellen	- 17 -
1.2	Aufbau und Funktion der Haut.....	- 18 -
1.2.1	Aufbau der Epidermis	- 20 -
1.2.1.1	Differenzierung von Keratinozyten und Aufbau der Hautbarriere.....	- 25 -
1.2.1.2	Überwinden der dermalen Barriere.....	- 27 -
1.3	Dermale Applikationsformen.....	- 29 -
1.3.1	Mikroemulsionen und Mikroemulsion-basierte Organogelee	- 29 -
1.3.2	Hydrogele	- 32 -
1.4	Zielsetzung	- 33 -
2	Material und Methoden	- 35 -
2.1	Material.....	- 35 -
2.1.1	Chemikalien, Proteine, Reagenzien.....	- 35 -
2.1.2	Verbrauchsmaterialien.....	- 38 -
2.1.3	Geräte.....	- 40 -
2.2	Methoden.....	- 43 -
2.2.1	Herstellungsmethoden.....	- 43 -
2.2.1.1	Herstellung des PBS-Puffer.....	- 43 -
2.2.1.2	Herstellung von Alexa Fluor™ 647-markiertem Api m 1.....	- 43 -
2.2.1.3	Identifizierung von Mikroemulsionen mittels PDMPD	- 44 -
2.2.1.4	Herstellung der finalen Mikroemulsion.....	- 44 -
2.2.1.5	Herstellung der Mikroemulsion-basierten Organogelee.....	- 45 -
2.2.1.6	Herstellung der Poloxamergele.....	- 45 -
2.2.1.7	Herstellung der Hyaluronsäuregele	- 46 -
2.2.1.8	Herstellung der hyaluronsäuremodifizierten Poloxamergele.....	- 47 -
2.2.1.9	Herstellung der Hydrogele für die Lagerungsstabilitätsuntersuchung.....	- 48 -
2.2.2	Charakterisierungsmethoden.....	- 50 -

2.2.2.1	Messung der optischen Dichte.....	- 50 -
2.2.2.2	Dynamische Lichtstreuung.....	- 50 -
2.2.2.3	Viskositätsbestimmung	- 50 -
2.2.2.4	Rheologische Untersuchungen.....	- 51 -
2.2.2.5	Keimbelastungstest	- 52 -
2.2.2.6	Lichtmikroskopische Untersuchungen der MBO	- 52 -
2.2.3	Ablauf der Lagerungsstabilitätsuntersuchungen	- 53 -
2.2.3.1	Ablauf der Lagerungsstabilitätsuntersuchung der Mikroemulsion.....	- 53 -
2.2.3.2	Ablauf der Lagerungsstabilitätsuntersuchung der MBO.....	- 53 -
2.2.3.3	Ablauf der Lagerungsstabilitätsuntersuchung der Hydrogele 1-4	- 53 -
2.2.4	Analytik	- 54 -
2.2.4.1	HPLC-Analytik von Api m 1.....	- 54 -
2.2.4.2	Aufarbeitung von Api m 1 aus Mikroemulsion mit Rotationsfiltern	- 55 -
2.2.4.3	Aufarbeitung von Api m 1 aus Mikroemulsion mit org. Lösungsmittel.....	- 56 -
2.2.4.4	Bestimmung von Validierungsparametern	- 57 -
2.2.4.5	SDS-PAGE	- 58 -
2.2.5	Penetrationsuntersuchungen	- 59 -
2.2.5.1	Probengewinnung	- 59 -
2.2.5.2	Herstellung von Kryoschnitten	- 60 -
2.2.5.3	Auswertung der Penetration	- 60 -
3	Ergebnisse und Diskussion.....	- 61 -
3.1	Formulierungsentwicklung, -charakterisierung und Lagerungsstabilität.....	- 61 -
3.1.1	Entwicklung von Mikroemulsionen	- 62 -
3.1.1.1	Testung geeigneter Konservierungsmittel.....	- 66 -
3.1.1.2	Stabilitätsuntersuchung der Mikroemulsion	- 69 -
3.1.2	Entwicklung und Charakterisierung von Mikroemulsion-basierten Organogelen	- 74 -
3.1.2.1	Screening geeigneter Gelbildner	- 74 -
3.1.2.2	Rheologische Untersuchungen der Stabilität der Mikroemulsion-basierten Organogelee	- 80 -
3.1.2.3	Mikroskopische Untersuchung der Mikroemulsion-basierten Organogelee ..	- 95 -
3.1.3	Entwicklung und Charakterisierung von Hydrogelen	- 97 -
3.1.3.1	Entwicklung von Hydrogelen auf Poloxamerbasis	- 97 -

3.1.3.2	Entwicklung von Hyaluronsäuregelen	- 102 -
3.1.3.3	Einfluss von Hyaluronsäure auf die Gelstärke und die Gelierungstemperatur von Poloxamergelen	- 105 -
3.1.4	Rheologische Untersuchungen der Lagerungsstabilität geeigneter Hydrogele	- 108 -
3.1.4.1	Rheologische Untersuchungen der Stabilität hyaluronsäuremodifizierter Poloxamergele (Hydrogel 1 und Hydrogel 2)	- 109 -
3.1.4.2	Rheologische Untersuchungen der Stabilität der Hyaluronsäuregele (Hydrogel 3 und Hydrogel 4).....	- 120 -
3.1.5	Zwischenfazit: Formulierungsentwicklung und -charakterisierung	- 130 -
3.2	Konfokalmikroskopische Penetrationsuntersuchungen	- 131 -
3.2.1	Penetration von Api m 1 nach achtstündiger Applikationsdauer.....	- 131 -
3.2.2	Penetration von Api m 1 nach 24-stündiger Applikationsdauer.....	- 137 -
3.2.3	Zwischenfazit der Penetrationsuntersuchungen	- 139 -
3.3	Entwicklung einer Api m 1 Analytik.....	- 141 -
3.3.1	Entwicklung einer RP-HPLC Methode	- 141 -
3.3.1.1	Optimierung der Flussrate und der Säulenofentemperatur	- 144 -
3.3.1.2	Optimierung des Gradientenverlaufs	- 145 -
3.3.1.3	Zwischenfazit der HPLC-Methodenentwicklung.....	- 151 -
3.3.2	Entwicklung einer Probenaufarbeitung von Api m 1 aus Mikroemulsion... -	152 -
3.3.2.1	Extraktion von Api m 1 durch Ultrafiltration	- 152 -
3.3.2.2	Probenaufarbeitung mit Hilfe von organischen Lösungsmittel	- 157 -
3.3.2.3	Zusammenfassung der Api m 1 Aufarbeitung aus Mikroemulsion	- 163 -
3.3.3	Bestimmung von Validierungsparametern	- 165 -
3.3.3.1	Spezifität.....	- 165 -
3.3.3.2	Linearität, LOD, LOQ	- 167 -
3.3.3.3	Wiederholpräzision, Richtigkeit.....	- 168 -
3.3.3.4	Zusammenfassung: Analytik und Aufarbeitung von Api m 1	- 169 -
3.3.4	Stabilitätsuntersuchungen von Api m 1	- 170 -
3.3.4.1	Bestimmung eines Referenzstandards	- 170 -
3.3.4.2	Stabilitätsuntersuchungen von Api m 1 in Mikroemulsion	- 172 -
4	Fazit und Ausblick.....	- 176 -
5	Zusammenfassung	- 180 -
6	Abstract.....	- 182 -

7	Abkürzungsverzeichnis	- 183 -
8	Abbildungsverzeichnis	- 185 -
9	Tabellenverzeichnis	- 203 -
10	Formelverzeichnis.....	- 208 -
11	Anhang	- 209 -
I.	Ergebnisse des Keimbelastungstests	- 209 -
II.	Viskositätsbestimmung der Mikroemulsion	- 212 -
III.	Messparameter der Amplituden-, Frequenz- und Temperatursweeps.....	- 213 -
IV.	Rheogramme: Entwicklung eines MBO	- 218 -
V.	Rheogramme: Lagerungsstabilitätsuntersuchung von MBO 16 und MBO 18.....	- 224 -
VI.	Rheogramme: Entwicklung eines Hydrogels auf Poloxamerbasis	- 232 -
VII.	Rheogramme: Entwicklung eines Hydrogels auf Hyaluronsäurebasis.....	- 237 -
VIII.	Rheogramme: Entwicklung hyaluronsäuremodifizierter Poloxamergele ...	- 240 -
IX.	Rheogramme: Lagerungsstabilitätsuntersuchung von Hydrogel 1.....	- 244 -
X.	Rheogramme: Lagerungsstabilitätsuntersuchung von Hydrogel 2.....	- 250 -
XI.	Rheogramme: Lagerungsstabilitätsuntersuchung von Hydrogel 3.....	- 256 -
XII.	Rheogramme: Lagerungsstabilitätsuntersuchung von Hydrogel 4.....	- 263 -
XIII.	Chromatogramme von Api m 1 in PBS	- 270 -
XIV.	Chromatogramme: HPLC-Methodenentwicklung.....	- 275 -
XV.	Chromatogramme von Api m 1 in PBS, Methodenverkürzung 1.....	- 276 -
XVI.	Methodenentwicklung der Fällung von Api m 1 mit org. Lösungsmitteln ..	- 281 -
XVII.	Kalibriergerade von Api m 1.....	- 284 -
XVIII.	SDS-PAGE von Stabilitätsproben von Api m 1 in Mikroemulsion	- 285 -
12	Literaturverzeichnis.....	- 286 -
13	Publikationsliste	- 304 -
14	Lebenslauf	- 306 -
15	Danksagung.....	- 307 -

1 Theoretische Grundlagen

Das nachfolgende Kapitel gliedert sich in drei Teilbereiche. Im ersten Teilbereich werden Insektenstichallergien und deren Pathogenese erläutert. Ein besonderer Fokus liegt dabei auf Api m 1, einem Majorallergen der europäischen Honigbiene (*Apis mellifera*). Darüber hinaus werden die Therapiemöglichkeiten einer allergischen Reaktion vom Soforttyp vorgestellt. Dabei geht diese Arbeit näher auf die Möglichkeiten einer immunspezifischen Immuntherapie, sowie deren immunologische Mechanismen ein. Der zweite Abschnitt dieses Kapitels befasst sich mit dem Aufbau und der Funktion der Haut. Auf den Aufbau der physikalischen Hautbarriere wird aufgrund ihrer Relevanz für eine dermale Applikation besonders eingegangen. Im dritten Unterkapitel werden dermale Applikationsformen mit dem Schwerpunkt Mikroemulsionen, Mikroemulsion-basierte Organogele und Hydrogele vorgestellt.

1.1 Insektenstichallergien

Allergien auf Insektenstiche kommen sowohl bei Atopikern als auch bei Nicht-Atopikern in etwa im gleichen Maße vor. Ein Großteil der allgemeinen Bevölkerung (56,6 bis 94,5 %) wurde bereits mindestens einmal in ihrem Leben von einem Stechinsekt gestochen (Sturm et al. 2018). Bei ca. 25 % aller Erwachsenen und bis zu 50 % aller Kinder treten Immunglobulin E (IgE) vermittelte Sensibilisierungen gegen Insektengifte auf (Przybilla et al. 2011). Eine große Zahl an Allergikern (ca. 20 %) weist sogar eine Doppelsensibilisierung gegen Bienen- und Wespengift auf (Vollmar et al. 2013). Trotz dieser relativ hohen Zahlen ist die Mortalitätsrate nach Stichen von Bienen, Wespen und Hornissen in Deutschland laut statistischem Bundesamt mit ca. 20 Todesfällen pro Jahr relativ selten (Schäfer 2009). Es ist jedoch von einer hohen Dunkelziffer auszugehen, da Anaphylaxien oftmals nicht erkannt werden. In Mitteleuropa stellen die Bestandteile des Giftes der europäischen Honigbiene (*Apis mellifera*) und der gemeinen Wespe (*Vespa vulgaris*) die wichtigsten Noxen dar (Przybilla und Ruëff 2010). Andere Insekten, wie z.B. Hummeln (*Bombus spec.*) und Hornissen (*Vespa crabro*), spielen nur eine untergeordnete Rolle als potentieller Auslöser von Anaphylaxien.

Da Gifte verschiedener Insekten oftmals ähnliche Komponenten beinhalten, sind Kreuzreaktivitäten zwischen verschiedenen Spezies möglich. Aufgrund der klinischen Relevanz fokussiert sich diese Arbeit auf Api m 1 (EC 3.1.1.4), einem Majorallergen der europäischen Honigbiene (*Apis mellifera*) (Przybilla und Ruëff 2010).

1.1.1 Funktion und Eigenschaften von Api m 1

Bienengift ist ein komplexes Gemisch verschiedener Peptide und Enzyme (Lima und Brochetto-Braga 2003). Als eines der Majorallergene der europäischen Honigbiene (*Apis mellifera*) ist Api m 1 sowohl injiziert (z.B. durch einen Stich) als auch inhalativ verabreicht stark allergen wirksam (Hoffman 2006). Api m 1 gehört zur Enzymfamilie der Phospholipasen (Unterfamilie PLA₂), welche die Hydrolyse von Phospholipiden katalysieren. Es besteht aus 134 Aminosäuren und verfügt über einen Glykanrest, der N-glykosidisch über Asparagin 13 mit dem Protein verbunden ist (Hoffman 2006). Api m 1 besitzt fünf Disulfidbrücken und verfügt somit über eine sehr hohe Stabilität gegenüber äußeren Einflüssen (Hoffman 2006). Das pH-Optimum, bezogen auf die enzymatische Aktivität, liegt bei 7,4 (Pande et al. 2006). Nach einem Bienenstich führt Api m 1 synergistisch mit Melittin, ein Peptid das mengenmäßig den größten Anteil im Bienengift darstellt, zur Hydrolyse von Erythrozyten und Membranphospholipiden von Mastzellen (Ownby et al. 1997).

1.1.2 Pathogenese der allergischen Insektenstichreaktionen

Insektenstiche können allergische Reaktionen vom Soforttyp auslösen (auch Typ-I Reaktionen genannt). Dabei kommt es zur Überproduktion von IgE-Antikörpern (IgE-AK) gegen ein oder mehrere Allergen(e). Diese Überproduktion läuft über mehrere Stufen, auch Phasen genannt, ab. Die erste Phase (Sensibilisierungsphase) beginnt mit dem Eindringen des Allergens in den Organismus. Es folgt die Phagozytose des Allergens durch antigenpräsentierende Zellen (APC). Diese wandern anschließend zum nächstgelegenen Lymphknoten und prozessieren auf dem Weg dorthin das phagozytierte Allergen. Epitope des Allergens werden anschließend über Haupthistokompatibilitäts (MHC)-II-Komplexe CD4-positiven T-Lymphozyten präsentiert. Diese differenzieren zu allergenspezifischen TH₂-Lymphozyten aus und beginnen mit der Interleukinausschüttung (u.a. IL-4 und IL-5) (Vollmar et al. 2013).

Diese Botenstoffe stimulieren B-Lymphozyten wiederum zur Ausschüttung von IgE- anstatt IgM-Antikörpern. IgE-Antikörper erkennen mit ihrem antigenbindenden Fragment (Fab-Fragment) denjenigen Teil des ursprünglichen Allergens, der als Epitop zuvor den TH₂-Zellen präsentiert wurde. Die Sensibilisierungsphase endet damit, dass die produzierten IgE-Antikörper mit ihren konstanten Fragmenten (Fc-Fragment) an den Fcε-RI-Rezeptor auf der Oberfläche von Mastzellen und basophilen Granulozyten binden. Es kommt hierbei noch zu keiner klinischen Manifestation (Vollmar et al. 2013). Im Gegensatz zu basophilen Granulozyten, welche im Blutkreislauf zirkulieren, verbleiben Makrophagen stationär - bevorzugt in Schleimhäuten, Epithelien und subendotheliale Bindegewebe nahe kleinerer Blutgefäße. Daher kommt ihnen bei der nachfolgend beschriebenen Sofortreaktion eine größere Bedeutung zu. Nach einer erneuten Allergenexposition, z.B. einem erneuten Insektenstich, beginnt die zweite Phase (Sofortreaktion). Das Antigen des eingedrungenen Allergens bindet an das Fab-Fragment der IgE-Antikörper. Es kommt zu einer Quervernetzung mehrerer IgE-AK. Dies löst eine Signalkaskade aus, an deren Ende es zur Mastzelldegranulation kommt. Die in der zytoplasmatischen Granula der Mastzellen gespeicherten Substanzen nennt man primäre Mediatoren. Zu ihnen zählen u.a. Histamin, Heparin und eine Vielzahl von Enzymen, wie z.B. Tryptase, Chymase, Cathepsine. Diese sorgen innerhalb von Minuten für eine erhöhte Gefäßpermeabilität, Vasodilatation und Kontraktion von glatter Muskulatur. Die freigesetzten Proteasen sorgen gleichzeitig für einen Abbau von Bindegewebe und führen somit zu Zellschäden. Im weiteren Verlauf der Mastzellaktivierung kommt es zur Synthese und Sekretion von sekundären Mediatoren. Dazu zählen Leukotriene (C₄, D₄ und E₄), Prostaglandine und der Plättchen-aktivierende-Faktor. Ebenso kommt es zur weiteren Freisetzung von IL-4 und IL-13. Diese sekundären Mediatoren sorgen ihrerseits für eine verstärkte Gefäßpermeabilität, Kontraktion glatter Muskulatur und locken Leukozyten an. Darüberhinaus bewirken sie eine verstärkte Schleimbildung und -sekretion. IL-4 und IL-13 sorgen für eine Aufrechterhaltung der TH₂-Zell-Aktivierung und somit für einen kontinuierlichen Nachschub an IgE. Auf diesem Weg wird die Sofortreaktion aufrechterhalten (Vollmar et al. 2013; Kumar et al. 2012). Die dritte und letzte Phase der allergischen Reaktion vom Soforttyp ist die Spätreaktion. Der Übergang zwischen Sofortreaktion und Spätreaktion ist fließend. Die aktivierten TH₂-Zellen sezernieren IL-5 und IL-3, welche beide die Proliferation und Aktivierung von Eosinophilen fördern.

Diese eigentlich für die Abwehr von Parasiten wichtigen Granulozytensubklasse besitzt eine zytoplasmatische Granula, welche nach Aktivierung freigesetzt wird und eine Gewebeschädigung hervorruft. Des Weiteren synthetisieren eosinophile Granulozyten Entzündungsmediatoren, welche eine Entzündung auslösen und weitere Eosinophile anlocken. Es kommt zu chronischen Entzündungen und damit einhergehenden Erkrankungen, wie z.B. Asthma bronchiale (Vollmar et al. 2013; Kumar et al. 2012).

1.1.3 Therapiemöglichkeiten allergischer Reaktionen vom Soforttyp

Die Therapie IgE-vermittelter allergischer Reaktionen kann grob in drei Teilbereiche gegliedert werden. Przybilla et al. beschreiben als erste Maßnahme die Allergenkenz, z.B. durch Verzicht auf Verzehr von Lebensmitteln im Freien, Fernbleiben von Fallobstwiesen und Abdecken von Getränken (Przybilla et al. 2011). Sollte es dennoch zum Stich kommen, gibt es eine Reihe von Pharmaka zur symptomorientierten Therapie örtlicher und systemischer allergischer Reaktionen (Przybilla et al. 2011; Ring et al. 2014). Prinzipiell werden örtliche Reaktionen immer mit einem topisch wirkenden Glucocorticoid in Kombination mit einem systemisch wirksamen H₁-Antagonisten kombiniert (Ring et al. 2014). Zusätzlich können bei Atemwegsverlegungen durch Stiche im Hals- und Kopfbereich Therapeutika zum Offenhalten selbiger (z.B. Salbutamol) lokal und systemisch gegeben werden (Ring et al. 2014). Die Basis der Therapie systemischer Reaktionen ist immer ein systemisch verabreichtes Glucocorticoid (Ring et al. 2014). Die weitere Behandlung ist symptomorientiert, wobei vor allem auf Injektionstherapeutika zurückgegriffen wird (Ring et al. 2014). Für Personen mit bestätigter Anaphylaxie ist das Mitführen und Anwenden eines Notfallsets für Allergiker zu empfehlen (Ring et al. 2014). Der dritte und letzte Teilbereich der Therapieoptionen anaphylaktischer Reaktionen besteht in der allergenspezifischen Immuntherapie (AIT).

1.1.4 Therapieformen der allergenspezifischen Immuntherapie

Die AIT stellt neben der Allergenkarenz die einzige kausale Therapieoption bei Insektengiftallergikern dar. Sie ist sowohl bei Erwachsenen als auch bei Kindern nach gesicherter Diagnose indiziert (Sturm et al. 2018). Aktuell sind vier verschiedene Applikationsrouten bekannt, wobei lediglich die subkutane und sublinguale Immuntherapie klinische Relevanz besitzen (Abbildung 1) (Pfützner 2016). Bei der subkutanen Immuntherapie (SCIT) werden Allergengemische direkt in die Subkutis appliziert. Dort werden sie von dendritischen Zellen (u.a. Langerhans Zellen) erkannt, phagozytiert und prozessiert. Dendritische Zellen wandern nach der Phagozytose von Allergenen in den nächstgelegenen Lymphknoten, wo sie die im vorherigen Kapitel beschriebenen immunologischen Reaktionen hervorrufen können. Bei der sublingualen Immuntherapie (SLIT) hingegen werden dem Patienten die Allergene in Form von Schmelztabletten oder Flüssigkeiten verabreicht und über die Schleimhaut aufgenommen (Pfützner 2016). Sowohl bei der SCIT, als auch bei der SLIT, wird das verabreichte Allergen oder Allergengemisch von dendritischen Zellen erkannt, prozessiert und schließlich im Lymphknoten immunkompetenten B- und T-Lymphozyten präsentiert. Bei beiden Therapieformen kann es jedoch zu Nebenwirkungen in Form von generalisierten Hautausschlägen oder Atembeschwerden kommen, wobei die Gefahr für diese bei der SLIT etwas geringer ausgeprägt ist, als bei der SCIT (Pfaar et al. 2014; Makatsori und Calderon 2014). Mit der intralymphatischen und der epidermalen Immuntherapie (ILIT, bzw. EPIT) befinden sich zwei Applikationsformen in der Studienphase. Bei der ILIT wird ein Allergen oder Allergengemisch direkt in den Lymphknoten injiziert. Dies hat den Vorteil, dass nur geringe Allergenmengen für eine Therapie benötigt werden (verglichen mit SCIT, SLIT und EPIT). Die Methode ist jedoch aufgrund der Invasivität und der Schwierigkeit der Applikation fehleranfälliger, was wiederum das Therapieversagen in einzelnen Studien erklären könnte (Hylander et al. 2016; Senti et al. 2009; Witten et al. 2013). Die EPIT hingegen bietet die Möglichkeit ein Allergen oder Allergengemisch in Form einer dermalen Darreichungsform über die Haut verfügbar zu machen.

In Studien mit Pollenallergenen wurde dieses Verfahren bereits erprobt, jedoch musste für einen Therapieerfolg das *Stratum corneum* mittels Tape-Stripping-Verfahren entfernt werden (Senti et al. 2015). Da für die Therapie mit Bienen-, bzw. Wespengiftextrakten bislang nur die SCIT angewendet werden kann (Przybilla und Ruëff 2010), ist es das Ziel dieser Arbeit eine effiziente und einfach zu applizierende Form der EPIT für die Applikation von Bienengift zu entwickeln.

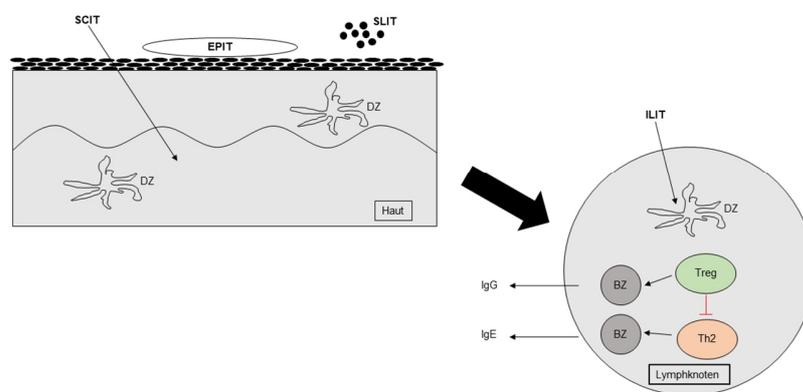


Abbildung 1: Therapieformen der AIT; subkutane Injektion von Allergen (SCIT), epidermale Applikation (EPIT), sublinguales Darreichen von Tropfen oder Schmelztabletten (SLIT), intralymphatische Injektion (ILIT); DZ = dendritische Zelle, BZ = B-Lymphozyten, Treg = T-regulatorische-Lymphozyten, IgG = Immunglobulin G, IgE = Immunglobulin E

1.1.5 Immunologische Mechanismen der allergenspezifischen

Immuntherapie

Das Ziel der AIT ist die Ausbildung einer Allergentoleranz. Das bedeutet, dass das erneute Eindringen eines Allergen in den Organismus nicht mehr mit einer IgE-vermittelten Überreaktion des Immunsystems beantwortet wird. Um dies zu erreichen wird dem Organismus das entsprechende Allergen oder Allergengemisch nach einem festen Schema verabreicht. Dies induziert diverse Veränderungen des Immunsystems auf zellulärer Ebene. Zunächst kommt es durch die wiederkehrende Gabe von Allergenen zu einer Freisetzung klinisch irrelevanter Mengen an Histamin aus Mastzellen. Dies führt zu einer temporär verminderten Reaktivität der Mastzellen und somit zu einer temporären Allergentoleranz (Maintz et al. 2009; Novak et al. 2012). Da der protektive Effekt der verminderten Mastzellreaktivität jedoch nur kurzzeitig anhält, müssen tiefgreifendere Veränderungen im Immunsystem erfolgen, um auch nach der Beendigung der AIT einen anhaltenden Schutz zu gewähren. Dafür spielt der Lymphknoten eine entscheidende Rolle. Dort kommt es nach Allergengabe zur Präsentation des von dendritischen Zellen phagozytierten und prozessierten Allergens. Dies wiederum triggert die regulatorische-T-Zell (Treg) vermittelte Synthese von allergenspezifischen Immunglobulin G (IgG)-Antikörpern. Diese IgG-Antikörper konkurrieren mit im Serum befindlichen IgE-Antikörpern um vorhandenes Allergen. Das hat zur Folge, dass die Bindung von freien Allergene oder IgE-Allergen-Komplexen an Mastzellen verhindert wird und so ein initialer Schritt der allergischen Reaktion ausbleibt (Shamji und Durham, SR 2011). Des Weiteren befinden sich auf der Oberfläche von Mastzellen IgG-Rezeptoren, welche nach Aktivierung einen supprimierenden Effekt auf diese ausüben (Burton et al. 2014; Epp et al. 2018). Treg-Zellen nehmen darüber hinaus IL-10 und TGF- β vermittelt weitere Funktionen wahr. Sie hemmen die Proliferation von TH₂-Zellen, welche die B-Zell-vermittelte IgE-Produktion in den Lymphozyten anregen und bekämpfen lokale allergiebedingte Entzündungen (Jutel et al. 2003; Möbs et al. 2010; Akdis et al. 2004). Abschließend trägt auch das Herunterregulieren (bis hin zum Verlust) von TH₂-Lymphozyten zum Langzeiterfolg einer AIT maßgeblich bei (Schulten et al. 2016). Für eine erfolgreiche EPIT nehmen die dermalen Langerhans-Zellen, eine Subpopulation immunkompetenter Zellen, eine wichtige Rolle ein (Romani et al. 2003).

1.1.5.1 Funktion der epidermalen Langerhans-Zellen

Epidermale Langerhans-Zellen gehören zu den Leukozyten und sind suprabasal, innerhalb der Epidermis lokalisiert (Romani et al. 2003). Sie sind gleichmäßig in der Epidermis verteilt und liegen als einzelne Zellen und nicht im Zellverband vor (Fritsch und Schwarz 2018). Sie sind in der Lage Fremdartigene zu erkennen, zu phagozytieren und anschließend nach Migration in den lokalen Lymphknoten über MHC-II-Rezeptoren anderen Immunzellen (z.B. T-Helferzellen) zu präsentieren (Romani et al. 2001; Moll 2013). Epidermale Langerhans-Zellen nehmen somit eine zentrale Rolle bei der Abwehr von Noxen ein, welche die Hautbarriere überwinden konnten. Aufgrund ihrer Lokalisation dicht unterhalb des *Stratum corneum* und ihrer immunologischen Funktion sind sie ein attraktives, potentiell Target für eine EPIT. Dies konnte bereits in einer Reihe klinischer Studien gezeigt werden (Senti et al. 2012; Jones et al. 2017).

1.2 Aufbau und Funktion der Haut

Die Haut ist das größte Organ des menschlichen Körpers und besitzt eine Gesamtfläche von ca. 2 m² (Schiebler und Korf 2007). Sie ist aus mehreren Lagen Epithelgewebe aufgebaut und lässt sich in drei Schichten einteilen (Abbildung 2):

- Epidermis (Oberhaut)
- Korium (Lederhaut)
- Subkutis (Unterhaut)

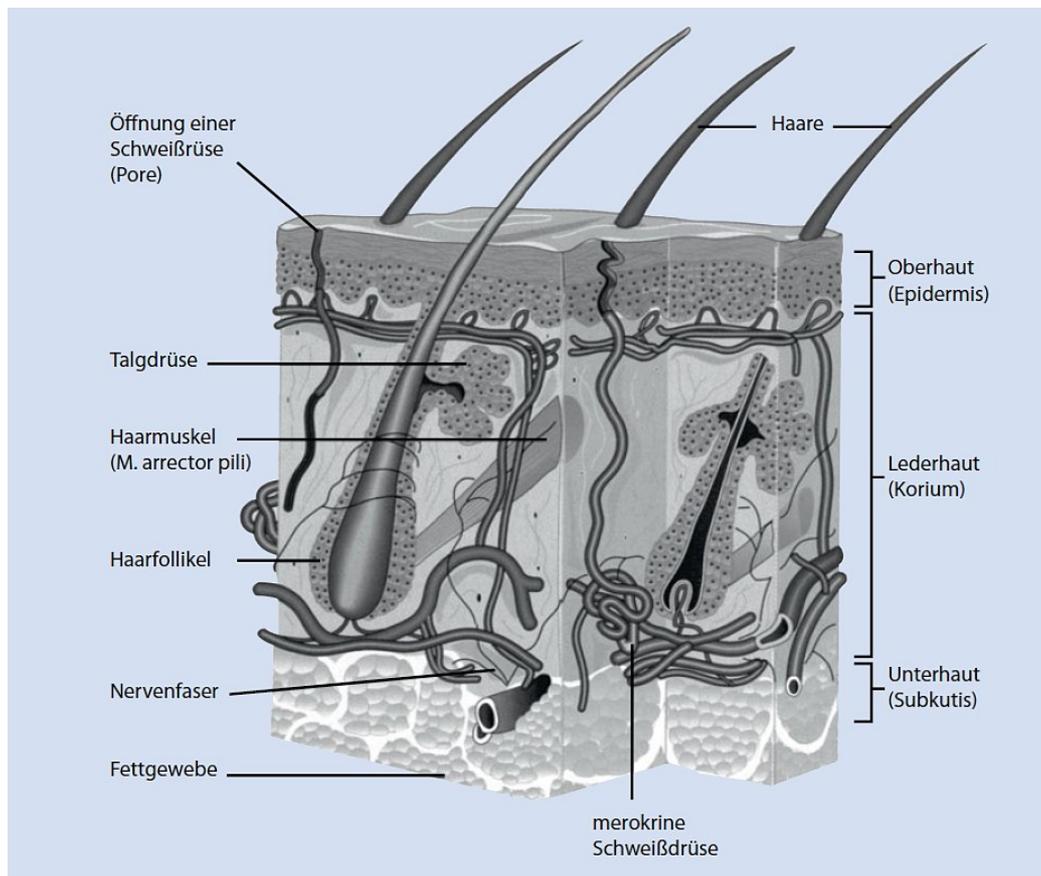


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Hautaufbaus und der Hautanhangsgebilde; mit freundlicher Genehmigung von (Spornitz 2002)

Innerhalb der Hautschichten sind diverse Hautanhangsgebilde lokalisiert, zu denen Haare, Hautdrüsen (Schweiß- und Talgdrüsen) und Nägel gehören. Die Haut stellt die natürliche Barriere zwischen dem Organismus und der Außenwelt dar und schützt diesen vor chemischen, biologischen und physikalischen Umwelteinflüssen. Sie verhindert jedoch nicht nur das Eindringen exogener Noxen in den Körper, sondern schützt gleichzeitig vor Feuchtigkeitsverlust und dient als Wahrnehmungs- und Tastorgan (Thews et al. 1999; Kerscher et al. 2009). Um diese Aufgaben wahrzunehmen ist nicht nur die Integrität der Haut als solches wichtig, sondern auch der auf der Hautoberfläche vorhandene Säureschutzmantel (pH-Wert zwischen 5,0 und 5,5) und die von den Hautzellen produzierten antimikrobiellen Peptide (Fritsch und Schwarz 2018; Goebeler und Hamm 2017). Darüber hinaus nimmt die Haut eine entscheidende Rolle für das Immunsystem des Menschen ein (Fritsch und Schwarz 2018).

Je nach Körperregion kann die Hautdicke sehr stark variieren – in physikalisch weniger stark beanspruchten Arealen (z.B. Augenlidbereich) ist sie nur einige Mikrometer dick, während im Bereich der Fußsohlen Dicken um die 1,0 mm möglich sind (Fritsch und Schwarz 2018; Goebeler und Hamm 2017; Thews et al. 1999). Da für diese Arbeit vor allem die äußerste Hautbarriere, die Epidermis, von Relevanz ist, wird diese nachfolgend genauer erläutert.

1.2.1 Aufbau der Epidermis

Die Epidermis ist die äußerste Hautschicht und bildet somit die eigentliche Schutzhülle des Organismus. Sie besteht zum größten Teil (ca. 90%) aus mehrschichtigem Plattenepithel verhornter und gefäßloser Keratinozyten. Diese entstehen aus den Stammzellen der Basalschicht, durchwandern innerhalb von 30 bis 45 Tagen alle Schichten der Epidermis und differenzieren auf ihrem Weg zu Korneozyten aus. Die übrigen 10% der zellulären Masse der Epidermis fallen den symbiontischen Zellen zu. Zu diesen gehören die Langerhans-Zellen, Lymphozyten, Melanozyten und Merkelzellen. Der Aufbau der Epidermis gliedert sich in 4 Schichten, die in einem fließenden Gleichgewicht aus sich erneuernden und abgestoßenen Zellen zueinander stehen (Fritsch 2004; Schiebler und Korf 2007).

Diese Schichten nennt man (Abbildung 3):

- *Stratum basale* (Basalschicht)
- *Stratum spinosum* (Stachelzellschicht)
- *Stratum granulosum* (Körnerschicht)
- *Stratum corneum* (Hornschicht)

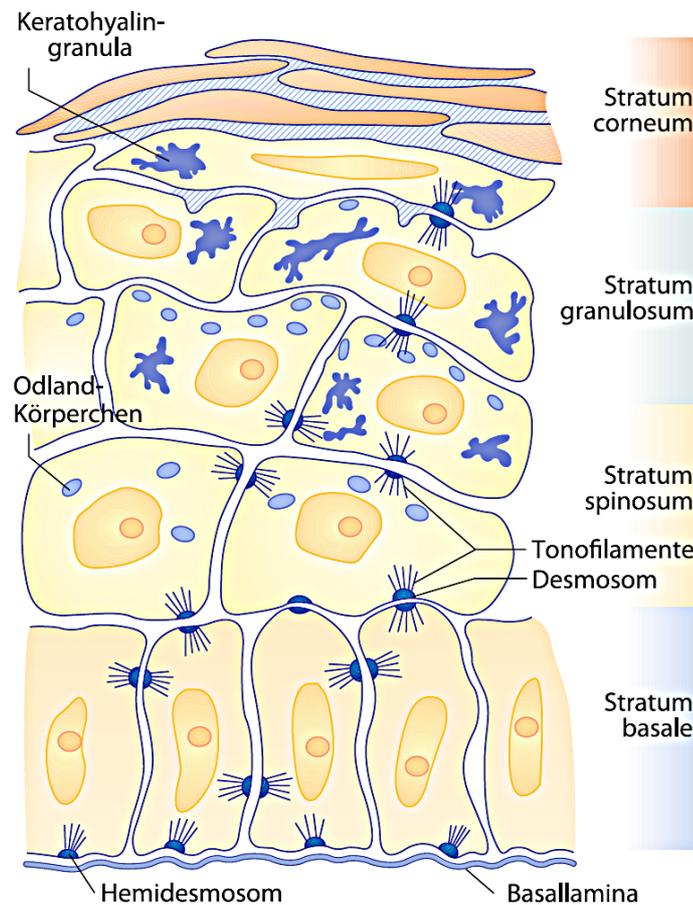


Abbildung 3: Darstellung der Schichten der Epidermis, mit freundlicher Genehmigung von Fritsch (Fritsch 2004)

Das **Stratum basale** (Basalschicht) stellt die unterste Schicht der Epidermis dar und besteht aus einschichtigen, prismatischen Epithelzellen. Mit der darunterliegenden Basallamina ist das **Stratum basale** über Hemidesmosome verbunden. Das **Stratum basale** hat eine hohe Mitoseaktivität und gibt kontinuierlich ältere Zellen in das darüberliegende **Stratum spinosum** ab. Innerhalb des **Stratum basale** sind darüberhinaus Melanozyten lokalisiert. Melanozyten dienen der Synthese von Melanin, welches für Hautpigmentierung verantwortlich ist. Sie dienen somit dem Schutz des Organismus vor UV-Strahlung (Thews et al. 1999; Fritsch 2004; Kerscher et al. 2009).

Das ***Stratum spinosum*** (Stachelzellschicht) bildet den Hauptteil der Epidermis und besteht aus mehreren Zellschichten polygonaler Keratinozyten. Die Keratinozyten des *Stratum spinosum* sind mit einer Vielzahl von Desmosomen versehen. Dies verleiht der Zelloberfläche ein stachelartiges Erscheinungsbild und ist namensgebend. Innerhalb des *Stratum spinosum* beginnt die Synthese der Odland-Körper, welche wiederum bei der Synthese der Lipidmatrix der Hautbarriere eine wichtige Rolle spielen. Innerhalb des *Stratum spinosum* sind auch ein Großteil der dermalen Langerhans-Zellen beheimatet, welche immunologische Funktionen erfüllen (Kerscher et al. 2009).

Das ***Stratum granulosum*** (Körnerschicht) ist eine aus 2 bis 3 Schichten bestehende Schicht, die sich an das *Stratum spinosum* anschließt und in das *Stratum corneum* übergeht. Ihre Zellen besitzen basophile Keratohyalinkörper, welche die Vorläufer der Keratinmatrix darstellen. Die oberste Schicht des *Stratum granulosum* ist durch eine Vielzahl schnell ablaufender Differenzierungsprozesse gekennzeichnet. Es kommt zur Abspaltung der Zellen, Auflösen der Zellkerne und Zellorganellen, Flüssigkeitsentzug und dem Ausbilden einer zementartigen Lipidsubstanz in der die abgestorbenen Keratinozyten, die dann Korneozyten genannt werden, eingebettet werden. Der Übergang zwischen dem *Stratum granulosum* und dem *Stratum corneum* ist sehr abrupt und lässt sich mikroskopisch erkennen (Kerscher et al. 2009; Fritsch 2004).

Das ***Stratum corneum*** (Hornschicht) ist die oberste Schicht der Epidermis und besteht aus ca. 10 bis 20 Schichten abgestorbener, kernloser Korneozyten. Die sich überlappenden Korneozyten besitzen eine längliche Struktur und sind in eine Matrix aus Keratinfilamenten, amorphen Proteinen und Lipidsubstanz eingebettet. Diese besondere Barrierestruktur ist für den Schutz des Organismus essentiell und wird im nachfolgenden Abschnitt genauer erörtert (Schiebler und Korf 2007; Fritsch 2004; Goebeler und Hamm 2017; Kerscher et al. 2009).

Über Adhäsionsorganellen steht das Zytoskelett der Keratinozyten der verschiedenen Schichten mit benachbarten Zellen in Verbindung.

Das **Zytoskelett** der Keratinozyten besteht aus 2 unabhängigen Fasernetzen (Intermediärfilamente und Mikrofilamente) und den Mikrotubuli, die das Zytoplasma durchziehen. Diese röhrenförmigen Gebilde haften an verschiedenen Zellstrukturen an und sorgen so für eine mechanische Stabilität, intrazellulären Stofftransport und Adhärenz (Thews et al. 1999; Fritsch 2004). Mikrotubuli haben einen Durchmesser von ca. 25 nm und sind röhrenförmige Proteinfasern, welche aus α - und β - Tubulin bestehen. Sie sind für den Stofftransport innerhalb der Zelle verantwortlich. Mikrofilamente haben einen Durchmesser von ca. 7 nm, bestehen aus Aktin und binden an Adherence junctions. Intermediärfilamente hingegen sind ca. 10 nm dick und setzen sich aus Zytokeratinen zusammen. Sie binden an Desmosomen (Zell-Zell-Kontakte) und Hemidesmosomen (Zell-Matrix-Kontakte) (Thews et al. 1999).

Es gibt drei verschiedene Arten von **Zellkontakten** (haftend, verschließend und kommunizierend).

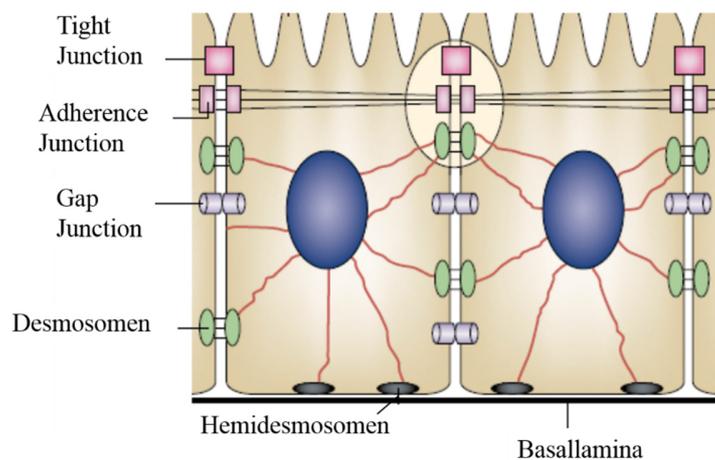


Abbildung 4: Übersicht über die verschiedenen Zellkontakte, mit freundlicher Genehmigung von Tsukita et al. (Tsukita et al. 2001)

Desmosome, Hemidesmosome und Adherence-Junctions zählen zu den haftenden Zellkontakten. **Desmosome** sind stabile, punktförmige Haltekontakte, welche die Hauptlast der interzellulären Adhäsion tragen (Fritsch 2004). Sie bestehen aus einer plattenartigen Verdickung an der Innenseite der Zellmembran (sogenannte Plaques). Diese wiederum bestehen aus Desmoplakin.

Je 2 solcher Plaques liegen sich an benachbarten Zellen gegenüber und werden durch einen erweiterten Interzellularraum (ca. 30 nm) voneinander getrennt. An der Innenseite der Zellen binden Intermediärfilamente an diese Plaques, wohingegen desmosomale Cadherine die Desmosomen interzellulär verknüpfen (Fritsch 2004; Thews et al. 1999). **Hemidesmosome** sind eine Unterart der Desmosome, dienen der Zell-Matrix-Verbindung und verbinden das *Stratum basale* mit der darunterliegenden Basallamina. Sie besitzen lediglich einen einzigen Plaque an den ebenfalls Intermediärfilamente binden. Anstelle von interzellulär bindenden Cadherinen verfügen sie jedoch über Integrine, die eine analoge Rolle einnehmen (Fritsch 2004). Der Aufbau von **Adherence junctions** ähnelt demjenigen der Desmosomen. Sie bestehen aus einem Catherin/Catenin-Komplex und einem Nectin/Afadin-Komplex. An diese binden zytosolisch Mikrofilamente (Niessen 2007).

Tight junctions gehören zu den verschließenden Zellkontakten. Sie bilden zusammen mit Adherence junctions und Desmosomen einen funktionellen Komplex (Tsukita et al. 2001; Niessen 2007). Anders als bei Desmosomen oder Adherence junctions wird der Interzellularspalt bei Tight junctions vollständig aufgehoben und der Stofftransport zwischen den Zellen so erheblich erschwert. Sie sind jedoch nicht völlig undurchlässig sondern zeigen eine Ionen- und Größenselektivität (Tsukita et al. 2001). Aufgebaut sind Tight junctions aus junktionalen Adhäsionsmolekülen, Claudinen und Occludinen, welche ein interzelluläres Netzwerk bilden. Intrazellulär verbinden Zona Occludens-Proteine das extrazelluläre Proteinnetzwerk mit den intrazellulären Mikrofilamenten (Tsukita et al. 2001; Niessen 2007).

Gap junctions wiederum gehören zu den kommunizierenden Zellkontakten und ermöglichen den Stoff- und Informationsaustausch benachbarter Zellen. Sie sind aus Connexinen, hexagonalen Membranproteinen aufgebaut (Thews et al. 1999).

1.2.1.1 Differenzierung von Keratinozyten und Aufbau der Hautbarriere

Die endgültige Differenzierung von lebenden Keratinozyten zu leblosen Korneozyten erfolgt im *Stratum granulosum*. Bereits während der Migration der Zellen vom *Stratum basale* zum *Stratum granulosum* werden jedoch wichtige Substanzen und Hüllstrukturen synthetisiert, welche für die Differenzierung der Keratinozyten und den Aufbau der Hautbarriere verantwortlich sind. Dazu gehören die Synthese der Proteine Keratin und Filaggrin, des „Cornified Envelope“ und der Lipidbarriere.

Die **Keratinsynthese** beginnt im *Stratum basale*. In den abgelösten und durch die Epidermis migrierenden Zellen werden erste Zytokeratine gebildet. Zytokeratine sind Polypeptide, welche entweder sauer (Typ I Keratine) oder neutral/basisch (Typ II Keratine) reagieren (Fritsch und Schwarz 2018; Kerscher et al. 2009). Im Verlauf der weiteren Struktursynthese (v.a. im *Stratum granulosum*) lagern sich Zytokeratine zu Keratinfilamenten zusammen. Diese Polypeptidketten (40-70 kD) bestehen jeweils aus Zytokeratindimeren, die wiederum jeweils aus einem Typ I- und einem Typ II-Zytokeratin aufgebaut sind (Kerscher et al. 2009). Je nach Lokalisation unterscheiden sich die an den jeweiligen Körperstellen exprimierten Zytokeratinfilamente deutlich voneinander. Zytokeratinfilamente werden im *Stratum corneum* von Filaggrin mittels Disulfidbrückenbildung zu Bündeln quervernetzt (Kerscher et al. 2009; Candi et al. 2005). Dies bewirkt die Ausbildung der charakteristischen, flachen Struktur der Korneozyten (Candi et al. 2005). **Filaggrine** sind basische, histidinreiche Proteine welche aus einem höhermolekularen Profilaggrin mittels Dephosphorylierung im *Stratum granulosum* freigesetzt werden und deren Aufgabe die Quervernetzung von Keratinfilamenten ist (Candi et al. 2005; Kerscher et al. 2009). Filaggrine zerfallen im oberen Teil des *Stratum corneum* weiter in verschiedene Aminosäuren und Urocaninsäure. Die entstehenden Aminosäuren haben eine retendierende Wirkung auf Wasser und werden daher auch als „natural moisturizing factor“ bezeichnet, wohingegen für Urocaninsäure ein UV-protektiver Effekt beschrieben wurde (Candi et al. 2005).

Der „**Cornified Envelope**“ ist ein rigider Proteinmantel welcher die Innenseite der Korneozyten auskleidet und diesen eine hohe Resistenz gegenüber organischen Substanzen und Keratolytika verleiht (Fritsch und Schwarz 2018). Im oberen Teil des Stratum spinosum kommt es zur Synthese der Strukturproteine des „Cornified Envelope“ (Candi et al. 2005). Mit der weiteren Migration des Keratinozyten in Richtung des Stratum corneum werden die verschiedenen Strukturproteine (vor allem Involucrin, Loricrin und „small proline-rich proteins“) durch Transglutaminasen miteinander und mit dem Keratingerüst des Korneozyten quervernetzt (Candi et al. 2005). An der Außenfläche des „Cornified Envelope“ befindet sich eine teilweise kovalent verbundene, ceramidreiche Lipidschicht.

Die Synthese der **Lipidbarriere** beginnt im oberen Teil des *Stratum spinosum*. Dort erfolgt die Synthese der Odland-Körperchen. Diese ovalen Strukturen bestehen aus Lipidlamellen die Glykosylceramide, Phospholipide und freie Sterole sowie verschiedene hydrolytische Enzyme beinhalten (Candi et al. 2005). Am Übergang zum *Stratum corneum* werden diese Organellen in den sauren Interzellularraum abgestoßen und deren Inhalt freigesetzt. Durch den damit einhergehenden pH-Abfall werden die freigesetzten hydrolytischen Enzyme aktiviert und dadurch die ebenfalls freigesetzten Lipide zu hydrophoben Metaboliten umgewandelt (Kerscher et al. 2009). Dazu gehören Ceramide, Cholesterin und freie Fettsäuren (Kerscher et al. 2009; Candi et al. 2005). Diese Barrierelipide werden im Folgenden umorganisiert und dichten den Interzellularraum so gegen hydrophile Substanzen ab. Die genaue Struktur ist jedoch noch nicht geklärt. Konsens besteht darin, dass die freien Fettsäuren und die über ein Amid verknüpften Fettsäureketten der Ceramide dicht gepackt sind und somit eine Gelphasendomäne innerhalb einer flüssig-kristallinen Domäne bilden (Candi et al. 2005). Die experimentellen Schwierigkeiten in der Charakterisierung dieser Lipidstrukturen führte zur Bildung verschiedener Modelle („domain mosaic model“, „sandwich model“ und „single gel-phase model“) (Candi et al. 2005) auf die jedoch in dieser Arbeit nicht weiter eingegangen wird. Wechselwirkungen zwischen der Lipidbarriere und dem „Cornified Envelope“ wurden ebenfalls bereits beobachtet.

Komponenten der Lipidbarriere, die über eine lange Fettsäurekette verfügen, können die Plasmamembran der Keratinozyten durchdringen und Esterverknüpfungen mit den Proteinen des „Cornified Envelope“ eingehen (Candi et al. 2005). Das komplexe Zusammenspiel all dieser Substanzen und Strukturen ergibt eine dichte Barriere, die vor allem für hydrophile Substanzen nur schwer zu überwinden ist.

1.2.1.2 Überwinden der dermalen Barriere

Um die Langerhans-Zellen ausreichend mit Allergenen zu stimulieren, ist das Überwinden der dermalen Barrieren essentiell. Wie bereits im allgemeinen Hautaufbau beschrieben, besteht die dermale Barriere aus verschiedenen, einander ergänzenden Mechanismen. Die oberste Schicht der Epidermis, das *Stratum corneum* bildet die erste Barriere. Sie ist nicht nur hauptverantwortlich für den physikalischen Schutz der darunter liegenden Hautschichten, sondern stellt auch das größte Hindernis für das Eindringen topisch applizierter Arzneistoffe dar (Proksch et al. 2008). Um das *Stratum corneum* trotzdem zu überwinden, wurden bereits verschiedenste Applikationsformen entwickelt, welche über diverse penetrationsfördernde Mechanismen verfügen (Prausnitz et al. 2004). Einige Formulierungen sind beispielsweise in der Lage, das hochgeordnete *Stratum corneum* reversibel zu destabilisieren. Andere wiederum erhöhen die Löslichkeit des Wirkstoffs in der Haut und bauen einen Wirkstoffgradienten auf, welcher den Diffusionsdruck des Wirkstoffs erhöht. Auch das Aufbauen eines elektrischen Gradienten über der Haut wurde bereits beobachtet. Oftmals kann man die Penetrationsförderung nicht einem einzigen Mechanismus zuschreiben, sondern eine Kombination dieser Techniken sorgt für den gewünschten Effekt (Benson 2005). Allgemein werden Substanzen als dermal applizierbar angesehen, wenn diese maximal einige hundert Dalton groß sind und einen möglichst hohen Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten (logP-Wert) aufweisen. Dies sind in der Regel vor allem kleine, stark lipophile Moleküle (Hadgraft und Guy 2003; Williams 2003; Prausnitz et al. 2004). Bereits seit längerem beschäftigt sich die Forschung mit der Entwicklung einer dermalen Vakzination. Die dafür verwendeten Impfstoffe gehören zu den Makromolekülen, welche nach der obigen Regel zwar eigentlich nicht dermal verfügbar sein sollten – trotzdem konnten bereits erste Erfolge verzeichnet werden (Zhao et al. 2018; Glenn und Kenney 2006).

Dies beweist, dass prinzipiell auch Makromoleküle durch den geschickten Einsatz penetrationsfördernder Formulierungen das *Stratum corneum* überwinden können. Die Entwicklung einer dermalen Applikationsform, welche die Haut nicht beschädigt und gleichzeitig eine Penetration von Allergenen in die Epidermis ermöglicht, ist ein Ziel dieser Arbeit. Dermale Applikationsformen, die diese Anforderungen prinzipiell erfüllen können, werden im nachfolgenden Kapitel erläutert.

1.3 Dermale Applikationsformen

Das Feld der Formulierungen zur dermalen Therapie ist sehr breit gefasst und erstreckt sich von den klassischen halbfesten Darreichungsformen, wie beispielsweise Salben oder Cremes, über Pflastersysteme und Vehikeltechnologie (Liposomen, Nanopartikel) hin zu neueren Entwicklungen wie beispielsweise Microneedles (Brown et al. 2006; Prausnitz und Langer 2008). Alle dermalen Applikationsformen verfolgen dabei das Ziel die dermale Barriere zu überwinden um einen inkorporierten Wirkstoff in die Haut zu transportieren. Dazu bedient man sich einer Vielzahl aktiver und passiver Techniken. Zu den aktiven Techniken zählen beispielsweise die Anwendung von Ultraschall, Elektroporation und Microneedles. Die passiven Techniken beinhalten den Einsatz penetrationsfördernder Substanzen (Enhancer, Surfactants) und speziell geeigneter Vehikel (Liposomen, Nanopartikel) (Prausnitz und Langer 2008). Wegen ihrer Penetrationsförderung für eine Vielzahl von Substanzen und ihrer für Patienten einfachen Handhabbarkeit fokussiert sich diese Arbeit auf die Entwicklung von Mikroemulsionen, Mikroemulsion-basierter Organogelee und Hydrogelen.

1.3.1 Mikroemulsionen und Mikroemulsion-basierte Organogelee

Mikroemulsionen wurden erstmals 1943 von Hoar und Schulmann beschrieben (Hoar und Schulman 1943). Die Autoren erhielten eine einphasige, optisch klare Lösung, indem Sie eine milchig-trübe Emulsion mit Hexanol titrierten. Der eigentliche Begriff „Mikroemulsion“ wurde jedoch erst 1959 von Schulmann et al. geprägt (Schulman et al. 1959). Mikroemulsionen sind definiert als sich spontan bildende, einphasige, optisch isotrope, thermodynamisch stabile Gemische aus Ölphase (ÖP), Wasserphase (WP) und Surfactants (Danielsson und Lindman 1981; Aboofazeli et al. 1994; Mishra et al. 2014). Ihre Tröpfchengröße liegt in der Regel um 100 nm (Tadros 2013).

Die Charakterisierung einer Mikroemulsion erfolgt unter Nutzung diverser physikochemischer Techniken, wie z.B. dynamischer Lichtstreuung und Rheologie (Lawrence und Rees 2012). Aufgrund ihrer thermodynamischen Stabilität und ihrer Penetrationsförderung, stellt die pharmazeutische Nutzung von Mikroemulsionen einen vielseitigen Ansatz für die dermale Applikation dar (Lawrence und Rees 2012; Kogan und Garti 2006; Kreilgaard 2002; Grampurohit et al. 2011; Ita 2017; Siqueira Leite et al. 2018).

Sie sind in der Lage sowohl hydrophile als auch lipophile Wirkstoffe zu solvatisieren und werden daher oftmals auch als „Universalsolventien“ bezeichnet. Aus der Sicht der Formulierungsentwicklung sind sie daher für schlecht lösliche Substanzklassen, wie beispielsweise Antimykotika, sehr interessant. Über die Verwendung von Mikroemulsionen als Trägersysteme für eine dermale Anwendung gibt es eine Vielzahl an Publikationen, die sich jedoch vor allem mit bereits bekannten Arzneistoffen als Modellschubstanzen beschäftigen (Osborne et al. 1991; Osborne et al. 1988; Peira et al. 2008; Peira et al. 2001; Rhee et al. 2001; Schmalfuss et al. 1997; Sintov 2015; Sintov und Greenberg 2014; Tashtoush et al. 2013; Todosijević et al. 2015; Trotta et al. 1994; Trotta et al. 1996; Trotta et al. 1997; Zhang et al. 2014; Hoppel et al. 2014; Hathout und Nasr 2013; El Maghraby 2008). Jedoch konnten auch Proteine erfolgreich in Mikroemulsionen eingearbeitet werden (Kogan und Garti 2006), sodass Mikroemulsionen als potentielle Vehikel für die dermale Immuntherapie mit Insektenallergenen in Frage kommen. Bei der Entwicklung einer Mikroemulsion werden nach wie vor Dreiphasendiagramme verwendet. In solchen Diagrammen werden einfache Mischungen, bestehend aus einer Ölkomponente, einer Wasserkomponente und einem Surfactant dargestellt (Abbildung 5). Bei den klassischen Dreiphasendiagrammen entsprechen die Eckpunkte des Diagramms jeweils einer der eingesetzten Reinsubstanzen. Jeder Punkt innerhalb des Diagramms entspricht einer definierten Mischung der jeweiligen Phasen. Einfache Mikroemulsionen, die tatsächlich nur aus Wasser, einem Öl und einem Surfactant bestehen, können daher ebenfalls mithilfe dieser Dreiphasendiagramme dargestellt werden. In der Praxis bestehen die einzelnen Phasen (WP, ÖP und SP) jedoch aus mehreren Komponenten, weshalb der Kunstbegriff der pseudoternären Diagramme Anwendung findet. Hierbei entsprechen die Eckpunkte des Diagramms nicht einer einzelnen Komponente, sondern einem 100 % Gemisch der jeweiligen Phasen – also 100 % WP, ÖP, bzw. SP. Jeder Punkt innerhalb des Dreiecks beschreibt damit eine definierte Mischung aus WP, ÖP und SP. Somit ist es möglich die Bereiche in denen einphasige Mikroemulsionen entstehen, von solchen klassischer Emulsionen oder Mehrphasensystemen abzugrenzen.

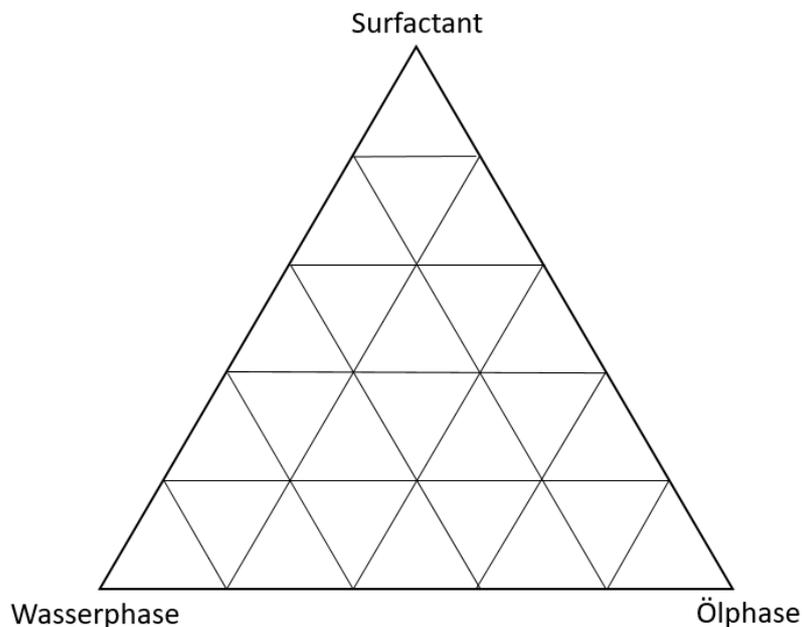


Abbildung 5: Beispiel eines pseudoternären Diagramms eines Systems aus Wasserphase, Ölphase und Surfactant

Mikroemulsionen sind niedrigviskose Systeme, sodass durch ein zu rasches Wegfließen nach der Applikation manche Applikationsorte mit Mikroemulsionen nicht adressiert werden können. Durch den Einsatz geeigneter Gelbildner kann die Viskosität einer Mikroemulsion daher soweit erhöht werden, dass sich ein Mikroemulsion-basiertes Organogel (MBO) bilden kann. Dies erhöht die Verweildauer der Formulierung am Applikationsort und kann sogar neue Applikationsorte, wie z.B. die lymphknotenreiche Oberschenkelinnenseite, für eine Therapie zugänglich machen. Mikroemulsion-basierte Organogele auf der Basis von Alginat, Poloxamer, Xanthan oder Polyacrylsäure wurden bereits beschrieben (Hajjar et al. 2018; Lawrence und Rees 2012) und eine dermale Penetrationsförderung für viele Wirkstoffe gezeigt (Gannu et al. 2010; Kantaria et al. 1999; Seok et al. 2018; Zhang und Michniak-Kohn 2018).

1.3.2 Hydrogele

Gele sind definiert als stark verdünnte quervernetzte Systeme, die je nach ihren Fließeigenschaften in schwach bzw. stark eingeteilt werden (Ferry und Ferry 1980). Hydrogele besitzen oftmals einen Wasseranteil von über 90 %. Neben der Wasserphase und dem Gelbildner können auch Feststoffe, wie z.B. Emulgatoren, Feuchthaltemittel und Konservierungsmittel in die Formulierung eingearbeitet sein (Gulrez et al. 2011; Ahmed 2015). Hydrogele beinhalten einen oder mehrere synthetische und/oder natürlich vorkommende Polymere, die in der Lage sind, große Mengen an Wasser zu absorbieren und festzuhalten (Rosiak und Yoshii 1999). Für die Entwicklung eines Hydrogels werden in dieser Arbeit Poloxamere und Hyaluronsäuren verwendet. Poloxamere können als Tensid, Stabilisator und Penetrationsförderer fungieren und Hydrogele auf Poloxamerbasis finden breite Anwendung in oralen, parenteralen, rektalen, vaginalen, ophthalmischen und dermalen Formulierungen (Devi et al. 2013; González und Sumano 2007). Sowohl Nichtopioid-Analgetika als auch Antibiotika und Proteine wurden bereits in Poloxamergele inkorporiert, was sie für den in dieser Arbeit verfolgten Applikationszweck besonders interessant macht (González und Sumano 2007; Katakam et al. 1997; Stratton et al. 1997; Pillai und Panchagnula 2003; Choi et al. 1998; Cho et al. 2003). Wie Poloxamergele, so finden auch Hyaluronsäuregele vielfältige Anwendung in der pharmazeutischen und kosmetischen Industrie. Sie sind in ophthalmischen, nasalen, pulmonalen, parenteralen und dermalen Arzneimitteln sowohl als Hilfsmittel als auch als Wirkstoff auf dem Markt (Brown und Jones 2005). Da Hyaluronsäure als Radikalfänger fungieren kann, wird sie als UV-Schutz in Sonnencremes und in Zubereitungen zur Wundbehandlung eingesetzt (Brown und Jones 2005; Price et al. 2007). Aufgrund ihrer penetrationsfördernden Eigenschaften sind außerdem Hydrogele auf Hyaluronsäurebasis mit dem Wirkstoff Diclofenac (Solacutan[®], Solaraze[®]) zur Therapie der aktinischen Keratose zugelassen (Dirschka und Lear 2014; Brown et al. 2006). Bioabbaubare Hyaluronsäuregele werden darüberhinaus als injizierbare Zubereitungen verwendet, um unter anderem Proteine zu applizieren (Lee et al. 2009; Luo et al. 2000; Qiu et al. 2003).

1.4 Zielsetzung

Die Prävalenz IgE vermittelter allergischer Reaktionen auf Insektenstiche variiert und wird von diversen Faktoren beeinflusst. Die aktuellen Leitlinien der Europäischen Gesellschaft für Allergie und Klinische Immunologie (EAACI) beziffern das Risiko einer systemischen Reaktion auf einen Hymenopterenstich mit bis zu 7,5 % für Erwachsene und bis zu 3,4 % für Kinder (Sturm et al. 2018). Lediglich die Allergen-spezifische Immuntherapie (AIT) bekämpft die tatsächliche Ursache der Erkrankung – und das mit evidenzbasiertem Erfolg (Bødtger et al. 2002; Bonifazi et al. 2005; Walker et al. 1995). Während bei der SCIT ein nicht unerhebliches Risiko für z.T. schwerwiegende Nebenwirkungen besteht, geriet die nicht-invasive dermale Applikation der Hymenopteringifte immer stärker in den Forschungsfokus (Di Meglio et al. 2011; Prausnitz und Langer 2008). Studien zeigten, dass das in verschiedenen Phasen klinischer Studien befindliche Viaskin®-System (DBV-Technologies) in der Lage ist, dermale Zielzellen (Langerhans-Zellen) zu erreichen und so eine Immuntoleranz herbeizuführen (Jones et al. 2014; Mondoulet et al. 2010). Dieses transdermale Applikationssystem fokussiert sich jedoch auf die Therapie von Nahrungsmittelallergien (u.a. Erdnuss-, Kuhmilch- und Eierallergie). Trotz einiger Vorteile der Applikation als transdermales therapeutisches System, bieten dermale Pflastersysteme, bedingt durch ihre lange Verweildauer auf der Haut, das Risiko des Ausbildens einer Kontaktdermatitis, welche von Juckreiz, Erythemen und Urtikaria gekennzeichnet ist (Ale et al. 2009). Der Bedarf an zusätzlichen, innovativen dermalen Applikationsformen, die während einer EPIT eingesetzt werden können, ist daher groß.

Das Ziel dieser Arbeit war es daher eine dermale Applikationsform zu entwickeln und physikochemisch zu charakterisieren, die eine einfache Handhabbarkeit aufweist und die Penetration des Modellallergens Api m 1 in die Haut ermöglicht. Dafür wurden folgende Punkte untersucht:

- a) Entwicklung von Mikroemulsionen, Mikroemulsion-basierten Organogelen und Hydrogelen mit niedrigem Surfactantgehalt aus Gründen der besseren Hautverträglichkeit.
- b) Charakterisierung der entwickelten Galenika mit Hilfe von Rheologie, Photometrie und dynamischer Lichtstreuung.
- c) Untersuchung der Lagerungsstabilität der entwickelten Galenika.
- d) Untersuchungen und Vergleich der Penetrationsförderung der vielversprechendsten Formulierungen unter Verwendung von fluoreszenzmarkiertem Api m 1 und konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM).
- e) Entwicklung einer Aufarbeitung und Analytik für Api m 1.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien, Proteine, Reagenzien

Tabelle 1: Übersicht der verwendeten Chemikalien, Proteine und Reagenzien

Produkt	Spezifikation/Artikelnummer	Lieferant
1,3-Butandiol (Butylenglykol)	99,5 % Reinheit Art.-Nr.: B84785-1L	Sigma-Aldrich, St. Louis (Missouri), USA
1,5-Pentandiol (Pentylenglykol)	Art.-Nr.: 09-15-025-033	Cosphatec GmbH, Hamburg, Deutschland
1,2-Propandiol (Propylenglykol)	Art.-Nr.: 15335407	Caesar & Loretz GmbH, Hilden, Deutschland
2-Phenoxyethanol	≥90 % Reinheit Art.-Nr.: J133-500ML	VWR, Darmstadt, Deutschland
4x Laemmli Probenpuffer	Art.-Nr.: 1610747	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
2-Mercaptoethanol	Art.-Nr.: 1610710	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
10x Tris/Glycin/SDS Laufpuffer	Art.-Nr.: 1610772	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Aerosil	Art.-Nr.:1.13126.0500	Merck, Darmstadt, Deutschland
Aceton	HiPerSolv CHROMANORM for HPLC Art.-Nr.: 20067.320	VWR, Darmstadt, Deutschland
Acetonitril HiPerSolv CHROMANORM	≥99,9 % Reinheit für HPLC Art.-Nr.: 20060.320	VWR, Darmstadt, Deutschland
Amaze XT	Art.-Nr.:XT1259	Nouryon, Amsterdam, Niederlande
Ameisensäure 85%	Art.-Nr.: L17434.0E	VWR, Darmstadt, Deutschland
Ammoniak 25%	Art.-Nr.: 1133.2500	VWR, Darmstadt, Deutschland
Chloroform	Art.-Nr.:83627.290	VWR, Darmstadt, Deutschland
CosphadermX34	Art.-Nr.:08-14-015-043	Cosphatec GmbH, Hamburg, Deutschland

Di-Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Art.-Nr.: 297260359	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ethylhexylglycerin	Art.-Nr.:1000789425700	Julius Hoesch GmbH, Düren, Deutschland
Gereinigtes Wasser	Eigene Herstellung (1,26 µS/cm)	Technische Hochschule Mittelhessen, Gießen, Deutschland
Glycerol	Art.-Nr.: 7245-1L	Caesar & Loretz GmbH, Hilden, Deutschland
Isopropylpalmitat	Technical grade, >90 % Art.-Nr.: 291781-1L	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Art.-Nr.: 464219160	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumchlorid (KCl)	Art.-Nr.: 406247542	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Art.-Nr.: 245229806	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Labrasol®	Art.-Nr.: 3074JV1	Gattefossè, Eschbach, Deutschland
Methanol	Art.-Nr.: 20864.320	VWR, Darmstadt, Deutschland
Natriumalginat	Art.-Nr.: W201502-1KG	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Natriumhyaluronat (VLMW)	Hyaluronsäure VLMW 10-50 kDa (HyActive) Pulver, sprühgetrocknet; Art.-Nr.: 30511505 GfN	GfN Herstellung von Naturextrakten GmbH, Wald-Michelbach, Deutschland
Natriumhyaluronat (LMW)	Hyaluronsäure (Natriumsalz) LMW (HySilk, powder); Art.-Nr.: 30121505 GfN	Herstellung von Naturextrakten GmbH, Wald-Michelbach, Deutschland
Natriumhyaluronat (SMW)	Hyaluronsäure (Natriumsalz) SMW; Art.-Nr.: 30101705 GfN	Herstellung von Naturextrakten GmbH, Wald-Michelbach, Deutschland
Natriumhyaluronat (HMW)	Hyaluronsäure (Natriumsalz) HMW; Art.-Nr.: 30331503 GfN	Herstellung von Naturextrakten GmbH, Wald-Michelbach, Deutschland
Phospholipase A2 Apis mellifera (= Api m 1)	≥96 % Reinheit, MW = 18,5 kDa Art.-Nr.: L8408-PLA ₂	Latoxan, Portes-lès-valence, Frankreich

Plurol® oleique	Art.-Nr.: 5203	Gattefossè, Eschbach, Deutschland
Poloxamer 188 (P188)	Kolliphor® P 188 Art.-Nr.: 15759-1KG	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Poloxamer 407 (P407)	Art.Nr. 16758-250G Ch.B. BCBQ6661V	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Precision Plus Protein™ All Blue Prestained Protein Standards	Art.-Nr. 161-0373	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Tegosoft liquid	Art.-Nr.: 300109	Evonik Industries AG, Essen, Deutschland
Trifluoressigsäure (TFA)	Art.-Nr.: T6508-10AMP	Honeywell, Seelze (vertrieben durch VWR, Darmstadt, Deutschland)

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2: Übersicht der verwendeten Verbrauchsmaterialien

Produkt	Spezifikation/Charge	Hersteller/Lieferant
96-Well Capmat (Abdeckmatte)	Art. Nr.: 381070	Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
96-Well Mikrotiterplatten	UV-transparenter Boden Art.-Nr.: 735-0253	VWR, Darmstadt, Deutschland
Alexa Fluor™ 647 Protein Labeling Kit	Art.-Nr.: A20173	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland
Antistatische Labormikrospatula	smartSpatula® Art.-Nr.: 17231B	LevGo, Inc.
Eppendorf Reaktionsgefäß 1,5 ml	Protein LoBind Art. Nr.: 0030108116	Eppendorf Deutschland GmbH, Wesseling, Deutschland
Eppendorf Reaktionsgefäß 2,0 ml	Protein LoBind; Art. Nr.: 0030108132	Eppendorf Deutschland GmbH, Wesseling, Deutschland
HPLC-Low-Binding Inserts	0,1 ml Mikroinsert, 15 mm Spitze, silanisiert, Art.-Nr.: 3908759	VDS Optilab, Berlin, Deutschland
HPLC-Säule	Jupiter® 5 µm C18 300 Å LC Column 100 x 4.6 mm Art.Nr.: 00D-4053-E0	Phenomenex, Torrance (Kalifornien), USA
HPLC-Vial	1,5 ml KGE-Flasche 32 x 11,6 mm Klar, Art.-Nr.: 548-0028	VWR, Darmstadt, Deutschland
HPLC-Vial-Schraubdeckel	Screw cap PP green, Art.-Nr.: 548-0383	VWR, Darmstadt, Deutschland
Kryo-Einbettgeschälchen	Tissue-Tek Cryomold Art.-Nr.: 4565	Sakura Finetek, Japan
Kryo-Einbettmedium	Tissue-Tek O.C.T. Compound Art.-Nr.: 4583	Sakura Finetek, Japan
Magnetrührer	Diverse	VWR, Darmstadt, Deutschland

Mikrotomklingen	Feather Microtome Blade Carbon Steel, C-35, Art.-Nr.: 02.075.00.003	Pfm medical AG, Köln, Deutschland
Objektträger	VWR® Microscope Slides, geschnitten mit Mattrand Art.-Nr.: 631-1551	VWR, Darmstadt, Deutschland
Pipettenspitzen für Multipette®E3 <ul style="list-style-type: none"> • 0,1 ml • 0,2 ml • 0,5 ml • 1,0 ml • 2,5 ml 	Combitips advanced®; Art. Nr.: <ul style="list-style-type: none"> • 0030089405 • 0030089413 • 0030089421 • 0030089430 • 0030089448 	Eppendorf Deutschland GmbH, Wesseling, Deutschland
Schraubverschluss für 50 ml Weithals-Schraubflasche	Art.-Nr.: 2-1495	neoLab, Heidelberg, Deutschland
Schraubverschluss für 100 ml Weithals-Schraubflasche	Art.-Nr.: 2-1496	neoLab, Heidelberg, Deutschland
SDS-Gele	4-20 % Criterion™ TGX Stain Free™; 12+2 wells; Art.Nr.: 5678093	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Skalpelli	Surgical Disposable Scalpel # 21 Art.Nr.: 10567364	Braun, Melsungen, Deutschland
Ultrazentrifugationsfilter <ul style="list-style-type: none"> • MWCO 3 kD • MWCO 10 kD 	Roti®-Spin-Mini Zentrifugationseinheit <ul style="list-style-type: none"> • Art.-Nr.: CL12.1 • Art.-Nr.: CL 13.1 	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Verschlussfolie (Parafilm®)	Art.-Nr.: 291-0057	VWR, Darmstadt, Deutschland
Weithals-Schraubflasche 50 ml	Art.-Nr.: 2-1471	neoLab, Heidelberg, Deutschland
Weithals-Schraubflasche 100 ml	Art.-Nr.: 2-1472	neoLab, Heidelberg, Deutschland

2.1.3 Geräte

Tabelle 3: Übersicht über die verwendeten Geräte

Produkt	Spezifikation	Lieferant
Analysewaage	EW620-3NM	Kern & Sohn GmbH, Balingen, Deutschland
Datenanalysesoftware	GraphPad Prism 5	GraphPad Software, San Diego, USA
El. Pipette	Multipette® E3; Art. Nr.: 4987000010	Eppendorf Deutschland GmbH, Wesseling, Deutschland
Franz-Diffusionszellen	1.76 cm ² Oberfläche, 12 ml Akzeptorvolumen	Gauer Glas, Püttlingen, Deutschland
Gefrierschrank	Temperatur: -20 °C	Liebherr Hausgeräte GmbH, Ochsenhausen, Deutschland
Gelelektrophoresegeräte <ul style="list-style-type: none"> • Analysator • Kammer • Netzteil • Software 	<ul style="list-style-type: none"> • ChemiDoc XRS+ • Criterion™ Cell • PowerPac™ Basic Power Supply • Image Lab 6.0 	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Haarschneider	Precise Select 2570.0	WIK, Essen, Deutschland
HPLC- System 1 <ul style="list-style-type: none"> • Pumpe • Autosampler • Säulenofen • Detektor • Software 	Jasco <ul style="list-style-type: none"> • PU-2080 Plus • AS-2059-SF Plus • CO-2060 Plus • MD-2010 Plus • Galaxie 1.10.0.5590 	Zur Verfügung gestellt von Kooperationspartner Engelhard Arzneimittel GmbH
HPLC-System 2 <ul style="list-style-type: none"> • Pumpe • Autosampler • Säulenofen • Detektor • Software 	Hitachi <ul style="list-style-type: none"> • Elite LaChrom L-2130 • Elite LaChrom L-2200 • Elite LaChrom L-2300 • Elite LaChrom L-2455 • EZChrom Elite 3.2.1 	VWR-Hitachi, Darmstadt, Deutschland Agilent Technology, Santa Clara, USA
Klimaschrank 1	Temperatur: 25 °C ± 2 °C Feuchte: 60 % r. F. ± 5 % r. F.	Binder GmbH, Tuttlingen, Deutschland

Klimaschrank 2	Temperatur: 40 °C ± 2 °C Feuchte: 75 % r. F. ± 5 % r. F.	Binder GmbH, Tuttlingen, Deutschland
Konfokales Laser-Scanning Mikroskop <ul style="list-style-type: none"> • Objektiv 10x • Software 	TCS SP5 <ul style="list-style-type: none"> • NA 0.3 • LAS AF Lite 	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Kryostat	CM 1850UV	Leica Biosystems, Wetzlar, Deutschland
Kühlschrank	Temperatur: 5 °C	Liebherr Hausgeräte GmbH, Ochsenhausen, Deutschland
Kühlzentrifuge	Mega Star 600R	VWR, Darmstadt, Deutschland
Magnetrührer	Heidolph MR Hei-Standard	Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland
Lichtmikroskop <ul style="list-style-type: none"> • Objektiv • Kamera • Software 	DM750 <ul style="list-style-type: none"> • HI Plan 10x/0,25; 506228 • Leica MC170 HD • Leica LAS EZ 	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Orbitaler Schüttler-Inkubator	ES-20	bioSan Medical- Biological Research & Technologies, Riga, Lettland
PDMPD-Gerät	Eigene Herstellung Dr. Ulf Mäder	Technische Hochschule Mittelhessen, Gießen, Deutschland
Plate Reader <ul style="list-style-type: none"> • Software 	Synergy HTX Multi Mode Reader <ul style="list-style-type: none"> • Gen 5™ 	BioTek, Bad Friedrichshall, Deutschland
Rheometer <ul style="list-style-type: none"> • Software • Untere Messplatte 	Modular Compact Rheometer (MCR) 102 <ul style="list-style-type: none"> • RheoCompass® Version 1.20 • I-PP40/CU/CX 	Anton Paar, Graz, Österreich
Rheometer Messsystem 1	PP25 Durchmesser 25 mm	Anton Paar, Graz, Österreich

Rheometer Messsystem 2	CP40-1 Durchmesser 40 mm Winkel 1°	Anton Paar, Graz, Österreich
Rotor-Stator-System	MICCRA D9	MICCRA GmbH, Heitersheim, Deutschland
Vortexschüttler	MS2 Minishaker	IKA, Staufen, Deutschland
Wärmepumpe	Thermo Haake DC 10	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland
Wasseraufbereitungsanlage	Puranity PU 15	VWR, Darmstadt, Deutschland
Zentrifuge 1	Centrifuge 5424	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge 2	Mega Star 600R	VWR, Darmstadt, Deutschland
Zentrifuge 3	CompactStar CS 4	VWR, Radnor (Pennsylvania), USA
Zetasizer	Zetasizer nano ZS90	Malvern Panalytical, Kassel, Deutschland

2.2 Methoden

2.2.1 Herstellungsmethoden

2.2.1.1 Herstellung des PBS-Puffer

Zur Herstellung von PBS-Puffer wurden 8,00 g NaCl, 2,00 g KCl, 1,44 g Na₂HPO₄, 0,24 g KH₂PO₄ und 988,32 g gereinigtes Wasser eingewogen und bis zum vollständigen Auflösen aller Salze mittels Magnetprüher bei 1000 rpm homogenisiert. Wirkstoffhaltiger PBS-Puffer wurde hergestellt, in dem 1 mg lyophilisiertes Api m 1 mit 1 ml PBS versetzt wurde und anschließend mit PBS auf die benötigte Konzentration verdünnt wurde.

2.2.1.2 Herstellung von Alexa Fluor™ 647-markiertem Api m 1

Für die Markierung von Api m 1 mit dem Fluoreszenzfarbstoff Alexa Fluor™ 647 wurde das Alexa Fluor™ 647 Protein Labelling Kit der Firma Thermo Fisher Scientific verwendet. Dafür wurde 1 mg lyophilisiertes Api m 1 (Latoxan, Portes-lès-valence, Frankreich) in 500 µl PBS gelöst, sodass eine Konzentration von 2 mg/ml vorlag. Die so entstandene Proteinlösung wurde mit reaktiver Alexa Fluor™ 647-Lösung versetzt, welche zuvor bei Raumtemperatur temperiert wurde. Die Mischung wurde einige Male invertiert und anschließend lichtgeschützt mittels Magnetprüher bei 150 rpm für eine Stunde bei Raumtemperatur durchmischt. Die Fraktionierung in markiertes und unmarkiertes Protein erfolgte mittels einer dem Kit beiliegenden Gelfiltrationssäule. Die das markierte Protein beinhaltende Fraktion wurde in Reaktionsgefäße überführt. Zur Bestimmung der Labelingeffizienz und Kalkulation der Proteinkonzentration wurde eine Probe des markierten Proteins im Verhältnis 1:5 mit PBS verdünnt und anschließend die Absorption mittels Plate-Reader bei 280 nm und 650 nm bestimmt. Die zur Kalkulation genutzten Formeln sind nachfolgend beschrieben:

$$\text{Proteinkonzentration (M)} = \frac{[A_{280} - (A_{650} \times 0.03)] \times \text{Verdünnungsfaktor}}{203.000},$$

Formel 1: Berechnung der Proteinkonzentration

$$\text{Stoffmenge Farbstoff pro Stoffmenge Protein} = \frac{A_{650} \times \text{Verdünnungsfaktor}}{239.000 \times (M)},$$

Formel 2: Berechnung der Farbstoffmenge pro Stoffmenge Protein

mit Proteinkonzentration (M) und Absorption bei 280 nm (A₂₈₀), bzw. bei 650 nm (A₆₅₀).

2.2.1.3 Identifizierung von Mikroemulsionen mittels PDMPD

Zur Identifizierung von Mikroemulsionen wurde die von Schmidts et al. 2009 (Schmidts et al. 2009) entwickelte „Phase Diagram by Micro Plate Dilution“ (PDMPD) Methode verwendet und zusätzlich die optische Dichte der einzelnen Mischungen bei 600 nm (OD_{600}) bestimmt. Dazu wurden Vormischungen der Wasserphase (WP; Butylenglykol, Glycerol, PBS 14:3:83 Gew.-%), Ölphase (ÖP; Tegosoft liquid[®], Isopropylpalmitat 7: 1 Gew.-%) und der Surfactant-/Cosurfactantphase (ScoS; Labrasol[®], Plurol oleique[®], 10:8, 11:7 und 11:8 Gew.-%) hergestellt. Anschließend wurden Mischungen, bestehend aus ÖP und SCoS (10-90 Gew.-%) hergestellt. Dem von Schmidts et al. (Schmidts et al. 2009) beschriebenen Schema folgend, wurden 96-Wellplatten mit der ÖP-/ScoS-Vormischung und WP auf ein Gesamtvolumen von 200 µl befüllt und auf einem orbitalen Schüttler-Inkubator bei 200 rpm und 25 °C agitiert. Nach einer 30-minütigen Equilibrierungsphase wurden Mikroemulsionen mittels visueller Kontrolle der Isotropie und Messungen der optischen Dichte bei 600 nm (OD_{600} ; Grenzwert 0,10) identifiziert.

2.2.1.4 Herstellung der finalen Mikroemulsion

Für die Herstellung der finalen Mikroemulsion wurden Labrasol[®] (11,0 Gew.-%), Plurol oleique[®] (8,0 Gew.-%), Tegosoft liquid[®] (7,0 Gew.-%), Isopropylpalmitat (1,0 Gew.-%), Butylenglykol (10,0 Gew.-%), Glycerol (2,6 Gew.-%), Phenoxyethanol (1,0 Gew.-%) und PBS (59,4 Gew.-%) in dieser Reihenfolge eingewogen und mittels Magnetrührer für 2 Minuten bei 1000 rpm homogenisiert.

Wirkstoffhaltige Mikroemulsion mit unmarkiertem Api m 1 wurde hergestellt, in dem 1 mg lyophilisiertes Api m 1 in Mikroemulsion solubilisiert und auf die jeweils benötigte Konzentration mit Mikroemulsion verdünnt wurde. Wirkstoffhaltige Mikroemulsion mit Alexa Fluor[™] 647-markiertem Api m 1 wurde erhalten, in dem der PBS-Anteil der Mikroemulsion anteilig durch fluoreszenzmarkiertes Api m 1 in PBS ersetzt wurde.

2.2.1.5 Herstellung der Mikroemulsion-basierten Organogele

Als Basis für die Mikroemulsion-basierten Organogele (MBO) wurde zunächst wie unter 2.2.1.4 beschrieben eine Placebo-Mikroemulsion hergestellt. Anschließend wurde der prozentuale Anteil an Gelbildner hinzugefügt und die Mischung 10 Minuten unter starkem Rühren (1200 rpm) mittels Magnetrührer homogenisiert. Die Ansätze wurden in ein Glas-Vial mit Schraubdeckelverschluss gefüllt, luftdicht mit Parafilm® verschlossen und bis zu dem Tag ihrer weiteren Charakterisierung bei 25 °C, 60 %rH gelagert. Zur Herstellung wirkstoffhaltiger MBO wurde der PBS-Anteil der Mikroemulsion anteilmäßig durch Alexa FTM647-markiertes Api m 1 in PBS ersetzt.

2.2.1.6 Herstellung der Poloxamergele

Zur Entwicklung einer geeigneten Formulierung für die dermale Applikation von Api m 1 wurden thermosensitive Hydrogele mit dem Hauptgelbildner Poloxamer 407 und dem Additiv Poloxamer 188 hergestellt. Zur Evaluation einer geeigneten Herstellungsmethode wurden drei verschiedene Herstellungsprotokolle in Anlehnung an die „cold-method“ von Schmolka et al. (Schmolka 1972) evaluiert. Dafür wurde ein PBS-Puffer wie unter 2.2.1.1 beschrieben, hergestellt. Anschließend wurden alle weiteren Bestandteile, außer Poloxamer 407, bzw. Poloxamer 188 unter Rühren hinzugegeben und homogenisiert (Magnetrührer, 1000 rpm). Die so entstandene Wasserphase wurde bis zu ihrer Verwendung bei 5 °C gelagert. Die verwendeten Poloxamere wurden bis zu ihrer Verwendung ebenfalls bei 5 °C temperiert. Für Herstellungsmethode 1 wurde das vortemperierte Poloxamer in einem Schritt der gekühlten Wasserphase hinzugegeben und unter starkem Rühren bei Raumtemperatur dispergiert. Für Herstellungsmethode 2 wurde die benötigte Poloxamermenge der gekühlten Wasserphase jeweils schrittweise unter Rühren hinzugefügt. Bei Herstellungsmethode 3 wurde die vorgekühlte Poloxamermenge der auf 5 °C temperierten Wasserphase hinzugegeben und der Formulierungsansatz auf einem Eisbad lagernd für vier Stunden unter Rühren homogenisiert. Alle Formulierungen wurden anschließend in Glas-Vials mit Schraubdeckelglas gegeben, mit Parafilm luftdicht verschlossen und bei 5 °C bis zu ihrer weiteren Charakterisierung gelagert.

Die generische Zusammensetzung der Poloxamergele ist in Tabelle 4 dargestellt. Die exakte Zusammensetzung ist dem Ergebnisteil zu entnehmen (3.1.3.1 „Entwicklung von Hydrogelen auf Poloxamerbasis“).

Tabelle 4: Generische Zusammensetzung der Hydrogele auf Poloxamerbasis

Rohstoff	Prozentualer Anteil
2-Phenoxyethanol	1,4 %
Glycerol	3,6 %
Butylenglykol	13,7 %
Poloxamer 188	variabel
Poloxamer 407	variabel
PBS-Puffer	ad 100,0 %

2.2.1.7 Herstellung der Hyaluronsäuregele

Für die dermale Applikation von Api m 1 wurden Hydrogele auf Basis verschiedener Hyaluronsäuren entwickelt. Dazu wurden zwei verschiedene Herstellungsmethoden angewendet und auf ihre Tauglichkeit evaluiert. Für beide Herstellungsmethoden wurde ein PBS-Puffer, wie unter 2.2.1.1 beschrieben, hergestellt. Für Herstellungsmethode 1 wurden zur Herstellung der Wasserphase anschließend alle weiteren Formulierungsbestandteile, außer Hyaluronsäure unter Rühren hinzugegeben und homogenisiert (Magnetrührer, 1000 rpm) (Tabelle 5). Die benötigte Menge an Hyaluronsäure wurde anschließend auf die hergestellte Wasserphase gestreut und der Formulierungsansatz luftdicht mit Parafilm verschlossen. Nach einer einstündigen Wartezeit, in der die Hyaluronsäure bereits aufzuquellen begann, wurde die Mischung unter Rühren homogenisiert und in Glas-Vials mit Schraubdeckelglas abgefüllt. Die abgefüllten Formulierungen wurden luftdicht mit Parafilm verschlossen und bei 5 °C bis zu ihrer weiteren Charakterisierung gelagert. Bei Herstellungsmethode 2 wurde zunächst eine Wasserphase, vermindert um den prozentualen Anteil an Butylenglykol, hergestellt und bei 5 °C gelagert. Anschließend wurde Hyaluronsäure mit dem verminderten Anteil von Butylenglykol an der Wasserphase angerieben und unter Rühren homogenisiert. Die übrige Wasserphase wurde danach schrittweise unter Rühren hinzugefügt. Die Formulierung wurde in ein Glas-Vial mit Schraubdeckelverschluss umgefüllt, luftdicht mit Parafilm verschlossen und bis zu ihrer weiteren Charakterisierung bei 5 °C gelagert.

Die generische Zusammensetzung der Hyaluronsäuregele ist in Tabelle 5 dargestellt. Die exakte Zusammensetzung der entwickelten Gele ist dem Ergebnisteil zu entnehmen (3.1.3.2 „Entwicklung von Hyaluronsäuregelen“).

Tabelle 5: Generische Zusammensetzung der Hydrogele auf Hyaluronsäurebasis

Rohstoff	Prozentualer Anteil
2-Phenoxyethanol	1,4 %
Glycerol	3,6 %
Butylenglykol	13,7 %
Hyaluronsäure	variabel
PBS-Puffer	ad 100,0 %

2.2.1.8 Herstellung der hyaluronsäuremodifizierten Poloxamergele

Für die Herstellung der hyaluronsäuremodifizierten Poloxamergele wurde zunächst ein PBS-Puffer wie unter 2.2.1.1 beschrieben, hergestellt. Anschließend wurden alle weiteren Bestandteile der Wasserphase dem PBS-Puffer unter Rühren (Magnetrührer, 1000 rpm) hinzugegeben und homogenisiert. Die Wasserphase wurde für zehn Minuten bei -20 °C temperiert. Anschließend wurden die benötigten Mengen an Poloxamer und Hyaluronsäure eingewogen und der vorgelegten Wasserphase schrittweise unter starken Rühren mittels Magnetrührer (1400 rpm) hinzugefügt. Die Formulierungen wurden in Glas-Vials mit Schraubdeckelverschluss gefüllt, luftdicht mit Parafilm® verschlossen und bis zum Tag ihrer weiteren Charakterisierung bei 5 °C gelagert.

Die generische Zusammensetzung der Hyaluronsäure-modifizierten Poloxamergele ist in Tabelle 6 dargestellt, die exakte Zusammensetzung der entwickelten Gele ist dem Ergebnisteil zu entnehmen (3.1.3.3 „Einfluss von Hyaluronsäure auf die Gelstärke und die Gelierungstemperatur von Poloxamergelen“).

Tabelle 6: Generische Zusammensetzung der Hyaluronsäure-modifizierten Poloxamergele

Rohstoff	Prozentualer Anteil
2-Phenoxyethanol	1,4 %
Glycerol	3,6 %
Butylenglykol	13,7 %
Poloxamer	variabel
Hyaluronsäure	variabel
PBS-Puffer	ad 100,0 %

2.2.1.9 Herstellung der Hydrogele für die Lagerungsstabilitätsuntersuchung

Die Herstellung der Hydrogele 1 und 2 für die Placebo-Lagerungsstabilitätsstudie erfolgte analog zum beschriebenen Verfahren in 2.2.1.8 „Herstellung der hyaluronsäuremodifizierten Poloxamergele“. Zur Herstellung von wirkstoffhaltigem Hydrogel 1 wurde der PBS-Anteil der Wasserphase anteilmäßig durch Alexa FTM647-markiertes Api m 1 in PBS ersetzt. Die Herstellung der Hydrogele 3 und 4 erfolgte analog der Herstellungsmethode 2 für Hyaluronsäuregele wie unter 2.2.1.7 „Herstellung der Hyaluronsäuregele“ beschrieben. Alle Formulierungen wurden luftdicht mit Parafilm[®] verschlossen und bis zum Tag ihrer Einlagerung und weiteren Charakterisierung bei 5 °C gelagert. Die Zusammensetzung der Hydrogele ist in Tabelle 7 dargestellt.

Tabelle 7: Übersicht über die hergestellten Hydrogele der Lagerungsstabilitätsuntersuchung, Poloxamer 407 (P407) Poloxamer 188 (P188), Hyaluronsäure mit sehr kleinem Molekulargewicht (VLMW HA), Hyaluronsäure mit kleinem Molekulargewicht (LMW HA), Hyaluronsäure mit Standardmolekulargewicht (SMW HA), Hyaluronsäure mit hohem Molekulargewicht (HMW HA), Wasserphase (WP)

Formulierung	P407 [Gew.-%]	P188 [Gew.-%]	VLMW HA [Gew.-%]	LMW HA [Gew.-%]	SMW HA [Gew.-%]	HMW HA [Gew.-%]	WP
Hydrogel 1	18,0	15,0	1,0	---	---	---	66,0
Hydrogel 2	18,0	15,0	---	1,0	---	---	66,0
Hydrogel 3	---	---	1,0	---	---	1,0	98,0
Hydrogel 4	---	---	---	1,0	1,5	---	97,5

2.2.2 Charakterisierungsmethoden

2.2.2.1 *Messung der optischen Dichte*

Die OD₆₀₀ wurde bestimmt in dem 200 µl der jeweiligen Formulierung in UV-VIS durchlässige 96-Well Mikrotiterplatten gefüllt und deren optische Dichte bei 600 nm und 25 °C vermessen wurde (Synergy HTX Multi Mode Reader Gen5™). Alle Messungen wurden in Triplikaten durchgeführt und das Ergebnis als Mittelwert ± Standardabweichung dargestellt.

2.2.2.2 *Dynamische Lichtstreuung*

Die Mikrostruktur der unverdünnten Mikroemulsion wurde mit Hilfe von dynamischer Lichtstreuung (DLS, Zetasizer nano ZS90, 25 °C, 90° Messwinkel) analysiert. Dazu wurde der z-Average und der Polydispersitätsindex (PDI) ermittelt und als Mittelwert ± Standardabweichung (n = 3) im Ergebnisteil dargestellt.

2.2.2.3 *Viskositätsbestimmung*

Die Viskosität der entwickelten Mikroemulsion wurde durch Rotationsversuche bestimmt (Modular Compact Rheometer (MCR) 102, Anton Paar). Dazu wurde ein Kegel-Platte Messsystem verwendet (Durchmesser 40 mm, Kegelwinkel 1°, Messtemperatur 25 °C). Proben der Mikroemulsion wurden zwischen Kegel und Platte positioniert und die Größe des Messspalts auf 80 µm eingestellt. Die Scherrate wurde in einer logarithmischen Rampe von 500 – 1000 1/s variiert. Die Viskositätsangaben der frisch hergestellten Mikroemulsion, sowie nach dreimonatiger Lagerung sind im Ergebnisteil als Mittelwert ± Standardabweichung (n = 3) dargestellt.

2.2.2.4 *Rheologische Untersuchungen*

Die entwickelten Gele (MBO und Hydrogele) wurden rheologisch mit Hilfe von Oszillationsversuchen charakterisiert (Modular Compact Rheometer (MCR) 102, Anton Paar). Dazu wurde ein Platte-Platte Messsystem verwendet (Messplatte PP25, Durchmesser 25 mm). Das benötigte Probenvolumen (400 µl MBO; 500 µl Hydrogele) wurde zwischen den Platten des Messsystems aufgetragen und die Größe des Messspalts (= Trimmposition) auf 500 µm festgelegt. Die Equilibrierungszeit betrug 10 Minuten (MBO), bzw. 1 Minute (Hydrogele). Im Rahmen eines Amplitudensweep wurden der linear-viskoelastische Bereich (LVEB) sowie die Gelstärke der Formulierungen innerhalb des LVEB bei der gewählten Messtemperatur bestimmt. Anschließend wurden Frequenztests durchgeführt um das Verhalten der Formulierungen bei Erschütterungen näher zu charakterisieren. Des Weiteren wurden Temperatursweeps durchgeführt um die Gelstärke der Formulierungen bei Hauttemperatur zu untersuchen. Die Messparameter der jeweiligen Tests (Amplituden-, Frequenz- und Temperatursweep) sind im Anhang zusammengefasst (Anhang III; Tabelle 50-Tabelle 58). Im Ergebnisteil sind die ermittelten Messwerte als Mittelwert \pm Standardabweichung (n = 3) dargestellt.

2.2.2.5 Keimbelastungstest

Um die ausreichende mikrobielle Konservierung gemäß europäischem Arzneibuch zu überprüfen, wurde vom chemischen und mikrobiologischen Institut UEG GmbH in Wetzlar ein Keimbelastungstest durchgeführt. Dazu wurde der PBS-Anteil der entwickelten Mikroemulsion anteilig durch eines der nachfolgenden Konservierungsmittel/-kombinationen ersetzt:

- a) Mikroemulsion mit 10,0 Gew.-% Butylenglykol
- b) Mikroemulsion mit 11,0 Gew.-% Butylenglykol/2-Phenoxyethanol-Mischung (10:1)
- c) Mikroemulsion mit 10,5 Gew.-% Butylenglykol/Ethylhexylglycerin-Mischung (20:1)

Die verwendeten Testkeime waren: die gramnegativen Bakterien *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027); der grampositive Stamm *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) und die Hefe *Candida albicans* (ATCC 10231), sowie der Schimmelpilz *Aspergillus brasiliensis* (ATCC 16404). Jeweils 10 ml der beschriebenen Mikroemulsionsrezepturen wurden mit 0,1 ml Inokulum (10^5 - 5×10^6 KBE/ml Bakterien; 10^4 - 10^5 KBE/ml Pilze) angeimpft. Das mikrobielle Wachstum wurde durch eine Verdünnungsreihe zu verschiedenen Zeitpunkten bestimmt (nach zwei Tagen, einer Woche, zwei Wochen und vier Wochen). Der Keimbelastungstest wurde als erfolgreich betrachtet, wenn das bakterielle Wachstum innerhalb von zwei Tagen um 99,0 % und nach einer Woche um 99,9 % reduziert wurde bzw. wenn das Pilzwachstum um 99,0 % innerhalb von zwei Wochen reduziert wurde und es zu keinem weiteren Anstieg des Wachstums während der Prüfzeit kam.

2.2.2.6 Lichtmikroskopische Untersuchungen der MBO

Proben ausgewählter MBO wurden auf einem Objektträger platziert und mit einem Deckglas abgedeckt. Nach einer Äquilibrationszeit von 5 Minuten wurden die Proben mikroskopiert (Leica DM750, 10x/0,25 Objektiv) und repräsentative Aufnahmen angefertigt (Leica MC170 HD).

2.2.3 Ablauf der Lagerungsstabilitätsuntersuchungen

2.2.3.1 *Ablauf der Lagerungsstabilitätsuntersuchung der Mikroemulsion*

Drei Ansätze der Mikroemulsion (jeweils 100 g) wurden, wie unter 2.2.1.4 „Herstellung der finalen Mikroemulsion“ beschrieben, hergestellt. Anschließend wurden die Ansätze in Glas-Vials mit Schraubdeckelverschluss aliquotiert. Die Aliquots wurden bei 25 °C, 60 %rH, bzw. 40 °C, 75 %rH gelagert. Darüber hinaus wurde ein 15 g Ansatz hergestellt und in einem Glas-Vial mit Schraubdeckelverschluss bei 5 °C gelagert. Proben wurden nach einem, zwei und drei Monaten entnommen und analysiert (visuelle Inspektion, OD₆₀₀, Viskosität, Dynamische Lichtstreuung). Die Startwerte wurden vor der Aliquotierung aus den Stammansätzen bestimmt.

2.2.3.2 *Ablauf der Lagerungsstabilitätsuntersuchung der MBO*

Von jedem der getesteten MBO wurden drei Ansätze (jeweils 50 g), wie unter 2.2.1.5 „Herstellung der Mikroemulsion-basierten Organogelee“ beschrieben, hergestellt. Die Ansätze wurden in ein Glas-Vial mit Schraubdeckelverschluss gefüllt und luftdicht mit Parafilm verschlossen. Die Ermittlung der Startwerte (visuelle Kontrolle und Rheologie) erfolgte nach dreitägiger Lagerung bei 25 °C, 60 %rH. Anschließend wurden die Ansätze in Glas-Vials mit Schraubdeckelverschluss aliquotiert, luftdicht mit Parafilm verschlossen und für einen Monat bei 25 °C, 60 %rH, bzw. 40 °C, 75 %rH eingelagert. Im Anschluss an die Lagerung wurden die Aliquots visuell kontrolliert und rheologisch vermessen (genaue Beschreibung siehe 2.2.2.4 „Rheologische Untersuchungen“).

2.2.3.3 *Ablauf der Lagerungsstabilitätsuntersuchung der Hydrogele 1-4*

Von jedem Gel wurden drei Ansätze zu jeweils 50 g, wie unter 2.2.1.9 „Herstellung der Hydrogele für die Lagerungsstabilitätsuntersuchung“ beschrieben, hergestellt. Die Ansätze wurden in ein Glas-Vial mit Schraubdeckelverschluss gefüllt und luftdicht mit Parafilm verschlossen. Die Ermittlung der Startwerte (visuelle Kontrolle und Rheologie) erfolgte nach vierundzwanzigstündiger Lagerung bei 5 °C. Anschließend wurden die Ansätze in Glas-Vials mit Schraubdeckelverschluss aliquotiert, luftdicht mit Parafilm verschlossen und für einen Monat bei 5 °C; 25 °C, 60 %rH; bzw. 40 °C, 75 %rH eingelagert. Im Anschluss an die Lagerung wurden die Aliquots visuell kontrolliert und rheologisch vermessen (genaue Beschreibung siehe 2.2.2.4 „Rheologische Untersuchungen“).

2.2.4 Analytik

2.2.4.1 HPLC-Analytik von Api m 1

Für die Entwicklung einer HPLC-Methode wurde eine Stammlösung aus Api m 1 in PBS hergestellt. Dazu wurde lyophilisiertes Api m 1 in PBS-Puffer solvatisiert und sowohl qualitativ als auch quantitativ analysiert. Die finale Methode ist in Tabelle 8 dargestellt. Die Säulenofentemperatur betrug 25 °C, das Injektionsvolumen waren 30 µl. Die Flussrate wurde auf 0,75 ml/min eingestellt und die Detektion erfolgte bei 220 nm mit einem Dioden-Array-Detektor (DAD). Die Bestimmung der „area under the curve“ (AUC) erfolgte durch Integration des Wirkstoffpeaks mit der jeweiligen anlagenspezifischen Software.

Tabelle 8: Gradientenelutions-HPLC-Methode zur Bestimmung von Api m 1, Acetonitril + 0,1 % TFA (Eluent A), Gereinigtes Wasser + 0,1 % TFA (Eluent B), Säulenofentemperatur = 25 °C, Detektionswellenlänge = 220 nm, Flussrate = 0,75 ml/min, Injektionsvolumen = 30 µl (Kiselman et al. 2018)

Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]
0,0	5,0	95,0
3,0	5,0	95,0
10,5	52,0	48,0
12,0	95,0	5,0
19,0	95,0	5,0
22,0	5,0	95,0
28,0	5,0	95,0

2.2.4.2 Aufarbeitung von Api m 1 aus Mikroemulsion mit Rotationsfiltern

Zur Entwicklung einer Aufarbeitung durch Ultrafiltration wurde eine Stammlösung aus Api m 1 in gereinigtem Wasser hergestellt [1 mg/ml]. Anschließend wurden Verdünnungen mit gereinigtem Wasser und mit Mikroemulsion hergestellt (Tabelle 9). Ultrazentrifugationsfilter mit einem molekularen Cut-Off von 3, bzw. 10 kDa wurden mit 500 µl gereinigtem Wasser versetzt und für 5 Minuten bei 4 °C, 14.000 x g in einer Kühlzentrifuge konditioniert. Auf die konditionierten Filter wurden 500 µl Probenvolumen gegeben und für 5,10, bzw. 20 Minuten bei 4 °C und 14.000 x g zentrifugiert. Anschließend wurden sowohl das Filtrat als auch ein evtl. vorhandener Überstand mit der entwickelten HPLC-Methode (Tabelle 8) analysiert.

Tabelle 9: Verdünnungen für die Aufarbeitung von Api m 1 durch Ultrafiltration

Verdünnung	Vorgehen	Konzentration Api m 1 [mg/ml]
Stamm	1 mg lyophilisiertes Api m 1 + 1 ml ger. Wasser	1,0
V1	100 µl Stamm + 900 µl ME	10 ⁻¹
V2	100 µl Stamm + 900 µl ger. Wasser	10 ⁻¹
V3	100 µl V2 + 900 µl ger. Wasser	10 ⁻²
V4	100 µl V3 + 900 µl ger. Wasser	10 ⁻³
V5	100 µl V4 + 900 µl ger. Wasser	10 ⁻⁴

2.2.4.3 Aufarbeitung von Api m 1 aus Mikroemulsion mit org. Lösungsmittel

Aus einer Stammlösung von Api m 1 in Mikroemulsion [1 mg/ml] wurden verschiedene Fällungsvarianten mit organischen Lösungsmitteln entwickelt und getestet (Anhang XVI, Tabelle 59 - Tabelle 61). Die endgültige Methode ist in Tabelle 10 dargestellt. Die aufgearbeiteten Proben wurden anschließend mit der entwickelten HPLC-Methode analysiert (Tabelle 8).

Tabelle 10: Aufarbeitung von Api m 1 aus Mikroemulsion durch Acetonpräzipitation, Raumtemperatur (RT)

Reihenfolge	Anweisung
1	20 µl Api m 1 in Mikroemulsion [1 mg/ml] + 200 µl PBS + 5 µl Ameisensäure; 30 Sekunden bei 1800 rpm durchmischen (Vortex-Mischer)
2	5 Minuten zentrifugieren (20.000 x g, RT)
3	1 ml Aceton (-20 °C) hinzufügen; durchmischen (Vortex-Mischer)
4	Inkubation bei -20 °C für 1 Stunde
5	5 Minuten zentrifugieren (9000 x g; RT)
6	Überstand verwerfen; 1 ml Aceton (-20 °C) hinzufügen; durchmischen (Vortex-Mischer)
7	5 Minuten zentrifugieren (9000 x g; RT)
8	Überstand verwerfen; Restaceton abdampfen lassen
9	Solvatisieren des entstandenen Pellets in 500 µl PBS

2.2.4.4 *Bestimmung von Validierungsparametern*

Die Ermittlung der Validierungsparameter Spezifität, Linearität, Bestimmungs- und Nachweisgrenze, Wiederholbarkeit und Richtigkeit erfolgten in Anlehnung an die ICH Q2(R1)-Richtlinie (Validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1) 2005). Zur Ermittlung der Spezifität der Analytik wurden Chromatogramme von reinem PBS, Api m 1-haltigem PBS und Api m 1-haltiger Mikroemulsion miteinander verglichen. Dazu wurden Stammlösungen von Api m 1 in PBS und Mikroemulsion hergestellt [1 mg/ml]. Die PBS-Proben wurden mit PBS auf eine Konzentration von 40 µg/ml verdünnt. Api m 1 wurde unter Verwendung der finalen Acetonpräzipitationstechnik (Tabelle 10) aus Mikroemulsion gefällt und das entstandene Proteinpellet in PBS gelöst. Die Endkonzentration der Proben betrug 40 µg/ml. Als Negativprobe diente PBS-Puffer ohne Wirkstoff. Zur Überprüfung der Linearität wurde eine Kalibriergerade von Api m 1 in PBS über den Konzentrationsbereich von 20-60 µg/ml hergestellt und vermessen. Ausgehend von dieser Kalibriergeraden wurden die Nachweis- und Bestimmungsgrenze (LOD, LOQ) anhand der ICH Q2(R1) Kapitel 6.3 berechnet. Die Wiederholpräzision der Analytik wurde bestimmt, in dem Proben von Api m 1 in Mikroemulsion [1 mg/ml] sechsmal gefällt und jede Probe in Dreifachbestimmung vermessen wurde. Zur Ermittlung der Richtigkeit der Analytik wurde die prozentuale Wiederfindung von Api m 1 bestimmt (Dreifachbestimmung). Die erhaltenen AUC-Werte wurden mit den Werten der Kalibriergeraden verglichen und der prozentuale Anteil der Wiederfindung von Api m1 berechnet.

2.2.4.5 SDS-PAGE

Proben von Api m 1 in Mikroemulsion wurden mittels Acetonpräzipitation (Tabelle 10) gefällt und das erhaltene Proteinpellet anschließend in PBS gelöst [40 µg/ml]. In der Zwischenzeit wurde eine Mischung, bestehend aus 10 Vol.-% 2-Mercaptoethanol und 90 Vol.-% 4x Laemmli-Puffer, hergestellt. Anschließend wurden 30 µl Probenvolumen mit der vorbereiteten β-Mercaptoethanol in Laemmli-Puffer-Mischung versetzt und mit einem Vortex-Mischer durchmischt. Die Proben wurden im Thermo-Heizblock inkubiert (95 °C, 15 Minuten, kein Schütteln), für eine Minute bei Raumtemperatur (4000 x g) zentrifugiert und für 2 Minuten bei 5 °C gelagert. Pro Geltasche wurde ein Probenvolumen von 30 µl aufgetragen. Der Analysenlauf erfolgte bei 250 V, 400 A für 20 Minuten. Die Gele wurden anschließend mittels der ChemiDoc XRS+-Analysekammer analysiert (5 Minuten Aktivierungszeit; 5,7 Sekunden Belichtungszeit).

2.2.5 Penetrationsuntersuchungen

2.2.5.1 *Probengewinnung*

Am Tag ihrer Schlachtung wurden die Ohren frisch geschlachteter Schweine abgetrennt und gekühlt in das Labor transportiert. Die gekühlten Ohren wurden unter fließendem Leitungswasser oberflächlich von grobem Schmutz befreit. Anschließend wurden die Ohren mit Gaze abgetrocknet und die Borsten mit einem Haarschneidegerät, ohne dabei die Haut zu beschädigen, auf 3-5 mm gekürzt. Mittels Skalpell wurden rechteckige Stücke unverletzter Schweinehaut von der Rückseite der Schweineohren präpariert und von überschüssigem Fettgewebe befreit. Die Akzeptorkammer der Franz-Diffusions-Zellen (Oberfläche 1,76 cm², 12 ml Rezeptorvolumen) wurde mit PBS befüllt und mit einer Wärmepumpe auf 32,5 °C temperiert. Anschließend wurde die Schweinehaut in die Diffusions-Zellen eingespannt und für 30 Minuten äquilibriert. Danach wurden 500 µl der Galenik, welche mit fluoreszenzmarkiertem Api m 1 versetzt worden sind [0,08 µg/µl], auf die Oberseite der Hautproben appliziert und die Franz-Diffusionszelle mit Parafilm® abgedeckt. Der PBS-Puffer wurde über die gesamte Versuchsdauer mit einem Magnetrührer gerührt. Nach acht bzw. 24 Stunden wurde das Experiment abgestoppt, in dem die Hautproben von den Franz-Diffusionszellen abmontiert und unter fließendem Wasser von überschüssiger Galenik gereinigt wurden. Die gereinigten Proben wurden in rechteckige Stücke geschnitten. Isopentan wurde in eine Metallbox gefüllt und durch flüssigen Stickstoff heruntergekühlt. Die rechteckigen Proben wurden in Einbettchalen gelegt, in Einbettmedium eingebettet und anschließend im vorgekühlten Isopentan schockgefrostet. Die Proben wurden bei minus 20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.2.5.2 *Herstellung von Kryoschnitten*

Aus den bei minus 20 °C gelagerten Proben wurden Querschnitte von 12 µm Dicke angefertigt (Leica CM 1850UV Kryostat) und auf Mikroskop-Objektträger gezogen. Diese wurden bei minus 20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.2.5.3 *Auswertung der Penetration*

Um die entwickelten Galenika hinsichtlich ihres penetrationsfördernden Potentials zu untersuchen, wurden die Kryoschnittproben mit Hilfe von konfokaler Laser-Scanning Mikroskopie (CLSM) untersucht. Verwendet wurde das TCS SP5CLSM (Leica, Wetzlar, Deutschland). Die Exzitationswellenlänge betrug 633 nm, der Emissionswellenlängenbereich war 645 – 700 nm. Das verwendete Objektiv war ein HCX PL APO CS 10.0x0.40 DRY UV. Aus den aufgenommen Bildern wurden polygonale Flächen der Epidermis mit der Leica AS Lite Software markiert und das Fluoreszenzintensität/Pixel-Verhältnis des mit Alexa Fluor-647 markierten Api m 1 bestimmt. Um Signifikanz aufzuzeigen wurden ANOVA-Tests, gefolgt von einem Post-hoc-Test nach der Methode von Tukey durchgeführt. Als signifikant wurde ein $p < 0,05$ angenommen.

3 Ergebnisse und Diskussion

Die Ergebnisse, die im Rahmen dieser Arbeit erzielt wurden, sind in drei Teilbereiche gegliedert. Der erste Teil beschäftigt sich mit der Darstellung und Diskussion der Ergebnisse der Formulierungsentwicklung von Mikroemulsionen, Mikroemulsion-basierten Organogelen und Hydrogelen einschließlich deren Charakterisierung und Lagerungsstabilität. Im zweiten Teil dieser Arbeit werden die penetrationsfördernden Eigenschaften ausgewählter Formulierungen untersucht. Dazu wurde die Eindringtiefe von Alexa F[®]647-markiertem Allergen durch Auswertung des Fluoreszenzintensität/Pixel-Verhältnis mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie ermittelt. Der dritte Teil dieser Arbeit geht auf die Entwicklung einer qualitativen und quantitativen Nachweismethode des Modellallergens Api m1 mittels HPLC und die Aufarbeitung des Wirkstoffes aus der finalen Mikroemulsion ein.

3.1 Formulierungsentwicklung, -charakterisierung und Lagerungsstabilität

Das Ziel der Formulierungsentwicklung war die Identifikation und Herstellung penetrationsfördernder, dermaler Galenika. Diese sollten den Wirkstoff schützen und eine gute Penetration in die Haut ermöglichen. Aufgrund der Rohstoffauswahl sollten sie auch auf empfindlicher Allergikerhaut nicht-irritativ und gut verträglich sein. Um die Verträglichkeit zu erhöhen und das Risiko für potentielle, compliancegefährdende Hautirritationen zu vermindern, wurde während des Formulierungsdesigns daher besonders auf die Verwendung möglichst geringer Surfactantmengen und auf den Verzicht kritischer Konservierungsmittel (wie z.B. Parabene) geachtet.

3.1.1 Entwicklung von Mikroemulsionen

Obwohl es unzählige Publikationen über Mikroemulsionen mit unterschiedlichsten Zusammensetzungen gibt, ist es für den Galeniker nach wie vor eine Herausforderung vorherzusagen, welche Formulierungsbestandteile in welcher Konzentration verwendet werden müssen, um eine stabile Mikroemulsion zu erzeugen. Die Rohstoffauswahl für die Mikroemulsionsentwicklung erfolgte anhand von Literaturrecherchen. Das Potential der Surfactants Caproylocaproylmacrogol-8-glyceride EP (Labrasol®), Polyglyceryl-6-dioleat (Plurol oleique®) zur Bildung stabiler Mikroemulsionen in Kombination mit einer großen Auswahl an Ölen wurde bereits untersucht und bestätigt (Djekic und Primorac 2008; Rhee et al. 2001). Darüber hinaus verfügt Labrasol® über penetrationsfördernde Eigenschaften (Caddeo et al. 2012). Da beide Surfactants zu der Substanzklasse der nichtionischen Tenside gehören, weisen sie lediglich ein geringes hautirritatives Risiko auf (Effendy und Maibach 1995; Shafiq-un-Nabi et al. 2007) und sind somit für die in dieser Arbeit geplante dermale Anwendung sehr gut geeignet. Cetearyl-Ethylhexanoat (Tegosoft liquid®) besitzt sehr gute hydrierende Eigenschaften und ist darüber hinaus sowohl oxidationsstabil als auch gut spreitend (Blasko-Begojhn et al. 2006; Wikholm 2000). Daher wurde es in dieser Arbeit als Hauptbestandteil der Ölphase verwendet. Isopropylpalmitat wird in Mikroemulsionen als Emollients und Penetrationenhancer verwendet (Kogan und Garti 2006) und wurde daher als weiterer Bestandteil der Ölphase ausgewählt. PBS wurde aufgrund seiner weit verbreiteten Anwendung als Puffersystem für viele Proteine verwendet. Glycerol hingegen findet Verwendung als Feuchthaltemittel und kann sowohl den Verdunstungseffekt von Wasser aus der Formulierung als auch ein Austrocknen der betroffenen Hautareale am Applikationsort minimieren. Polyole, wie beispielsweise Butylenglykol, sind für ihre Fähigkeiten zur Konservierung und Penetrationsförderung bekannt und dies bei einem minimalem Risiko für Hautirritationen (Kinnunen und Koskela 1991; Fan et al. 1991). Mikroemulsionen auf Basis dieser Rohstoffe konnten mit Hilfe pseudoternärer Diagramme identifiziert werden (Abbildung 6). Die Identifizierung von Mikroemulsionen basiert in den meisten Fällen auf der visuellen Beurteilung einer Mischung auf Isotropie. Dieses Vorgehen ist jedoch stark subjektiv und die Entscheidung über Vorliegen oder Nichtvorliegen einer Mikroemulsion unterscheidet sich demnach von Anwender zu Anwender.

Um eine objektivere Entscheidungsfindung zu ermöglichen, wurde im Rahmen dieser Arbeit eine alternative Beurteilungsmethode etabliert – die Messung der optischen Dichte bei 600 nm (OD_{600}). Ein Anstieg der Trübung einer Formulierung (visuelle Kontrolle) korreliert sehr gut mit ansteigenden Absorptionswerten der OD_{600} (Kiselman et al. 2018). Dies wird durch die beispielhafte Gegenüberstellung dreier Formulierungen aus dem pseudoternären Diagramm (Abbildung 6 (1c)) und den zugehörigen OD_{600} -Werten (Abbildung 7) gezeigt. Es ist zu erkennen, dass Mischungen mit einer starken Trübung, gekennzeichnet mit „B“ und „C“, deutlich höhere Messwerte aufweisen (1,44, bzw. 2,01), als eine isotrope, klare Mikroemulsion („A“) (Kiselman et al. 2018). Die OD_{600} dieser Beispielmischungen liegt mit einem Messwert von 0,048 nahe an dem Referenzwert von reinem PBS-Puffer (0,040; Daten nicht dargestellt). Als Grenzwert für das Vorhandensein einer Mikroemulsion wurde daher eine OD_{600} von 0,10 definiert. Die Ecken der pseudoternären Diagramme (Abbildung 6) repräsentieren jeweils 100 % Massenanteil der einzelnen Phasen (Wasserphase, Ölphase oder Surfactantmischung). Jeder Punkt innerhalb des pseudoternären Diagramms repräsentiert eine definierte Mischung, bestehend aus diesen drei Phasen. Gestrichelte Linien symbolisieren Bereiche, in denen Mikroemulsionen entstanden sind, wohingegen durchgezogene Linien Makroemulsionen, bzw. Mischungen mit Phasenseparation darstellen. Es ist deutlich zu erkennen, dass bei der Verwendung von Labrasol®/Plurol oleique® (Surfactant/Cosurfactant) in einem Verhältnis von 10:8 Mikroemulsionen lediglich in sehr eng umschriebenen Bereichen mit hohem Surfactantanteil (> 40 Gew.-%) oder sehr hohem Ölphasenanteil (70 Gew.-% und größer) entstanden sind (Abbildung 1a). Deutlich größere Bereiche, in denen Mikroemulsionen entstanden sind, konnten für Surfactant/Cosurfactant-Verhältnisswerte von 11:7 (Abbildung 1b) und 11:8 (Abbildung 1c) ermittelt werden. Auch dort konnte der Großteil der entstandenen Mikroemulsionen in Bereichen mit hohem Surfactantanteil, bzw. hohem Ölphasenanteil identifiziert werden. Da jedoch das Risiko compliancegefährdender Hautirritationen (Juckreiz, Schuppung der Haut, Pustelbildung) mit steigendem Surfactantgehalt zunimmt (Seweryn 2018), scheiden diese für die geplante Therapieform aus.

In beiden Diagrammen gibt es jeweils einen eng umschriebenen Bereich, der Mikroemulsionen mit einem niedrigen Surfactantgehalt und hohem Wasserphasenanteil darstellt. Ein zu geringer Surfactantgehalt birgt jedoch die Gefahr einer nicht ausreichenden Penetrationsförderung und führt somit möglicherweise zu einem Therapieversagen. Die in Tabelle 11 beschriebene Mikroemulsion aus dem Diagramm 1c birgt zwar auf Grund des etwas höheren Surfactantgehalts ein leicht höheres Risiko für Hautirritationen als die Mikroemulsionen aus Diagramm 1b, jedoch vermutlich auch ein bessere Penetrationsförderung und somit letzten Endes einen wahrscheinlicheren Therapieerfolg. Aus diesen Gründen wurde die in Tabelle 11 beschriebene Mikroemulsion in weiterführenden Untersuchungen charakterisiert.

Tabelle 11: Zusammensetzung der Mikroemulsion (A) aus Diagramm 1c (Kiselmann et al. 2018)

Rohstoff	Massenanteil [%]
Caproylocaproylmacrogol-8 glyceride EP	11,0
Polyglyceryl-6 dioleat	8,0
Cetearylethylhexanoat	7,0
Isopropylpalmitat	1,0
Butylenglykol	10,0
Glycerol	2,6
PBS	60,4

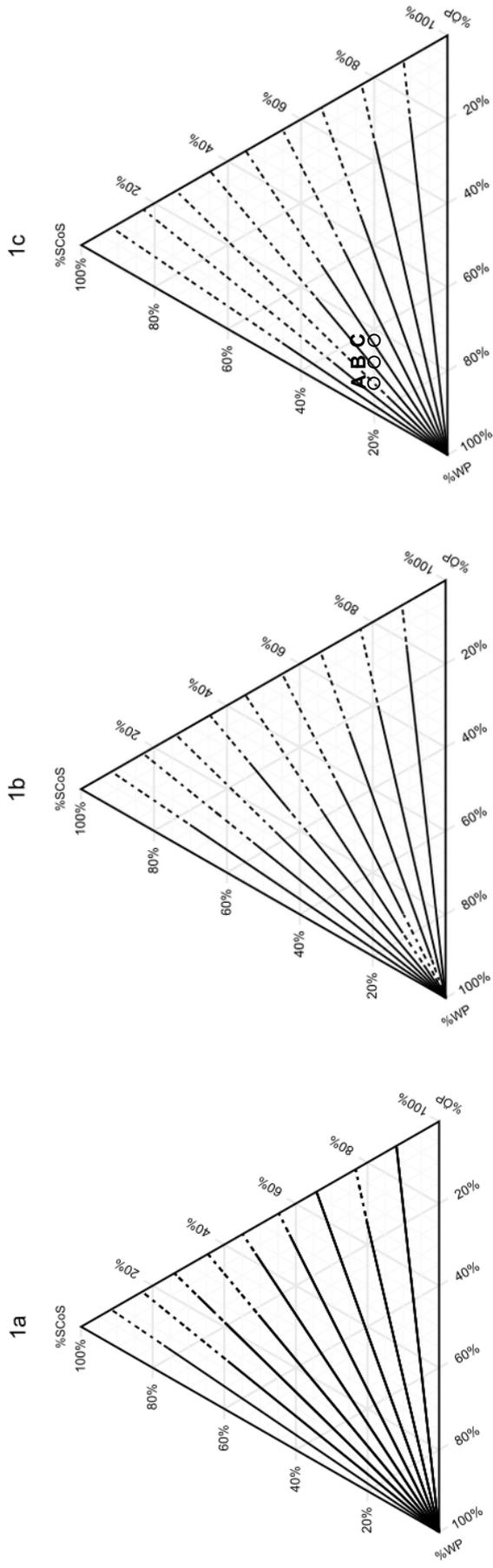


Abbildung 6: Pseudoternäre Diagramme basierend auf Mischungen von Wasserphase (WP, Butylenglykol, Glycerol, PBS 14:3:83 Gew.-%), Ölphase (ÖP; Tegosoft liquid®, Isopropylalmitat 7: 1 Gew.-%) und Surfactant-/Cosurfactantphase (SCoS; Labrasol®, Plurol olique®) 10.8 Gew.-% (1a), 11.7 Gew.-% (1b), 11.8 Gew.-% (1c); Raumtemperatur; Mikroemulsionsbereiche dargestellt als gestrichelte Linie, Makroemulsionsbereiche dargestellt als durchgezogene Linie

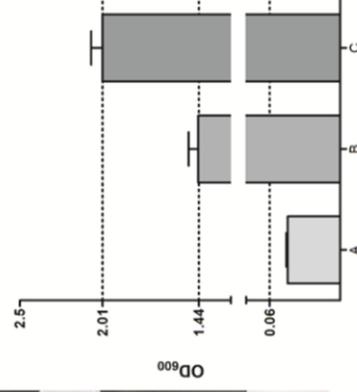
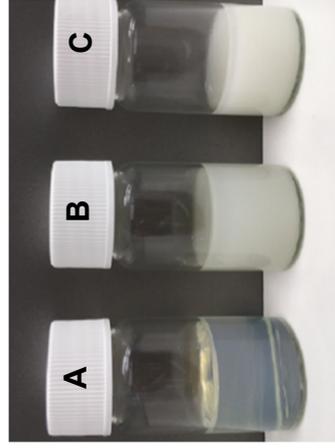


Abbildung 7: Gegenüberstellung der Ansätze A, B und C aus dem pseudoternären Diagramm 1c (Abbildung 6) und der zugehörigen OD₆₀₀-Werte (Kiselmann et al. 2018)

3.1.1.1 Testung geeigneter Konservierungsmittel

Um galenische Formulierungen ausreichend vor mikrobiellem Befall zu schützen, ist in der Regel der Zusatz eines Konservierungsmittels nötig. Viele der häufig zur Konservierung eingesetzten Substanzen, wie beispielsweise Parabene, erhöhen das Risiko potentieller Hautirritationen bei Personen mit empfindlicher Haut oder vorbestehender Hautschädigung (Soni et al. 2005), sodass auf den Einsatz solcher Substanzen in der vorliegenden Arbeit verzichtet wurde. Von entscheidender Bedeutung ist außerdem, dass die physikalische Stabilität der Formulierung durch den Konservierungsmittelzusatz nicht nachteilig beeinflusst wird. Alle getesteten Konservierungsmittelkombinationen sind in Tabelle 12 zusammengefasst (Kiselman et al. 2018). Die entwickelte Mikroemulsion (3.1.1, Tabelle 11) enthält einen Massenanteil von 10,0 Gew.-% Butylenglykol. Dieser zur chemischen Gruppe der Glykole gehörende Stoff wirkt sowohl antibakteriell als auch antifungal (Kinnunen und Koskela 1991; Faergemann und Fredriksson 1980) und besitzt lediglich ein sehr geringes Risiko für Hautirritationen (Fan et al. 1991). Glykole finden daher oftmals Anwendung als Konservierungsmittel. In dem hier beschriebenen Fall konnte die vorliegende Mikroemulsion mit 10 Gew.-% Butylenglykol bereits am zweiten Tag des Keimbelastungstestes (KBT) die Anforderungen nach europäischer Pharmakopöe 2017 (Topische Formulierungen a) nicht mehr erfüllen (Kiselman et al. 2018). Im Detail konnte das Wachstum der Testkeime *Staphylococcus aureus* (grampositiv), *Pseudomonas aeruginosa* (gramnegativ) und *Aspergillus brasiliensis* (Schimmelpilz) nicht ausreichend gehemmt werden. Möglicherweise liegt dies im Mechanismus der Konservierung von Glykolen und der tatsächlich für die Konservierung zur Verfügung stehenden Konzentration an Butylenglykol begründet. Der Mechanismus der antimikrobiellen Aktivität von Butylenglykol (und anderer Glykole) hängt eng mit ihrer chemischen Struktur zusammen. Die hydrophobe Kohlenstoffkette der Glykole tritt in Wechselwirkung mit der Zellmembran von Mikroorganismen, wohingegen ihre hydrophilen Hydroxidgruppen Wasserstoffbrückenbindungen zu benachbarten Wassermolekülen aufbauen können. In der Folge wird der zelluläre Wasserhaushalt der Mikroorganismen dysreguliert und es kommt zum „Austrocknen“ der Zielzelle (Faergemann et al. 2005).

Wechselwirkungen zwischen Butylenglykol und den übrigen Komponenten der Mikroemulsion könnten die effektiv frei vorliegende Konzentration an Butylenglykol so weit verringert haben, dass eine ausreichende Konservierung nicht mehr möglich war. Dies würde auch die widersprüchlichen Konzentrationsangaben erklären, die teilweise in der Literatur zu finden sind. So nutzten Robertson et al. (Robertson et al. 1948) 5 - 15 Gew.-%ige, wässrige Lösungen von 1,3-Butylenglykol um das Wachstum diverser grampositiver Bakterienstämme erfolgreich zu hemmen. Kinnunen et al. (Kinnunen und Koskela 1991) hingegen mussten Konzentrationen von bis zu 30 Gew.-% verwenden. Da die antimikrobielle Aktivität von Glykolen mit längeren Kohlenstoffketten größer ist als diejenige kurzkettiger Glykole (Faergemann und Fredriksson 1980), wurde der Butylenglykolanteil zunächst aus der ME entfernt und durch 5 Gew.-% Pentylenglykol ersetzt (das fehlende Volumen wurde mit PBS ergänzt). Darüber hinaus wurde eine Mikroemulsion, mit 20 Gew.-% Propylenglykol (anstelle des Butylenglykols) hergestellt, da auch dieses häufig als Konservierungsmittel Anwendung findet. Beide Glykole verfügen ebenfalls über antimikrobielle Eigenschaften (Mortz et al. 2009; Kinnunen und Koskela 1991; Robertson et al. 1948). Für Pentylenglykol wurde sogar eine Wirkung gegen multiresistente *Staphylococcus aureus* und Vancomycin-resistente Enterokokken beobachtet (Faergemann et al. 2005). Das Einarbeiten beider Glykole in die Mikroemulsion führte zu physikalischer Instabilität. Diese zeigte sich durch eine Veränderung der Optik der Formulierung ins milchig-trübe und eine Phasenseparation nach 24-stündiger Lagerung bei Raumtemperatur (Kiselman et al. 2018). Dies unterstreicht noch einmal, dass Mikroemulsionen sehr komplexe Formulierungen sind, bei denen die Art und der Massenanteil der einzelnen Komponenten entscheidend für die Stabilität sind (Kreilgaard 2002). Die Ursache der Instabilität kann im vorliegenden Fall nicht auf eine bestimmte Interaktion zurückgeführt werden, sondern ist vermutlich im komplexen Zusammenspiel der einzelnen Bestandteile der Mikroemulsion begründet. Aufgrund der eingetretenen Phasenseparation kann jedoch vermutet werden, dass die zur Stabilisierung der Mikroemulsion benötigte Grenzflächenenergie nicht erreicht werden konnte, sodass es zunächst zu Veränderungen (z.B. größere Tröpfchengröße) und schließlich zur vollständigen Zerstörung der Mikroemulsionsstruktur kam. Dies würde die Eintrübung und die Phasentrennung erklären.

Der Einfluss der Grenzflächenenergie auf die Entstehung und Stabilität einer Mikroemulsion wird im nachfolgenden Kapitel (3.1.1.2 „Stabilitätsuntersuchungen der Mikroemulsion“) noch einmal ausführlicher erläutert. Da die physikochemisch stabile Mikroemulsion mit 10 Gew.-% Butylenglykol lediglich gegen einige Testkeime (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*) nicht die benötigte Keimzahlreduktion erreichte, wurden dieser Formulierung zusätzliche Konservierungsmittel hinzugefügt. Im Detail wurden Kombinationen von Butylenglykol mit Phenoxyethanol (10:1), bzw. Ethylhexylglycerin (20:1) getestet (Kiselman et al. 2018). Phenoxyethanol besitzt ausgeprägte antibakterielle und antifungale Eigenschaften und weist darüber hinaus ein sehr geringes Potential für Hautreizungen auf (Bohn und Bircher 2001; Lovell et al. 1984; Meyer et al. 2007). Ethylhexylglycerin wird vor allem in der kosmetischen Industrie als Enhancer der antibakteriellen Aktivität vieler Polyole eingesetzt (Leschke 2006; Stoffels 2012). Diese Konservierungsmittelkombinationen führten jeweils zur Entstehung stabiler, optisch klarer, einphasiger Systeme. Ein Vergleich der OD₆₀₀ der lediglich mit Butylenglykol konservierten Mikroemulsion und den Formulierungen, die mit Phenoxyethanol bzw. Ethylhexylglycerin ergänzt wurden, zeigten keine relevanten Unterschiede (Tabelle 12) (Kiselman et al. 2018). In allen drei Fällen handelt es sich demnach um Mikroemulsionen. Trotzdem war lediglich die Kombination aus Butylenglykol und Phenoxyethanol (10:1) in der Lage, die Keimzahl aller verwendeten Testkeime auf das von der europäischen Pharmakopöe geforderte Niveau abzusenken und beizubehalten.

Tabelle 12: Einfluss der Konservierungsmittel auf die physikochemische- und mikrobiologische Stabilität der Mikroemulsion (ME): (+) einphasig, optisch klar; (-) Eintrübung, Phasenseparation; (o) nicht untersucht. Optische Dichte bei 600 nm = OD₆₀₀ (n = 3, MW ± SD), Konservierungsmittel-Belastungstest = KBT; angegebene Konzentrationen sind die finalen Konzentrationen in der Formulierung [Gew.-%]

Konservierungsmittel	Gew.-%	Visuelle Inspektion	OD ₆₀₀	KBT
Butylenglykol/Phenoxyethanol (10:1)	11,0	+	0,044 ± 0,001	+
Butylenglykol/Ethylhexylglycerol (20:1)	10,5	+	0,045 ± 0,000	-
Butylenglykol	10,0	+	0,044 ± 0,002	-
Propylenglykol	20,0	-	o	o
Pentylenglykol	5,0	-	o	o

3.1.1.2 Stabilitätsuntersuchung der Mikroemulsion

Die Langzeitstabilität der mit Butylenglykol und Phenoxyethanol (10:1) konservierten Mikroemulsion wurde anhand diverser physikochemischer Verfahren untersucht. Prinzipiell stellt die visuelle Kontrolle auf Isotropie und Homogenität die am häufigsten angewendete Methode zur Überprüfung auf das Vorhandensein einer Mikroemulsion dar. In dieser Arbeit wurde zusätzlich die optische Dichte bei 600 nm gemessen und mögliche Veränderungen der Mikrostruktur der Mikroemulsion unter Anwendung der dynamischen Lichtstreuung (DLS) ermittelt. Zusätzlich wurde die Viskosität der frisch hergestellten Mikroemulsion und nach dreimonatiger Lagerung ermittelt. Die Lagerungsbedingungen wurden anhand der ICH-Richtlinie Q1A (R2) zur Stabilitätstestung neuer Produkte gewählt (ICH Guideline 2003). Alle Messwerte sind in Tabelle 13 zusammengefasst. Die getestete Mikroemulsion blieb über den kompletten Lagerungszeitraum (3 Monate) homogen, optisch klar und isotrop. Weder die Lagerung bei 25 °C, 60 %rH noch bei 40 °C, 75 %rH führten zu Phasenseparation oder einer erhöhten Trübung (Kiselman et al. 2018). Eine Einlagerung bei 5 °C (Kühlschrank) hingegen führte nach einem Tag Lagerungszeit zu einer Phasenseparation und einem starken Anstieg der OD₆₀₀ (Messwerte nicht dargestellt). Nach einer vierstündigen Wartezeit, in dem die Mikroemulsion wieder Raumtemperatur annehmen konnte, wurde die Wiederherstellung eines einphasigen, isotropen Systems beobachtet (Kiselman et al. 2018). Diese „Re-Mikroemulsifikation“ ist ein typisches Charakteristikum von Mikroemulsionen. Eine Erklärung für dieses Phänomen liefert eine Betrachtung der thermodynamischen Voraussetzungen der Mikroemulsionsbildung. Diverse Studien beschreiben die innere Energie eines Systems mit einer vereinfachten Betrachtung der Gibbs'schen freien Bildungsenthalpie:

$$\Delta G_f = \gamma \cdot \Delta A - T \cdot \Delta S$$

Formel 3: Gibbs'sche freie Bildungsenthalpie

mit ΔG_f = Gibbs'sche freie Bildungsenthalpie der Mikroemulsionsbildung, γ = Grenzflächenspannung zwischen Öl und Wasser, ΔA = Änderung der Grenzfläche während des Emulsifizierungsprozess, T = Temperatur während der Emulsifikation und ΔS die Änderung der Entropie (Kahlweit et al. 1992; Lawrence und Rees 2012; Ruckenstein und Chi 1975).

Damit eine spontane Mikroemulsionsbildung stattfinden kann, muss ΔG_f einen negativen Wert annehmen. Bei der Herstellung der Mikroemulsion unter Raumtemperatur waren diese Bedingungen demnach erfüllt. Durch die Lagerung bei 5 °C verändert sich der Wert des Terms „ $T \cdot \Delta S$ “, sodass sich folglich auch der Wert für ΔG_f veränderte (Kiselman et al. 2018). Im Fall der külschrankgelagerten Mikroemulsion kann geschlussfolgert werden, dass die zur Bildung einer Mikroemulsion benötigte Gibbs'sche freie Bildungsenthalpie nicht mehr erreicht und die Mikroemulsionsstruktur daher verändert bzw. zerstört wurde. Veränderungen der inneren Struktur einer Mikroemulsion bis hin zum Entstehen einer Makroemulsion wurden bereits in der Literatur beschrieben (Wennerström et al. 2006). Beim erneuten Äquilibrieren der destabilisierten Mikroemulsion auf Raumtemperatur stieg das Produkt „ $T \cdot \Delta S$ “ vermutlich wieder, sodass die benötigte ΔG_f den für die Mikroemulsionsbildung benötigten Wert erreichte. Um einen Einblick in die Mikrostruktur der bei 25 °C, 60 %rH und 40 °C, 75 %rH gelagerten Proben zu erhalten und gegebenenfalls auftretende Veränderungen dieser zu detektieren, wurden DLS-Messungen durchgeführt. Sowohl die Lagerung bei 25 °C, 60 %rH als auch bei 40 °C, 75 %rH führten zu einem Anstieg des z-Average, wobei dieser im direkten Vergleich für die bei 40 °C gelagerten Proben deutlich größer ausfällt (Tabelle 13) (Kiselman et al. 2018). Dies lässt sich auf den Einfluss der Temperatur und Verdunstungseffekte während der Lagerung auf den gemessenen z-Average erklären. Der z-Average-Wert ist ein vom Messinstrument kalkulierter Wert, der mathematisch korrekter als intensitäts-gewichtetes harmonisches Mittel des durchschnittlichen Partikeldurchmessers bezeichnet und mit nachfolgender Gleichung kalkuliert wird (ISO 22412 2008):

$$D_z = \frac{\sum S_i}{\sum \frac{S_i}{D_i}}$$

Formel 4: Kalkulation des z-Average nach ISO 22412 2008

mit D_z = z-Average , S_i = Streuungsintensität des Partikels i und D_i = Durchmesser des Partikel i .

Bei der dynamischen Lichtstreuung werden jedoch nicht die absoluten Partikelgrößen vermessen sondern die durch die Brownsche Molekularbewegung der Teilchen in der Messprobe entstehende Fluktuationen im Streulicht.

Anhand dieses Fluktuationmusters wird durch eine Korrelationsfunktion die Diffusionskonstante (Diffusionskoeffizient) berechnet. Durch Anwendung der Stokes-Einstein-Gleichung (Formel 5) wird unter Verwendung des Diffusionskoeffizienten der Durchmesser des „Partikels“ ermittelt:

$$D = \frac{k \cdot T}{3 \cdot \pi \cdot \eta \cdot d_p},$$

Formel 5: Berechnung des Diffusionskoeffizienten mittels Stokes-Einstein-Gleichung

mit D = Diffusionskoeffizient des Partikels, k = Boltzmann-Konstante, T = Temperatur, η = Viskosität des umgebenden Mediums, d_p = Durchmesser des Partikels.

Der auf diesem Wege kalkulierte Partikeldurchmesser wird anschließend als Wert für D_i in Formel 4 verwendet und ein z-Average-Wert berechnet. Dieser z-Average-Wert entspricht nun der Größe eines idealsphärischen Partikels, das die initial aufgezeichnete Schwankungsgeschwindigkeit im Streulichtsignal verursachen würde. Eine Beeinflussung der Brown'schen Molekularbewegungen, z.B. durch eine temperaturbedingte Änderung der inneren Struktur der Mikroemulsion, würde also direkt die Diffusionskonstante der Messprobe verändern und somit auch den kalkulierten Wert des z-Average. Diverse Studien zeigten, dass Mikroemulsionen unterschiedliche innere Strukturen aufweisen können. Dies sind z.B. Tröpfchen, kubische Strukturen, lamellare und bikontinuierliche Phasen sowie ellipsoide Strukturen und Mischformen (Lawrence 1994; Scriven 1976; Nagarajan und Ruckenstein 2000; Lawrence und Rees 2012). Da die innere Struktur der entwickelten Mikroemulsion jedoch nicht vollständig aufgeklärt ist, könnten die gemessenen Veränderungen des z-Average auf eine mögliche Änderung dieser hinweisen und nicht die absolute Größe der Mikroemulsionströpfchen repräsentieren (Kiselman et al. 2018). Unabhängig davon belegen die visuelle Kontrolle und die nahezu konstanten Messwerte der optischen Dichte der eingelagerten Proben das Vorhandensein einer Mikroemulsion (Tabelle 13). Die Viskosität der frisch hergestellten Mikroemulsion betrug $29,63 \pm 0,56$ mPa·s, diejenige der 3 Monate gelagerten Formulierungen $32,11 \pm 0,45$ mPa·s (Kiselman et al. 2018). Die Mikroemulsion zeigte jederzeit das rheologische Verhalten eines ideal-newton'schen Fluids, bei dem die Viskosität scherratenunabhängig konstant bleibt (Anhang II, Abbildung 43 – Abbildung 44).

Sie ist demnach als niedrigviskose Mikroemulsion einzuordnen. Die meisten Mikroemulsionen, deren Viskosität nicht nachträglich durch den Zusatz von viskositätserhöhenden Substanzen modifiziert wurde, sind niedrigviskos (Lawrence und Rees 2012).

Tabelle 13: Physikochemische Eigenschaften der Mikroemulsion während der dreimonatigen Lagerung unter verschiedenen Bedingungen; z-Average (d.nm) und Polydispersitätsindex (PDI) ermittelt durch DLS-Messungen (MW \pm SD; n = 9); optische Dichte (OD₆₀₀) (MW \pm SD; n = 9); (Kiselmann et al. 2018)

Zeitpunkt	25 °C, 60 %rH			40 °C, 75 %rH		
	z-Ave (d.nm)	PDI	OD ₆₀₀	z-Ave (d.nm)	PDI	OD ₆₀₀
Tag 1	50,43 \pm 3,52	0,71 \pm 0,13	0,044 \pm 0,00	50,43 \pm 3,52	0,71 \pm 0,13	0,044 \pm 0,00
Monat 1	71,65 \pm 2,79	0,53 \pm 0,01	0,045 \pm 0,00	94,90 \pm 2,86	0,48 \pm 0,11	0,045 \pm 0,00
Monat 2	84,90 \pm 3,45	0,49 \pm 0,02	0,043 \pm 0,00	130,34 \pm 10,48	0,37 \pm 0,04	0,044 \pm 0,00
Monat 3	98,52 \pm 8,39	0,48 \pm 0,02	0,041 \pm 0,00	194,43 \pm 15,58	0,29 \pm 0,02	0,040 \pm 0,00

3.1.2 Entwicklung und Charakterisierung von Mikroemulsion-basierten Organogelen

Die Vorteile einer klassischen Mikroemulsion (Stabilität, Penetrationsförderung, einfache Herstellung etc.) wurden bereits ausführlich dargestellt. Aufgrund ihrer niedrigen Viskosität kommt es jedoch zu Einschränkungen bezüglich der möglichen Applikationsorte. Jedoch können eine Vielzahl inerter Polymere und gelbildender Surfactants die Viskosität von Mikroemulsionen erhöhen und diesen Nachteil ausgleichen (Bonina et al. 1995; Dreher et al. 1997; Kantaria et al. 1999; Peira et al. 2001; Trotta et al. 1996; Trotta et al. 1997). Auf dieser Basis wurden potentiell geeignete Gelbildner und Mischungen von Gelbildnern in einem zeiteffizienten Screening identifiziert. Anschließend wurden die physikochemischen Eigenschaften der zwei geeignetsten Formulierungen in einer Kurzzeit-Stabilitätsstudie rheologisch untersucht und deren Struktur mikroskopisch begutachtet.

3.1.2.1 *Screening geeigneter Gelbildner*

Die Gelbildner Xanthan (Cosphaderm®X34) und Dehydroxanthan (Amaze®XT) gehören beide zu den Hydrokolloidgelbildnern. Beide Substanzen sind in der Lage in wässrigen Lösungen stabile Gele auszubilden, die eine gute Robustheit gegenüber Schwankungen der Temperatur und der Salzkonzentration aufweisen (Sahin und Ozdemir 2004; Urlacher und Noble 1997). Xanthane zeichnen sich darüber hinaus durch eine sehr gute Verträglichkeit bei dermalen Applikation und oraler Einnahme aus. Nach der Herstellung der Formulierungen konnte sowohl für Xanthan, als auch für Dehydroxanthan ab einer Einsatzkonzentration von 5,0 Gew.-% eine Gelierung der Mikroemulsion beobachtet werden. Die Viskosität der Gele stieg jeweils konzentrationsabhängig an, sodass Xanthan (Cosphaderm® X34) ab einer Einsatzkonzentration von 10,0 Gew.-% ein formstabiles Gel ausbildete, welches beim Invertieren des Ansatzgefäßes um 180° nicht zu fließen begann. Für Dehydroxanthan war die Grenze hierfür bereits bei einer Einsatzkonzentration von 7,5 Gew.-% erreicht. Für Einsatzkonzentrationen unter 5,0 Gew.-% konnten weder Xanthan noch Dehydroxanthan die Mikroemulsion in ein homogenes Gel überführen. Das bedeutet, dass die Formulierung gelierte und nicht gelierte Bereiche aufwies.

Unabhängig von der Homogenität und Viskosität des entstandenen Systems konnte ein konzentrationsabhängiges Eintrüben der Mikroemulsion bis ins milchig-trübe beobachtet werden. Dies könnte ein Zeichen für die Zerstörung der Mikroemulsionsstruktur sein und wurde bereits in der Literatur beschrieben, wobei Chen et al. (Chen et al. 2006) für eine Konzentration von Xanthan bis zu 2,0 Gew.-% keine Veränderung der Mikroemulsionsoptik feststellen konnten. Nach einer erneuten visuellen Kontrolle der Gelansätze nach 24-stündiger Lagerung entstand auf der Oberfläche der vormals einphasigen MBO auf Xanthan- und Dehydroxanthanbasis eine geringe Menge an freiliegender Ölphase. Da eine weitere Erhöhung der Xanthan-/Dehydroxanthanmenge aus produktionstechnischer Sicht sehr schwierig ist (Gefahr der Entstehung nicht ausreichend gelöster Feststoffpartikel) wurden andere Gelbildner als Alternative getestet. Natriumalginat ist ein unverzweigtes Polysaccharidpolymer und besteht aus α -L-Guluronsäure und β -D-Mannuronsäure. Es wurde bereits in vielen Studien als Gelbildner in der pharmazeutischen Industrie, Lebensmitteltechnologie und als Biomaterial in der Bioverfahrenstechnik eingesetzt (Augst et al. 2006). Das Einarbeiten verschiedener Natriumalginatmengen (Tabelle 14) führte ebenfalls zu Instabilitäten. Nach 24-stündiger Lagerung konnte am Boden der verwendeten Gefäße eine gelierte Masse gefunden werden, auf der eine große Menge freier Flüssigkeit vorlag. Dies steht im Einklang mit den Beobachtungen von Bachhav und Patravale (Bachhav und Patravale 2009), die ebenfalls Instabilitäten nach dem Einarbeiten von Natriumalginat in Mikroemulsionen bis hin zu Phasenseparation beschreiben. Die Autoren begründen dies mit dem destabilisierenden Einfluss, den Salze auf eine Mikroemulsion haben können. Dies könnte auch im vorliegenden Fall ein Faktor für das Nichtausbilden eines ausreichend starken Gelgerüsts sein. Im Kern beruht sowohl die Bildung eines Hydrogels als auch eines Oleogels darauf, dass die Moleküle der gelbildenden Substanzen einer Formulierung untereinander ein dreidimensionales Netzwerk ausbilden. Dies kann sowohl physikalisch (ionische Wechselwirkungen, Wasserstoffbrückenbildung, Mikrokristallbildung, hydrophobe Wechselwirkungen, etc.), als auch chemisch (Copolymerisation, chemische/thermische/strahlungsinduzierte Quervernetzung, etc.) initiiert werden (Hoffman 2012).

Für Mikroemulsion-basierte Organogele gibt es bislang kein systematisches Review das den Gelierungsprozess näher beschreibt. Auf Grund der Verschiedenartigkeit der Zusammensetzung der jeweiligen Mikroemulsionen und der Vielfalt an potentiellen Gelbildnern scheint dies auch schier unmöglich. Trotzdem postulierten Riess und Krafft in ihrer Arbeit die Struktur eines Gelatine-basierten MBO basierend auf Engwinkel-Röntgenbeugungsmessungen (Riess und Krafft 1997). Diesem Postulat zu Folge, bildete sich ein dreidimensionales Gerüst aus Gelatine-Wasserkanälen das von Surfactants stabilisiert wurde. Innerhalb dieses Gerüsts seien Mikroemulsionströpfchen inkorporiert. Dies würde bedeuten, dass nicht die komplette Mikroemulsion geliert sondern lediglich ein Teil der Wasserphase als strukturbildendes Gerüst vorliegt. Ähnliches berichteten auch Atkinson et al. (Atkinson et al. 1991). Obwohl die in dieser Arbeit untersuchten Formulierungen aus völlig anderen Rohstoffen bestehen und keine Gelatine als Gelbildner verwendet wird, könnte dieses Postulat einen Anhaltspunkt für die in dieser Arbeit beobachtete Instabilität geben. Denkbar wäre es, dass Xanthan, Natriumalginat und Dehydroxanthan ebenfalls mit dem wässrigen Anteil der Mikroemulsion ein Gelgerüst ausbildeten, dieses jedoch nicht stabil genug war und daher die darin inkorporierte, flüssige Mikroemulsion freigesetzt wurde. Um zu überprüfen ob der Einsatz eines Oleogelbildners in der Lage ist ein ausreichend stabiles Gelgerüst auszubilden, wurden Experimente mit hochdisperssem Siliziumdioxid (Aerosil®) durchgeführt. Dieses kann aufgrund seiner Polysilanolgruppen sowohl in apolaren als auch polaren Lösungsmitteln ein dreidimensionales Netzwerk aufbauen (Voigt und Fahr 2010). Sowohl bei einer Einsatzmenge von 2,5 Gew.-% als auch 5,0 Gew.-% kam es zur Gelierung von Teilen der Mikroemulsion, jedoch konnte kein homogenes Gel hergestellt werden. Höhere Einsatzkonzentrationen ließen sich nicht mehr homogen solubilisieren.

Tabelle 14: Übersicht über die entwickelten Mikroemulsion-basierten Organogele (MBO) basierend auf einem einzelnen Gelbildner; Xanthan (Cosphaderm®X34, Cos), Dehydroxanthan (Amaze®XT, Ama), Alginat (Alg), Aerosil® (Aer)

MBO-Name	Gelbildner	Gesamtmenge [Gew.-%]
Cos _{0,5}	Xanthan	0,5
Cos _{1,0}	Xanthan	1,0
Cos _{1,5}	Xanthan	1,5
Cos _{2,0}	Xanthan	2,0
Cos _{5,0}	Xanthan	5,0
Cos _{7,5}	Xanthan	7,5
Cos _{10,0}	Xanthan	10,0
Ama _{0,5}	Dehydroxanthan	0,5
Ama _{1,0}	Dehydroxanthan	1,0
Ama _{1,5}	Dehydroxanthan	1,5
Ama _{2,0}	Dehydroxanthan	2,0
Ama _{5,0}	Dehydroxanthan	5,0
Ama _{7,5}	Dehydroxanthan	7,5
Ama _{10,0}	Dehydroxanthan	10,0
Alg _{2,5}	Natriumalginat	2,5
Alg _{3,75}	Natriumalginat	3,75
Alg _{5,0}	Natriumalginat	5,0
Aer _{2,5}	Aerosil®	2,5
Aer _{5,0}	Aerosil®	5,0

Kombination von Aerosil®, Alginat und Amaze®XT

Basierend auf dem ersten Gelbildnerscreening wurden Kombinationen aus Aerosil®, Dehydroxanthan (Amaze®XT) und Natriumalginat getestet. Die Formulierungen wurden organoleptisch auf Homogenität und Aussehen überprüft. Die Gelstärke der organoleptisch für gut befundenen Gele wurde anschließend im linear-viskoelastischen Bereich (LVEB) rheologisch bestimmt (Tabelle 15, Rheogramme im Anhang IV: Abbildung 45 bis Abbildung 56).

Tabelle 15: Übersicht über die Gelstärke einiger MBO bei Raumtemperatur, 24 h nach ihrer Herstellung, Gelstärke = Mittelwert des Speichermodul G' im linear-viskoelastischen Bereich (LVEB) [Pa]; Einfachbestimmung

MBO	Aerosil® [Gew.-%]	Alginat [Gew.-%]	Dehydroxanthan [Gew.-%]	G' [Pa]
1	2,50	3,75	5,00	3424,56 ± 87,29
2	-	7,50	5,00	2956,30 ± 113,60
11	-	3,75	10,00	2009,45 ± 76,40
15	-	3,75	2,50	573,14 ± 15,30
16	1,00	3,75	-	223,71 ± 19,47
17	1,00	3,50	2,50	1606,40 ± 90,06
18	1,00	3,00	1,00	224,95 ± 7,88
19	1,00	3,50	1,00	225,74 ± 12,60
20	1,00	4,00	1,50	424,62 ± 16,60
21	1,50	3,50	1,50	379,33 ± 11,39
22	1,75	3,50	1,50	534,58 ± 60,88
23	2,00	3,50	1,50	537,09 ± 23,65

Durch Kombinationen der drei Gelbildner konnten für alle in Tabelle 15 beschriebenen Formulierungen homogene MBO erhalten werden. Alle Gele zeigten eine weißliche Optik, was auf eine Zerstörung der ursprünglichen Mikroemulsionsstruktur hinweisen könnte. Auf diesen Aspekt wird in Kapitel 3.1.2.3 „Lichtmikroskopische Untersuchung der Mikroemulsion-basierten Organogele“ weiter eingegangen. Den besten Kompromiss aus Organoleptik, Spreitbarkeit auf der Haut und Gelstärke stellten die Formulierungen MBO 16 (Aerosil® 1,00 Gew.-%, Natriumalginat 3,75 Gew.-%) und MBO 18 (Aerosil® 1,00 Gew.-%, Natriumalginat 3,00 Gew.-% und Dehydroxanthan 1,00 Gew.-%) dar.

Beide MBO ließen sich sehr gut auf der Haut spreiten und hinterließen ein angenehmes, weiches Hautgefühl. Beim Invertieren der Ansatzgefäße um 180° zeigten beide Formulierungen ein verzögertes Fließverhalten, sodass sie verglichen mit der reinen Mikroemulsion einen Benefit hinsichtlich der möglichen Applikationsorte liefern. Die übrigen MBO waren den beschriebenen Formulierungen (MBO 16 und 18) zwar im Hinblick auf ihre Gelstärke überlegen, zeigten aber eine schlechtere Spreitbarkeit (vor allem MBO 1, 2, 11 und 17), bzw. hinterließen beim Auftragen kleine Partikel. Aus diesem Grund wurden MBO 16 und 18 für eine weiterführende Charakterisierung im Rahmen einer Stabilitätsstudie verwendet.

3.1.2.2 *Rheologische Untersuchungen der Stabilität der Mikroemulsion-basierten Organogele*

Um den Einfluss verschiedener Lagerungsbedingungen auf die Stabilität der MBO 16 und MBO 18 zu untersuchen, wurden oszillationsrheologische Untersuchungen (Amplituden-, Temperatur- und Frequenzsweep) durchgeführt. Mit Hilfe dieser drei Messverfahren können Rückschlüsse auf die physikochemischen Eigenschaften der Formulierungen (z.B. Gelstärke, Risiko für Spröbruchverhalten, Erschütterungsresistenz, usw.) erhalten werden und deren Stabilität beurteilt werden.

Amplitudensweep

Der Amplitudensweep bezeichnet einen rheologischen Oszillationsversuch, bei dem die Messamplitude variiert, andere Parameter (Frequenz, Temperatur) jedoch konstant gehalten werden. Er dient der Ermittlung wichtiger rheologischer Kenngrößen (linear-viskoelastischer Bereich, Nachgebe- und Fließgrenze, Fließübergangsindex). Die Rheogramme der Amplitudensweeps der MBO 16 und 18 zum Startzeitpunkt der Stabilitätsstudie sind in Abbildung 8 und Abbildung 9 dargestellt (weitere Rheogramme im Anhang V, Abbildung 57 – Abbildung 61). In beiden Gelen dominiert zu Beginn der Stabilitätsstudie und nach einmonatiger Lagerung (Ausnahme: Proben von MBO 18, 40 °C, 75 %rH) bis zum Erreichen eines Grenzwertes (siehe Unterpunkt „Fließgrenze“) der Speichermodul (G') über dem Verlustmodul (G''). Die Problematik im Falle von MBO 18 wird im nachfolgenden Unterkapitel „Bestimmung der Gelstärke“ detaillierter beschrieben. Der Speichermodul G' repräsentiert den elastischen Anteil einer Substanz und entspricht dem Anteil der zugeführten Deformationsenergie, der während des Scherprozesses in der Messprobe gespeichert wird und nach Entlastung wieder vollständig zur Verfügung steht. Der Verlustmodul G'' hingegen repräsentiert den viskosen Anteil einer Substanz und entspricht dem Anteil der Deformationsenergie, der während des Scherprozesses durch innere Reibung der Moleküle der Messprobe verbraucht (dissipiert) wird und nach der Entlastung nicht wieder zur Verfügung steht. Ein Dominieren des Speichermoduls weist demnach auf ein überwiegend elastisches Verhalten der Messproben hin, welches typisch für gelartige Stoffe ist. Bei beiden MBO handelt es sich somit definitionsgemäß über den gesamten Lagerungszeitraum um Gele (Vries 2006).

Tabelle 16: Ergebnisse des Amplitudensweeps von MBO 16 (1,0 Gew.-% Aerosil®, 3,75 Gew.-% Natriumalginat) zu Beginn und nach einmonatiger Lagerung; Ergebnisse dargestellt als Mittelwert \pm Standardabweichung (n = 3); Gelstärke = Mittelwert Speichermodul G' [Pa] im LVEB; Fließübergangsindex = Fließgrenze [Pa]/Nachgebegrenze [Pa], Messtemperatur = 25 °C

Messwert	MBO 16		
	Tag 1	Monat 1 (25 °C, 60 %rH)	Monat 1 (40 °C, 75 %rH)
LVEB [%]	0,05 – 0,73	0,05 – 0,73	0,05 – 0,73
Gelstärke [Pa]	508,51 \pm 30,82	543,33 \pm 52,44	976,34 \pm 116,4
Nachgebegrenze γ_y Scherdef. [%]	0,73 \pm 0,00	0,74 \pm 0,00	0,74 \pm 0,00
Nachgebegrenze τ_y Schubsp. [Pa]	4,10 \pm 0,22	3,93 \pm 0,62	6,56 \pm 1,18
Fließgrenze γ_f Scherdef. [%]	28,17 \pm 1,59	28,63 \pm 0,16	15,64 \pm 1,93
Fließgrenze τ_f Schubsp. [Pa]	10,99 \pm 0,76	13,81 \pm 0,38	15,94 \pm 1,87
Fließübergangsindex (τ_f/τ_y)	2,68 \pm 0,04	3,51 \pm 0,40	2,43 \pm 0,13

Tabelle 17: Ergebnisse des Amplitudensweeps von MBO 18 (1,0 Gew.-% Aerosil®, 3,0 Gew.-% Natriumalginat, 11, zu Beginn und nach einmonatiger Lagerung; Ergebnisse dargestellt als Mittelwert \pm Standardabweichung (n = 3); Gelstärke = Mittelwert Speichermodul G' [Pa] im LVEB; Fließübergangsindex = Fließgrenze [Pa]/Nachgebegrenze [Pa], Messtemperatur = 25 °C

Messwert	MBO 18		
	Tag 1	Monat 1 (25 °C, 60 %rH)	Monat 1 (40 °C, 75 %rH)
LVEB [%]	0,10 – 0,63	0,10 – 0,63	
Gelstärke [Pa]	1084,12 \pm 65,88	1303,55 \pm 170,19	
Nachgebegrenze γ_y Scherdef. [%]	0,63 \pm 0,00	0,63 \pm 0,00	
Nachgebegrenze τ_y Schubsp. [Pa]	6,65 \pm 0,84	7,66 \pm 1,05	Nicht bestimmbar
Fließgrenze γ_f Scherdef. [%]	16,96 \pm 2,42	15,93 \pm 1,23	
Fließgrenze τ_f Schubsp. [Pa]	19,81 \pm 2,38	25,46 \pm 1,89	
Fließübergangsindex (τ_f/τ_y)	2,98 \pm 0,01	3,33 \pm 0,19	

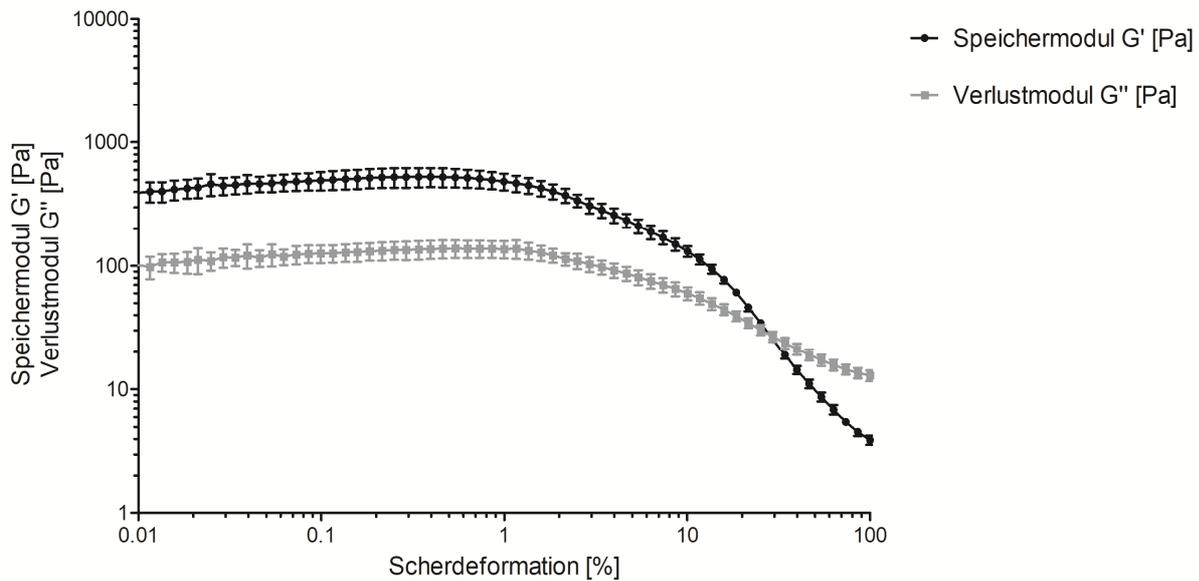


Abbildung 8: Amplitudensweep des Mikroemulsions-basierten Organogels (MBO) 16 an Tag 1 der Lagerungsstabilität, 72 Stunden nach Herstellung, Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa ($MW \pm SD$; $n = 3$), MBO 16 = 1,0 Gew.-% Aerosil®, 3,75 Gew.-% Natriumalginat, Kreisfrequenz = 10 rad/s; Messtemperatur = 25 °C, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt = 500 μm

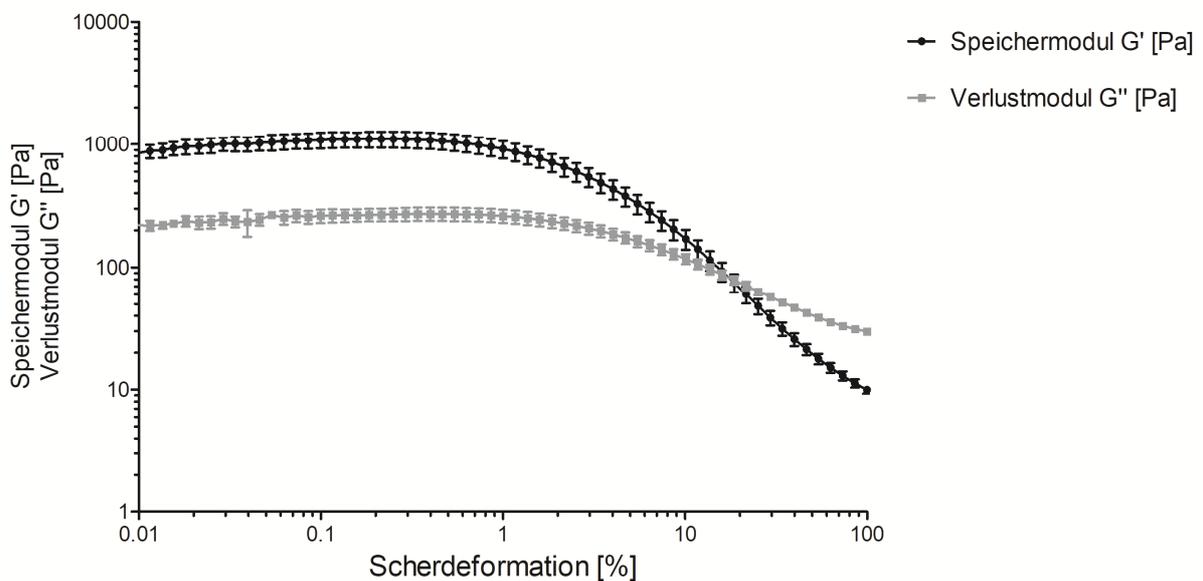


Abbildung 9: Amplitudensweep des Mikroemulsions-basierten Organogels (MBO) 18 an Tag 1 der Lagerungsstabilität, 72 Stunden nach Herstellung, Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa ($MW \pm SD$; $n = 3$), MBO 18 = 1,0 Gew.-% Alginat®, 3,0 Gew.-% Natriumalginat, 1,0 Gew.-% Dehydroxanthan, Kreisfrequenz = 10 rad/s; Messtemperatur = 25 °C, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt = 500 μm

Bestimmung des linear-viskoelastischen Bereichs

Der Bereich zwischen Beginn und Ende des Plateaus von G' wird auch linear-viskoelastischer Bereich (LVEB) genannt. Er ist ein wichtiger Parameter für weitere rheologische Messungen, da es innerhalb des LVEB zu keiner irreversiblen Schädigung der Probenmatrix durch Scherung kommt. Während der gesamten Lagerungszeit konnte, unabhängig von den Lagerungsbedingungen, keine Veränderung des LVEB festgestellt werden (Tabelle 16 und Tabelle 17). Darauf aufbauend wurde in allen nachfolgenden Frequenz- und Temperatursweeps sowohl für MBO 16 als auch für MBO 18 eine Grenzdeformation von 0,25 % gewählt.

Bestimmung der Gelstärke

Die Gelstärke, die als Mittelwert der Messwerte des Speichermoduls G' innerhalb des LVEB bestimmt wurde, betrug für MBO 16 (1,0 Gew.-% Aerosil®, 3,75 Gew.-% Natriumalginat) an Tag 1 der Stabilitätsuntersuchung $508,51 \pm 30,82$ Pa. Diese ist, verglichen mit der während der Formulierungsentwicklung ermittelten Gelstärke von MBO 16 ($223,77 \pm 19,47$ Pa; vgl. Tabelle 15), deutlich größer. Hydrogele beginnen, nachdem sie mit geeigneten Solventien in Kontakt geraten sind, mit dem Ausbilden einer Gelstruktur. Dieser Vorgang ist geprägt durch ein Zusammenspiel elektrostatischer und osmotischer Prozesse (Ganji et al. 2010). Im Verlauf des Gelierungsprozess kann oftmals eine Volumenzunahme (quellen oder aufquellen) der Formulierung beobachtet werden. Dies beeinflusst in den meisten Fällen auch die resultierende Gelstärke, sodass die Unterschiede in den Messwerten auf die unterschiedliche Zeitspanne zwischen Herstellung und Messung der Gele zurückgeführt werden kann. Während der Formulierungsentwicklung wurden die Gele am Tag der Herstellung direkt vermessen. Die Startwerte der Stabilitätsstudie hingegen wurden nach einer dreitägigen Standzeit ermittelt. Nach einmonatiger Lagerung betrug die Gelstärke $543,33 \pm 52,44$ Pa (25 °C, 60 %rH), bzw. $976,34 \pm 116,4$ Pa (40 °C, 75 %rH). Da sich die Gelstärke der an Tag 1 untersuchten Proben kaum von den bei 25 °C, 60 %rH gelagerten unterscheidet, ist davon auszugehen, dass der Aufbau der Gelstruktur nach der initialen, dreitägigen Standzeit abgeschlossen war.

Die Differenz zwischen den bei 40 °C, 75 %rH und 25 °C, 60 %rH gelagerten Proben liefert ein Indiz für eine Temperaturabhängigkeit der Gelstärke. Dies wird im Unterkapitel „Temperatursweep“ noch einmal erörtert. Die visuelle Kontrolle der Proben zeigte über den gesamten Lagerungszeitraum unabhängig von den Lagerungsbedingungen keine Anzeichen einer Instabilität und alle Proben präsentierten sich als homogene Systeme. Auch die Proben von MBO 18 (1,0 Gew.-% Aerosil®, 3,0 Gew.-% Natriumalginat, 1,0 Gew.-% Dehydroxanthan) zeigten einen deutlichen Unterschied in der Gelstärke zwischen der Stabilitätsstudie und der Formulierungsentwicklung. Zu Beginn der Stabilitätsstudie konnte eine Gelstärke von $1084,12 \pm 65,88$ Pa ermittelt werden während die Gelstärke während der Formulierungsentwicklung lediglich $224,95 \pm 7,88$ Pa betrug. Dieser große Unterschied ist mutmaßlich erneut in der vergangenen Zeitspanne zwischen Herstellung und Messung (drei Tage bei den Stabilitätsuntersuchungen; ein Tag während der Formulierungsentwicklung) begründet. Nach einmonatiger Lagerung bei 25 °C, 60 %rH erhöhte sich die Gelstärke von MBO 18 auf $1303,55 \pm 170,19$ Pa. Die bei 40 °C, 75 %rH gelagerten Proben zeigten eine vollständige Phasenseparation (freie Flüssigkeit auf einem Gelkern) und konnten daher nicht rheologisch vermessen werden. Die Ursache der Instabilität der bei 40 °C, 75 %rH gelagerten Proben von MBO 18 liegt vermutlich im Vorhandensein des Gelbildners Dehydroxanthan begründet. García-Ochoa und Casas (García-Ochoa und Casas 1994) stellten in ihrer Studie einen Zusammenhang zwischen der Auflösungstemperatur und der entstehenden Gelstärke eines Xanthangels her. Bei Auflösungstemperaturen zwischen 20 °C und 40 °C konnten die Autoren eine zunehmend verminderte Gelstärke des entstehenden Gels beobachten. Im Gegensatz dazu stieg die Gelstärke zwischen 40 °C und 60 °C stark an. Zurückgeführt wurde dies auf eine Konformationsänderung des eingesetzten Xanthan. In einer weiteren Studie zeigten die Autoren die Wechselwirkungen von Xanthan und Johannisbrotgummi auf deren gelbildenden Eigenschaften und stellten erneut einen Bezug zur Auflösungstemperatur und Lagerungszeit her (Casas und García-Ochoa 1999).

Dabei wurde gezeigt, dass die Wechselwirkungen beider Polysaccharide maßgeblich von deren Konformation abhängig sind und sowohl Synergismen als auch Antagonismen beobachtet wurden. Auf die Beobachtungen in dieser Arbeit übertragen, wäre es somit denkbar, dass die Polysaccharidketten des Dehydroxanthan und des Natriumalginat unterstützt von Aerosil eine Gelstruktur ausgebildet haben. Bei Erreichen der Grenztemperatur von 40 °C könnte das Gelgerüst aufgrund des Abschwächens der Wechselwirkungen, ggf. verursacht durch eine Konformationsänderung von Xanthan, zusammengebrochen und somit das Gel irreversibel zerstört worden sein.

Nachgebegrenze

Die Nachgebegrenze (τ_V) beschreibt den Endpunkt des LVEB und charakterisiert somit den Grenzwert, ab dem es zur irreversiblen Zerstörung der Gelstruktur durch Scherung kommt. Für MBO 16 (1,0 Gew.-% Aerosil®, 3,75 Gew.-% Natriumalginat) betrug die Nachgebegrenze zu Beginn der Stabilitätsuntersuchungen $4,10 \pm 0,22$ Pa. Diese erhöhte sich bei einer Lagerung bei 40 °C, 75 %rH geringfügig auf $6,56 \pm 1,18$ Pa. Eine Lagerung bei 25 °C, 60 %rH hingegen hatte keinen Einfluss auf die Nachgebegrenze ($3,93 \pm 0,62$ Pa). Dies entspricht den Ergebnissen des Verlaufs der Gelstärke während der Lagerung. Die Proben von MBO 18 (1,0 Gew.-% Aerosil®, 3,0 Gew.-% Natriumalginat und 1,0 Gew.-% Dehydroxanthan) zeigten einen geringfügigen Anstieg der Nachgebegrenze nach einmonatiger Lagerung bei 25 °C, 60 %rH von ursprünglich $6,65 \pm 0,84$ Pa auf $7,66 \pm 1,05$ Pa. Auch dies entspricht den Ergebnissen des Verlaufs der Gelstärke und wird als unkritisch eingestuft. Trotz der galenischen Unterschiede können die Nachgebegrenzen handelsüblicher Cremes (50 bis 80 Pa) (Kwak et al. 2015) und Bodylotions (15 bis 35 Pa) (Yao und Patel 2001; Kwak et al. 2015) mit den Nachgebegrenzen der entwickelten MBO verglichen werden. Dies zeigt, dass beide MBO bereits bei einer relativ geringen mechanischen Belastung fließfähig werden und untermauert die organoleptisch getestete, gute Spreitbarkeit beider Formulierungen.

Fließgrenze

Die Fließgrenze (τ_f) kennzeichnet die Grenzdeformation ab der eine Messprobe vollständig fließt. Praktische Relevanz hat dies vor allem für industrielle Abfüllprozesse, da die Fließgrenze für das Pumpen einer Formulierung überschritten werden muss. Außerdem ist sie wichtig um im nachfolgenden Schritt das Spröbruchverhalten der Formulierungen beurteilen zu können. Rheologisch kann die Fließgrenze als Schnittpunkt von Speicher- und Verlustmodul (G' , bzw. G'') betrachtet werden. Die Fließgrenze beider MBO unterscheidet sich deutlich voneinander. Das MBO 16 weist zu Beginn eine Fließgrenze von $10,99 \pm 0,76$ Pa auf. Diese steigt im Verlauf der einmonatigen Lagerung auf $13,81 \pm 0,38$ Pa (25 °C, 60 %rH) bzw. $15,94 \pm 1,87$ Pa (40 °C, 75 %rH) an. Für MBO 18 konnte zu Beginn eine Fließgrenze von $19,81 \pm 2,38$ Pa, gefolgt von einem Anstieg selbiger auf $25,46 \pm 1,89$ Pa (25 °C, 60 %rH), gemessen werden. Diese Ergebnisse könnten, wie bereits bei der Gelstärke und der Nachgebegrenze erläutert, auf eine Veränderung der Gelgerüststärke zurückzuführen sein.

Fließübergangsindex

Der Quotient aus Fließgrenze und Nachgebegrenze wird Fließübergangsindex genannt und dient zur Beurteilung des Spröbruchrisikos (Mezger 2016). Je geringer der Unterschied beider Messwerte ist, desto dichter nähert sich der Quotient dem Wert 1 an. Bei Substanzen mit einem Fließübergangsindex von 1 besteht die Gefahr eines zu abrupten Fließens der Substanz (G'' dominiert sprunghaft über G'). Dies äußert sich in einem unangenehmen Hautgefühl beim Auftragen der Substanz und ggf. in einem Bröckeln der Formulierung. Zwar gibt die Literatur keinen Fixwert an, ab dem eine Substanz keinerlei Risiko für einen Spröbruch aufweist, jedoch stehen die berechneten Fließindizes (Werte zwischen 2,4 und 3,5) beider Formulierungen im Einklang mit den Ergebnissen der organoleptischen Prüfung. Bei selbiger wurden sowohl für MBO 16, als auch für MBO 18 zu Beginn der Lagerungsstabilität und nach einem Monat unabhängig von der Lagerungstemperatur (ausgenommen MBO 18, 40 °C, 75 %rH) eine sehr gute Spreitbarkeit und ein rückstandsloses Verreiben der Formulierungen auf der Haut festgestellt.

Frequenzsweep

Mit Hilfe des Frequenzsweeps lässt sich das Stabilitätsverhalten von Formulierungen bei Erschütterungen untersuchen. Der Bereich hoher Frequenzen ($> 10 \text{ rad/s}$) simuliert das Kurzzeitverhalten einer Probe, z.B. das Fallenlassen der Substanz. Frequenzen $< 10 \text{ rad/s}$ hingegen simulieren kleinere Erschütterungen, wie sie beispielsweise beim Transport, der Förderung durch Abfülleinrichtungen oder der Lagerung auftreten können. Demnach kann das Langzeitstabilitätsverhalten bei niedrigeren, das Kurzzeitstabilitätsverhalten bei hohen Frequenzen ermittelt werden. Die Verlaufskurven des Frequenzsweeps beider MBO an Tag 1 der Stabilitätsstudie sind in den nachfolgenden Abbildungen dargestellt (Abbildung 10, Abbildung 11), die Diagramme nach einmonatiger Lagerung befinden sich im Anhang V (Abbildung 62 bis Abbildung 66). Über den gesamten Frequenzbereich (0,1 bis 100 rad/s) dominierte in beiden Gelen elastisches Verhalten, dargestellt durch $G' > G''$ (Abbildung 10, Abbildung 11). Dies bedeutet, dass auch im Ruhezustand ein stabiles Gelnetzwerk ausgebildet ist. Auch in Bereichen hoher Frequenzen, welche kurzzeitige aber starke Erschütterungen simulieren, liegt ein elastisches Verhalten beider Gele vor. Während der Lagerung kommt es zu keiner wesentlichen Veränderung des Kurvenverlaufs der Frequenzsweeps beider Gele, sodass unabhängig von der Lagerungstemperatur sowohl eine Stabilität gegen Transporterschütterung als auch gegen ein Fallenlassen gegeben ist.

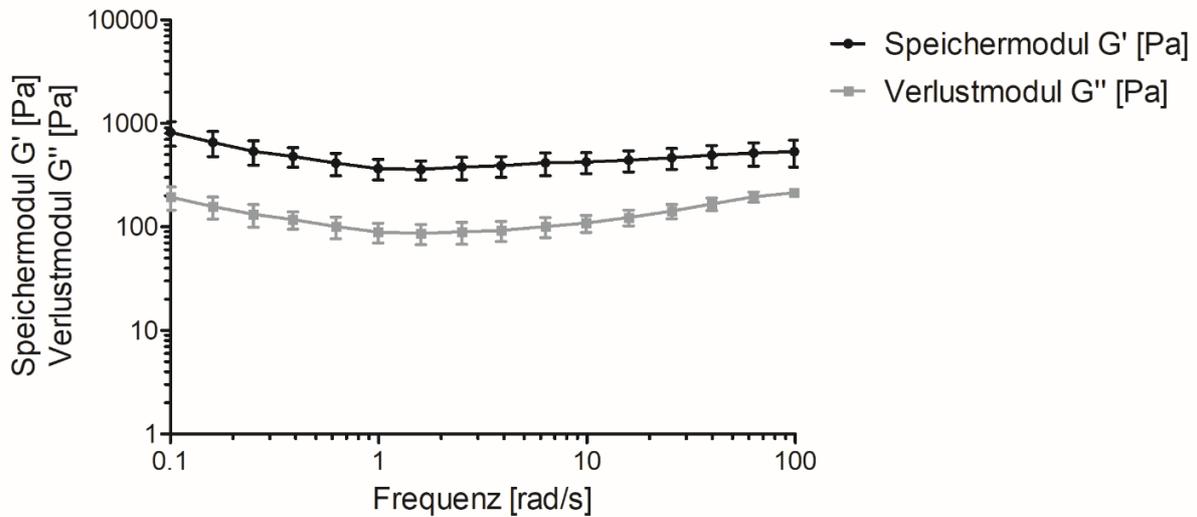


Abbildung 10: Frequenzsweep des Mikroemulsions-basierten Organogels (MBO) 16 an Tag 1 der Lagerungsstabilität, 72 Stunden nach Herstellung, Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa ($MW \pm SD$; $n = 3$), MBO 16 = 1,0 Gew.-% Aerosil®, 3,75 Gew.-% Natriumalginat, Scherdeformation = 0,25 %, Messtemperatur = 25 °C, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt = 500 μm

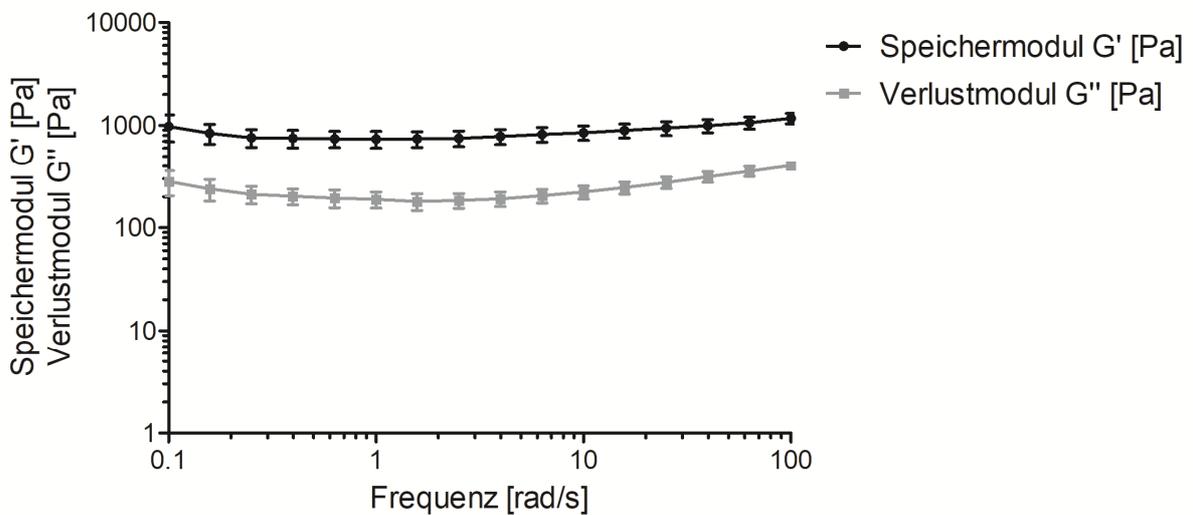


Abbildung 11: Frequenzsweep des Mikroemulsions-basierten Organogels (MBO) 18 an Tag 1 der Lagerungsstabilität, 72 Stunden nach Herstellung, Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa ($MW \pm SD$; $n = 3$), MBO 18 = 1,0 Gew.-% Alginat®, 3,0 Gew.-% Natriumalginat, 1,0 Gew.-% Dehydroxanthan, Scherdeformation = 0,25 %, Messtemperatur = 25 °C, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt = 500 μm

Resistenz gegen Synärese

Manche Gele und gelartige Rohstoffe, wie z.B. Vaseline, die zwar ein dominierendes elastisches Verhalten aufweisen, neigen trotzdem teilweise zu dem Phänomen der Synärese. Als Synärese bezeichnet man das „Herausdrücken“ von Flüssigkeit aus einem Gelnetzwerk. Ursächlich dafür sind zu starre Gelgerüste, die mit der Zeit unter ihrem Eigengewicht „zusammengepresst“ werden und dadurch das Freiwerden von Flüssigkeit verursachen. Der Verlustfaktor ($\tan \delta$) ist der Quotient aus Verlustmodul und Speichermodul und kann im niedrigen Frequenzbereich ($< 10 \text{ rad/s}$) als Parameter für die Beurteilung der Synäreseresistenz einer Messprobe verwendet werden. Für MBO 16 betrug der Verlustfaktor zu Beginn der Untersuchungen $0,24 \pm 0,01$. Nach einmonatiger Lagerung konnten Werte von $0,26 \pm 0,01$ ($25 \text{ }^\circ\text{C}$, 60 \%rH), bzw $0,25 \pm 0,01$ ($40 \text{ }^\circ\text{C}$, 75 \%rH) berechnet werden (Tabelle 18). Die Literatur empfiehlt für eine Resistenz gegen Synärese einen $\tan \delta$ zwischen 0,2 und 0,3 (Mezger 2016), sodass MBO 16 unabhängig von Lagerungszeit und –temperatur als resistent gegenüber Synärese angesehen werden kann. Auch MBO 18 weist einen sehr guten Verlustfaktor von $0,26 \pm 0,01$ (Tag 1) und $0,28 \pm 0,02$ (1 Monat, $25 \text{ }^\circ\text{C}$, 60 \%rH) auf und kann daher als unempfindlich gegen Synärese bei den genannten Lagerungsbedingungen angesehen werden. Da die bei $40 \text{ }^\circ\text{C}$, 75 \%rH gelagerte Probe instabil war (freie Flüssigkeit auf dem Gel) wurde auf eine rheologische Untersuchung verzichtet. Zusammenfassend besitzt MBO 16 ein Gelgerüst das unempfindlich gegenüber leichten und schweren Erschütterungen ist. Darüber hinaus ist von einem sehr geringen Synäreserisiko auszugehen (Verlustfaktor zwischen 0,2 und 0,3). MBO 18 zeigte sich im untersuchten Frequenzsweep ebenfalls unempfindlich gegenüber leichten und schweren Erschütterungen, jedoch war die bei $40 \text{ }^\circ\text{C}$, 75 \%rH gelagerte Probe instabil. Demzufolge ist die Langzeitstabilität von MBO 18 auch bei einer Lagerungstemperatur von $25 \text{ }^\circ\text{C}$, $60\% \text{ rH}$ kritisch zu hinterfragen.

Tabelle 18: Darstellung des Verlustfaktor $\tan \delta$ von MBO 16 und 18 über einen Lagerungszeitraum von einem Monat bei verschiedenen Lagerungsbedingungen, Mittelwert aus Frequenzbereich $< 10 \text{ rad/s} \pm$ Standardabweichung ($n = 3$)

Zeitpunkt	$\tan \delta$	
	MBO 16	MBO 18
Tag 1	0,24 \pm 0,01	0,26 \pm 0,01
Monat 1, 25 °C, 60% rH	0,26 \pm 0,01	0,28 \pm 0,02
Monat 1, 40 °C, 75% rH	0,25 \pm 0,01	Nicht bestimmbar

Temperatursweep

Der Temperatursweep dient der Untersuchung des temperaturabhängigen, rheologischen Verhaltens einer Messprobe. Dazu werden die dynamisch-mechanischen Scherbedingungen in Form der Kreisfrequenz und der Scherdeformation konstant gehalten, die Messtemperatur hingegen variiert. Man nennt dies auch dynamisch-mechanische thermische Analyse (DMTA). Die Verlaufskurven beider MBO an Tag 1 der Stabilitätsstudie sind in den nachfolgenden Abbildungen dargestellt (Abbildung 12, Abbildung 13), die Diagramme nach einmonatiger Lagerung befinden sich im Anhang V (Abbildung 67 bis Abbildung 71).

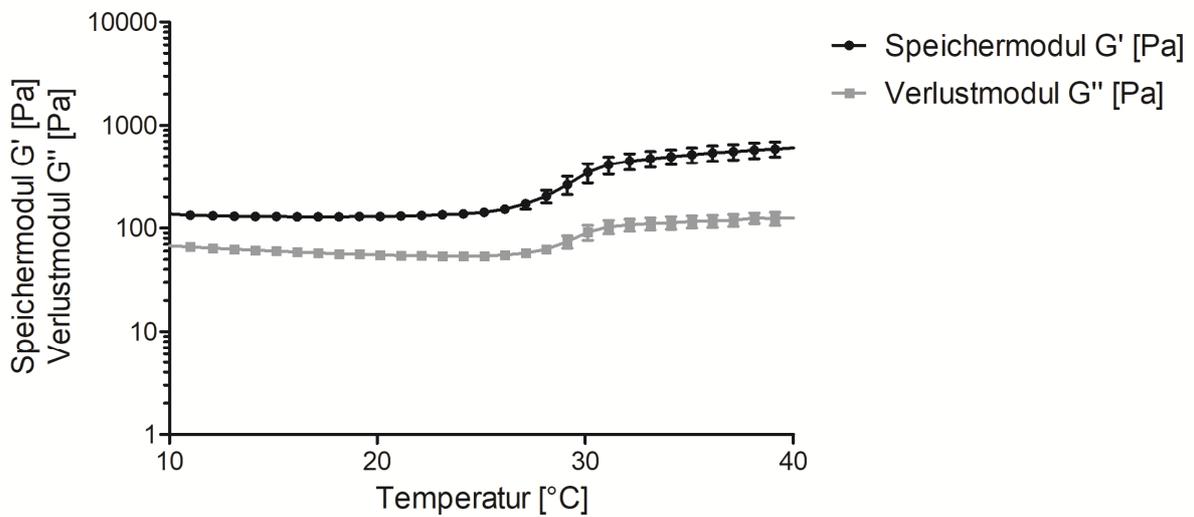


Abbildung 12: Temperatursweep des Mikroemulsions-basierten Organogels (MBO) 16 an Tag 1 der Lagerungsstabilität, 72 Stunden nach Herstellung, Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (MW \pm SD; n = 3), MBO 16 = 1,0 Gew.-% Aerosil®, 3,75 Gew.-% Natriumalginat, Scherdeformation = 0,25 %, Kreisfrequenz = 10 rad/s, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt = 500 μ m

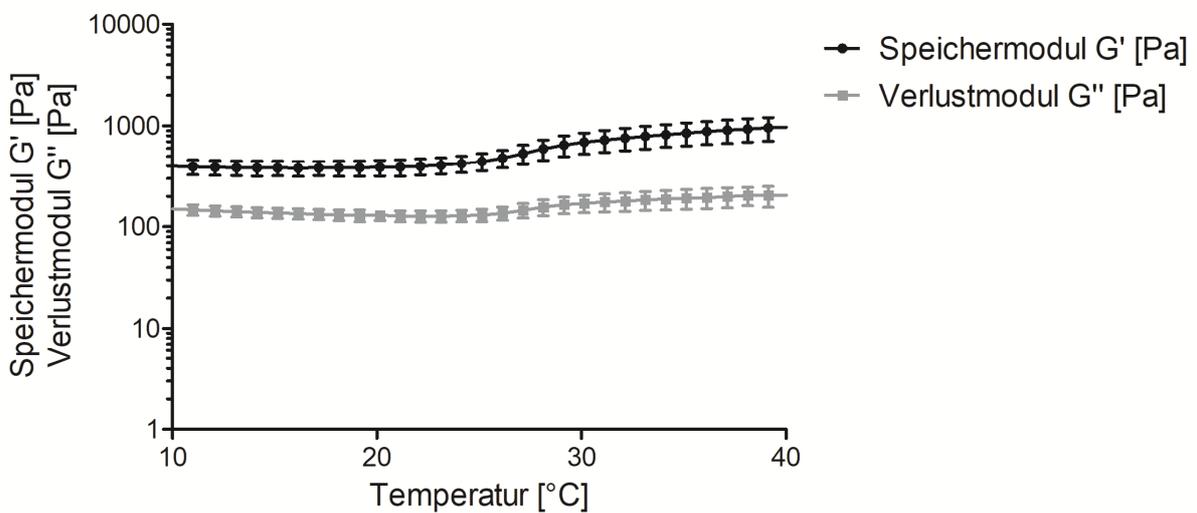


Abbildung 13: Temperatursweep des Mikroemulsions-basierten Organogels (MBO) 18 an Tag 1 der Lagerungsstabilität, 72 Stunden nach Herstellung, Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (MW \pm SD; n = 3), MBO 18 = 1,0 Gew.-% Alginat®, 3,0 Gew.-% Natriumalginat, 1,0 Gew.-% Dehydroxanthan, Scherdeformation = 0,25 %, Kreisfrequenz = 10 rad/s, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt = 500 μ m

Die Rheogramme beider MBO zeigen sowohl zu Beginn der Untersuchungen als auch nach einmonatiger Lagerung ein Dominieren von G' über G'' . Leichte Veränderungen der Verlaufskurven für Speicher- und Verlustmodul deuten jedoch auf eine Veränderung der Gelstruktur hin. Bei MBO 16 ist vor allem an Tag 1 ein starker Anstieg von G' und G'' ab ca. 28 °C festzustellen. Dieser Anstieg tritt auch nach einmonatiger Lagerung auf, jedoch lediglich in abgeschwächter Form. Für die Messproben, die bei 40 °C, 75 %rH gelagert wurden, ist der beobachtete Effekt am geringsten ausgeprägt. Auffällig ist, dass sich der Anstieg von G' und G'' einem Plateauwert annähert, der vor allem bei höheren Temperaturen (> 30 °C) auftritt. Der gleiche Effekt, wenn auch in deutlich abgeschwächter Form, wurde ebenfalls bei MBO 18 beobachtet. Auch MBO 18 zeigte zu Beginn der Lagerungsstabilitätsuntersuchung ab ca. 25 °C einen Anstieg im Speicher- und Verlustmodul. Dieser kann nach einmonatiger Lagerung bei 25 °C, 60 %rH nicht mehr beobachtet werden, dafür jedoch ein plateautiger Verlauf für G' und G'' . Diese Ergebnisse korrelieren mit den Ergebnissen der Gelstärke bei 25 °C Messtemperatur aus dem Amplitudensweep (Tabelle 17). Die Ursache für dieses Phänomen liegt mutmaßlich erneut im komplexen Zusammenspiel der Gelbildner begründet. Aufgrund der sehr ähnlichen Zusammensetzung beider MBO, kommt es vermutlich zu einem durch Aerosil und/oder durch Alginat bedingten, nachträglichen Aushärten der jeweiligen Gelstruktur. Für die geplante Applikation hat dies keinen negativen Einfluss und wird daher als unkritisch bewertet.

Gelstärke bei Hauttemperatur

Für eine dermale Anwendung ist die Gelstärke im Bereich der Körperoberflächentemperatur (32 °C bis 34 °C) relevant. Ist die Gelstärke der Formulierung in diesem Temperaturbereich zu gering, besteht die Gefahr des Wegfließens vom Applikationsort. Die Interpretation der Gelstärke bei Hauttemperatur ist im vorliegenden Fall jedoch schwierig, da der Wert des Speichermoduls im Bereich von 32 °C bis 34 °C leicht ansteigt. Aus diesem Grund wurden die Messwerte des Speichermoduls als Maß der Gelstärke in diesem Temperaturbereich gemittelt. Während MBO 16 zu Beginn eine mittlere Gelstärke von $473,06 \pm 67,05$ Pa aufwies, erhöhte sich diese nach einmonatiger Lagerung bei 25 °C, 60 %rH auf $564,24 \pm 38,73$ Pa. Eine Lagerung bei 40 °C, 75 %rH erhöhte die mittlere Gelstärke bei Hauttemperatur auf $887,04 \pm 77,04$ Pa. Obwohl für die in MBO 16 eingesetzten Gelbildner keine Thermosensitivität bekannt ist, stehen diese Ergebnisse im Einklang mit dem beobachteten Anstieg der Gelstärke im Amplitudensweep nach einmonatiger Lagerung. Es ist daher von einem zeit- und temperaturabhängigen Gelaufbau von MBO 16 auszugehen. Die Gelstärke von MBO 18 bei Hauttemperatur wurde ebenfalls im Bereich von 32 °C und 34 °C gemittelt. Zu Beginn der Untersuchungen wurde eine Gelstärke von $790 \pm 162,01$ Pa ermittelt. Nach einmonatiger Lagerung bei 25 °C, 60 %rH betrug die Gelstärke noch $742,48 \pm 78,27$ Pa. Dieser geringe Unterschied liegt im Bereich der gemessenen Standardabweichung und wird daher als unkritisch bewertet.

Tabelle 19: Gelstärke der MBO 16 und 18 (32 °C bis 34 °C); Gelstärke als G' (MW \pm SD; n = 3)

Zeitpunkt	Gelstärke [Pa]	
	MBO 16	MBO 18
Tag 1	$473,06 \pm 67,05$	$790,72 \pm 162,01$
Monat 1, 25 °C, 60% rH	$564,24 \pm 38,73$	$742,48 \pm 78,27$
Monat 1, 40 °C, 75% rH	$887,04 \pm 77,04$	Nicht bestimmbar

3.1.2.3 *Mikroskopische Untersuchung der Mikroemulsion-basierten Organogelee*

Um einen Einblick in die Struktur der MBO 16 und 18 zu erhalten, wurden zu Beginn der Stabilitätsstudie und nach einmonatiger Lagerung lichtmikroskopische Aufnahmen der Gele angefertigt (Abbildung 14 und Abbildung 15). Auf allen Aufnahmen ist kein eindeutiger struktureller Aufbau der Gele zu erkennen. Gemeinsam mit dem bei der Herstellung der Gele beobachteten Eintrübungseffekt nach dem Einarbeiten der Gelbildner in die Mikroemulsionsmatrix bestätigt dies die Annahme, dass die Mikrostruktur der Mikroemulsion durch den Gelbildner zerstört wurde. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen einer Studie von Hajjar et al. (Hajjar et al. 2018), die mit Hilfe von Transmissionselektronenmikroskopie zeigten, dass die Struktur der verwendeten Mikroemulsion nicht erhalten bleibt, wenn diese in ein bereits bestehendes Gel eingearbeitet wird. Chen et al. (Chen et al. 2006) verwendeten ebenfalls Xanthane als Gelbildner und arbeiteten diese ebenfalls in eine bereits bestehende Mikroemulsion ein. Die Autoren beschreiben zwar das Ausbilden optisch klarer Gele, lieferten dazu aber keine bildgebenden Untersuchungen. In Studien von Atkinson et al. (Atkinson et al. 1989; Atkinson et al. 1991), die sich mit der Struktur Mikroemulsions-basierter Organogelegele auf Gelatinebasis befassten, wurden Belege für das Vorhandensein einer dreidimensionalen Gelatine-Wasser-Gelstruktur gefunden. Die Autoren beschreiben von einem Surfactantfilm stabilisierte Mikroemulsionströpfchen, die in einem dreidimensionalen Gelgerüst eingeschlossen sind. Dies entspricht einer flüssigen Phase innerhalb eines festen Netzwerkes. Denkbar wäre auch eine ähnliche Struktur für die in dieser Arbeit entwickelten MBO. Ein direkter Vergleich mit den Ergebnissen von Atkinson et al. ist jedoch nur bedingt möglich, da sich die physikochemischen Eigenschaften der in dieser Arbeit verwendeten Gelbildner und der Mikroemulsion stark von den in der Arbeit von Atkinson et al. verwendeten Rohstoffen unterscheiden.

Aufgrund der in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse und dem zum Zeitpunkt der Entstehung dieser Arbeit nicht verfügbaren, systematischen Untersuchung zum Einfluss verschiedener Gelbildner auf die Struktur eines MBO in der Literatur, ist die galenische Klasse der „Mikroemulsionsgele“ kritisch zu betrachten. Da unabhängig von dieser Argumentation viele Studien trotzdem die stark penetrationsfördernden Eigenschaften der MBO im Vergleich zu herkömmlichen dermalen Applikationsformen beschreiben (Fouad et al. 2013; Mehta 2018; Chen et al. 2006; Hajjar et al. 2018), wurde MBO 16 in weiterführenden Penetrationsuntersuchungen getestet (siehe 3.1.5 „Zwischenfazit: Formulierungsentwicklung und -charakterisierung“ und Kapitel 3.2 „Konfokalmikroskopische Penetrationsuntersuchungen“).

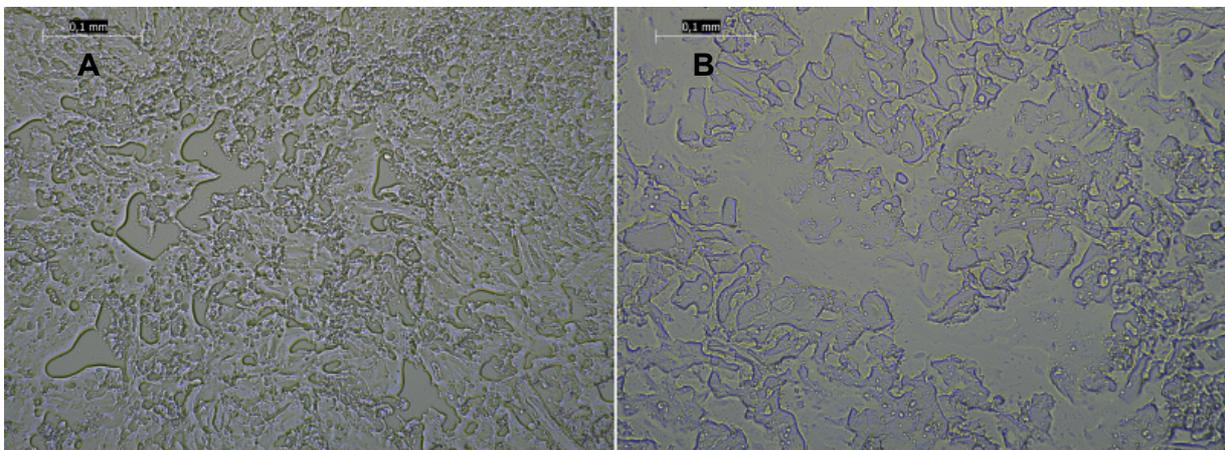


Abbildung 14: Durchlichtmikroskopische Aufnahme (10x Objektiv) von MBO 16 am Tag der Herstellung (A) und nach einmonatiger Lagerung bei 25 °C, 60 %rH (B)

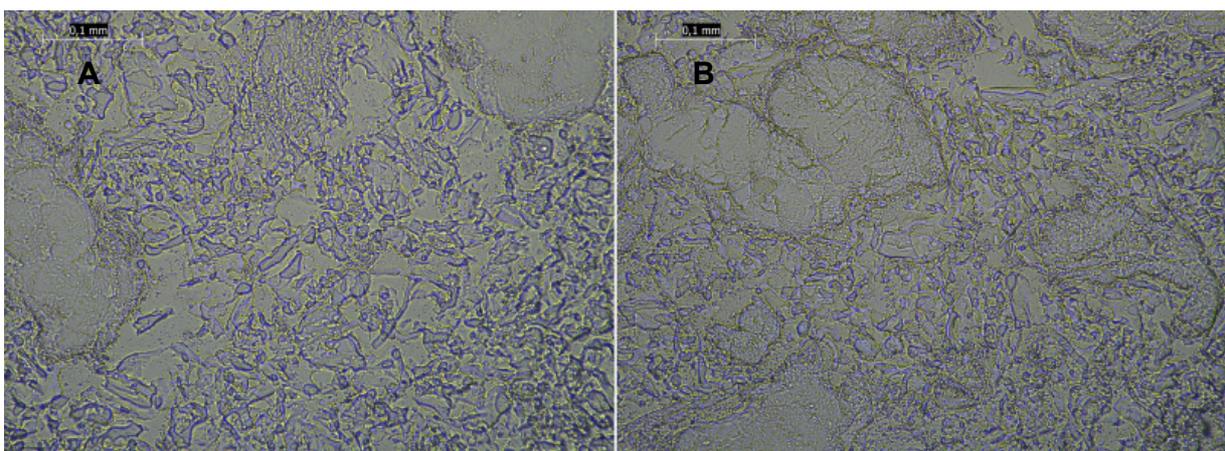


Abbildung 15: Durchlichtmikroskopische Aufnahme (10x Objektiv) von MBO 18 am Tag der Herstellung (A) und nach einmonatiger Lagerung bei 25 °C, 60 %rH (B)

3.1.3 Entwicklung und Charakterisierung von Hydrogelen

Als Basis der Entwicklung eines für den geplanten Applikationszweck geeigneten Hydrogels diente die Wasserphase der Mikroemulsion. In einem zeiteffizienten Screeningverfahren wurden zunächst verschiedene Gelbildner(-kombinationen) getestet und die Gelstärke potentiell geeigneter Mischungen rheologisch bestimmt. Anschließend wurden die physikochemischen Eigenschaften der geeignetsten Formulierungen analog zu der Entwicklung der MBO in einer Kurzzeit-Stabilitätsstudie rheologisch untersucht.

3.1.3.1 *Entwicklung von Hydrogelen auf Poloxamerbasis*

Poloxamergele sind als geeignete Drug-Delivery-Systeme für die Applikation von Proteinen bereits bekannt (Eisenhardt et al. 2015; Barichello et al. 1999). Um ein thermosensitives Hydrogel auf Poloxamerbasis zur Applikation von Api m 1 zu entwickeln, wurden Formulierungen mit variierenden Konzentrationen an Poloxamer 407 (P407) und Poloxamer 188 (P188) hergestellt und deren Gelstärke bei Hauttemperatur und Sol-Gel-Übergangstemperatur (T_{SG}) mit Hilfe von Amplituden- und Temperatursweeps bestimmt (Tabelle 20). Zur Evaluierung einer geeigneten Herstellungsmethode wurden aufbauend auf vorherigen Studien (Eisenhardt et al. 2015; Wei et al. 2002; Xuan et al. 2010), drei Formulierungen mit 16,0 Gew.-% Poloxamer 407 nach der „cold-method“ (Schmolka 1972) hergestellt (Po 1 bis Po 3). Bei allen drei Formulierungsansätzen kam es zunächst zur Klumpenbildung, die bei Po 1 (Herstellungsmethode 1) und Po 2 (Herstellungsmethode 2) jedoch deutlich stärker ausgeprägt waren als bei Po 3 (Herstellungsmethode 3). Nach 24-stündiger Kühschranklagerung (5 °C) stellte sich Po 3 als homogenes, niederviskoses Gel dar. Die Formulierungen Po 1 und Po 2 zeigten nach wie vor Bereiche mit nicht gelöstem Gelbildner (Klumpenbildung). Vermutlich waren Temperaturunterschiede, bedingt durch die unterschiedlichen Herstellungsmethoden, die Ursache für dieses Phänomen. Erklärt werden kann dies anhand des allgemeinen Gelbildungsmechanismus von Poloxameren. Dieser basiert nach Dumortier et al. (Dumortier et al. 2006) und Escobar-Chávez et al. (Escobar-Chávez et al. 2006) auf einer steigenden Desolvatisierung des Poloxamerpolymers und dem Abschwächen von Wasserstoffbrückenbindungen.

Bei niedrigen Temperaturen wird Poloxamer 407 von einer Hydrathülle umgeben, die auf Wasserstoffbrückenbindungen zwischen hydrophilen Polyethylenoxid (PEO)-Ketten und dem Umgebungsmedium beruht. Die hydrophoben Polypropylenoxid (PPO)-Ketten des Poloxamergerüsts sind in diesem Zustand nur schlecht solvatisiert, es überwiegt jedoch der stabilisierende Einfluss der PEO-Einheiten. Mit steigender Temperatur wird diese Stabilisierung durch aufbrechende Wasserstoffbrückenbindungen abgeschwächt und es kommt zur vollständigen Dehydratisierung der PPO-Einheiten. Dies erhöht wiederum die Anzahl hydrophober Wechselwirkungen zwischen den dehydratisierten PPO-Einheiten untereinander, sodass es schließlich zur Mizellbildung mit einem hydrophoben Kern aus PPO-Einheiten, umringt von hydrophilen PEO-Molekülen, kommt. Bei weiterer Temperaturerhöhung bilden die einzelnen Mizellen übergeordnete, kubische Strukturen aus. Den Abschluss des Gelbildungsprozesses stellt der Übergang der kubischen Strukturen in ein hexagonales Gitter dar (Dumortier et al. 2006; Escobar-Chávez et al. 2006). Vermutlich haben im Fall von Po 1 und Po 2 einige Poloxamer-moleküle bereits während des Hinzufügens zur vorgekühlten Wasserphase mit dem Ausbilden einer Gelstruktur begonnen und damit noch nicht ausreichend hydratisierte Poloxamer-Feststoffmoleküle eingeschlossen (Klumpenbildung). Die auf dem Eisbad vorherrschende niedrige Temperatur während des Herstellungsprozesses, ermöglichte den Poloxamer-molekülen in Po 3 eine nahezu vollständige Solvatisierung. Ein weiterer Beleg dieser These liefert die sehr niedrige Gelierungstemperatur von Po 3, welche bei 15,0 °C liegt (Tabelle 20). Das bedeutet, dass das Gel bereits bei dieser niedrigen Temperatur mit dem Ausbilden einer Gelstruktur beginnt und somit bereits geringe Temperaturerhöhungen bei der Herstellung zu Komplikationen führen können. Die Gelstärke der Formulierung bei 32 °C beträgt 8274,00 Pa und wird später im Kontext mit den übrigen Gelstärken diskutiert. Alle weiteren Poloxamerformulierungen wurden daher nach Herstellungsmethode 3 hergestellt. Da Poloxamer 188 die Gelierungstemperatur und die Gelstärke von Hydrogelen auf Poloxamer 407-Basis beeinflussen kann (Wei et al. 2002; Xuan et al. 2010), wurden Formulierungen bestehend aus 16 Gew.-% Poloxamer P407 und 15, 10 und 5 Gew.-% Poloxamer P188 hergestellt und untersucht (Po 4 bis Po 6). Darüber hinaus wurde eine Formulierung aus 18 Gew.-% Poloxamer 407 und 15 Gew.-% Poloxamer 188 hergestellt (Po 7), um auch den Einfluss von Poloxamer 407 auf die Gelstärke zu untersuchen.

Die Formulierungsansätze Po 4 bis Po 7 stellten sich nach 24-stündiger Kühschranklagerung (5 °C) als homogene, niederviskose Gele dar. Der Zusatz von 15 Gew.-% Poloxamer P188 zu dem 16 Gew.-%igen Poloxamer 407 Hydrogel (Po 4) führte zu einem Anstieg der Gelierungstemperatur von 15 °C (Po 3) auf 22,0 °C. Das Hinzufügen von 10 Gew.-% P188 (Po 5), bzw. 5 Gew.-% (Po 6) erhöhte die T_{SG} auf 20,5 °C, bzw. 21,5 °C (Tabelle 20). Die Gelstärke bei 32 °C betrug 3298,80 Pa (Po 4), 2229,44 Pa (Po 5) und 1341,03 Pa (Po 6). Die erhaltenen Ergebnisse stehen teilweise im Widerspruch zu den Publikationen von Eisenhardt et al. (Eisenhardt et al. 2015) und Wei et al. (Wei et al. 2002). Wei et al. beobachteten einen invers-parabolen Einfluss von Poloxamer 188 auf die Gelierungstemperatur eines Poloxamer 407-Hydrogels. Konkret bedeutet dies, dass Konzentrationen bis zu 10 Gew.-% P188 die Gelierungstemperatur erhöhten, eine weitere Erhöhung der P188-Konzentration hingegen zum Absinken der T_{SG} führte. Eisenhardt et al. beobachteten das gleiche Phänomen, jedoch lag hier die Grenze bereits bei 5 Gew.-%. In dieser Arbeit wurde ein Anstieg der T_{SG} nach dem Einarbeiten von 5 Gew.-% P188, gefolgt von einer Erniedrigung dieser bei 10 Gew.-% P188 festgestellt. Eine weitere Erhöhung auf 15 Gew.-% führte erneut zu einem Anstieg der T_{SG} . Neben dem Verhältnis von P407 und P188 nehmen weitere Faktoren einen entscheidenden Einfluss auf die Gelierungstemperatur und Gelstärke eines Poloxamer-basierten Hydrogels, wie beispielsweise der Zusatz von Salzen, Konservierungsmitteln und Lösungsvermittlern (Dumortier et al. 2006). Die Ursache des Einflusses dieser und weiterer Additive kann generell auf eine Modifikation des Hydrierungsgrades bzw. Dehydrierungsgrades der hydrophoben PPO-Einheiten und somit auf die Mizellenbildung zurückgeführt werden (Dumortier et al. 1991; Chang et al. 2002; Shawesh et al. 2002). Die Unterschiede zwischen der Gelierungstemperatur der Studien von Wei et al. (Wei et al. 2002), Eisenhardt et al. (Eisenhardt et al. 2015) und den Ergebnissen dieser Arbeit können mit der Zusammensetzung der jeweils verwendeten Wasserphase erklärt werden. Sowohl in der Arbeit von Wei et al. (Wei et al. 2002) als auch in der vorliegenden Arbeit wurde PBS verwendet, wohingegen Eisenhardt et al. (Eisenhardt et al. 2015) gereinigtes Wasser nutzten. In vergangenen Studien konnte gezeigt werden, dass Salze (z.B. NaCl und Phosphatsalze) die Gelstärke von Poloxamerformulierungen erhöhen können (Choi et al. 1999; Yong et al. 2001).

Glykole hingegen sind in der Lage die Gelstärke von Poloxamerformulierungen zu erniedrigen (Choi et al. 1999). Man kann daher schlussfolgern, dass das in dieser Arbeit verwendete Butylenglykol ebenfalls einen Einfluss auf den Dehydrierungsgrad der PPO-Einheiten des Poloxamergerüsts ausübt und die Gelstärke und die T_{SG} moduliert. Darüber hinaus konnte ein Absinken der Gelierungstemperatur bei steigender P407-Konzentration festgestellt werden. Die Gelierungstemperatur von Po 7 (18,0 Gew.-% P407 und 15,0 Gew.-% P188) betrug 18,5 °C und war somit geringer als bei Po 4 (16 Gew.-% P407 und 15 Gew.-% P188; 22 °C). Dies steht im Einklang mit den Beobachtungen von Eisenhardt et al. (Eisenhardt et al. 2015), welche ebenfalls eine absinkende T_{SG} mit ansteigender P407-Konzentration beobachteten. Ein direkter Vergleich der Gelstärken beider Formulierungen zeigt, dass die Erhöhung des Poloxamer 407-Anteils um lediglich 2,0 Gew.-% zu einem deutlichen Anstieg der Gelstärke des Hydrogels führt (7380,75 Pa für Po 7 und 3298,80 für Po 4). Dies untermauert die Ergebnisse der T_{SG} -Bestimmung und stimmt mit vorherigen Studien überein (Wei et al. 2002; Dumortier et al. 1991).

Tabelle 20: Übersicht über die Gelierungstemperatur der Poloxamergele und der Gelstärke bei Hauttemperatur (32 °C), Gelstärke = Mittelwert des Speichermoduls G' im linear-viskoelastischen Bereich (LVEB) [Pa](Einfachbestimmung) (Ausnahme Po 5; dort wurde der Mittelwert der 3 Messwerte vor dem Erreichen der Nachgebegrenze Maß der Gelstärke verwendet), nicht bestimmbar = n.b.

Gel	Anteil Gelbildner [Gew.-%]		TSG [°C]	Gelstärke LVEB bei Hauttemperatur [Pa]
	Poloxamer P407	Poloxamer P188		
Po 1	16,0	---	n.b.	n.b.
Po 2	16,0	---	n.b.	n.b.
Po 3	16,0	---	15,0	8274,26 ± 334,51
Po 4	16,0	15,0	22,0	3269,93 ± 21,75
Po 5	16,0	10,0	20,5	2229,44 ± 72,10
Po 6	16,0	5,0	21,5	1341,03 ± 98,26
Po 7	18,0	15,0	18,5	7380,75 ± 450,99

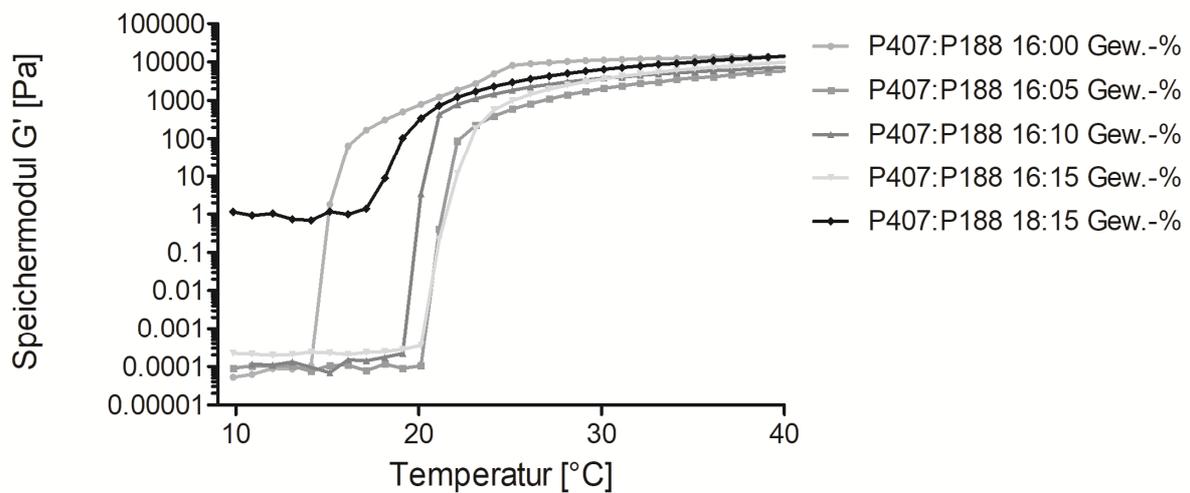


Abbildung 16: Graphische Darstellung des Verlaufs des Speichermoduls G' bei Temperaturerhöhung, Scherdeformation = 0,5 %, Kreisfrequenz = 10 rad/s, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt = 500 µm

3.1.3.2 Entwicklung von Hyaluronsäuregelen

Hyaluronsäure (HA) ist ein vielseitiges Biopolymer das in der Kosmetik, der pharmazeutischen Industrie und der Medizintechnik Anwendung findet. Je nach Molekulargewicht verändern sich die physikochemischen Eigenschaften von HA (Brown und Jones 2005). Mit zunehmendem Molekulargewicht erhöht sie die Viskosität einer Formulierung und ändert deren rheologische Charakteristik von newton'schem zu nicht-newton'schem Verhalten (Gribbon et al. 2000; Gibbs et al. 1968; Fujii et al. 1996; Kobayashi et al. 1994; Karim et al. 1996). Niedermolekulare HA wirkt darüber hinaus penetrationsfördernd (Sandri et al. 2004). HA kann ein epidermales Wirkstoffdepot bilden und verhindert so das Eindringen von Wirkstoff in zu tiefe Hautschichten (Brown und Jones 2005). Aus diesen Gründen wurde der Einfluss vier verschiedener Hyaluronsäuren mit unterschiedlichem Molekulargewicht auf die Fähigkeit zur Ausbildung eines stabilen Hydrogels untersucht (Tabelle 21).

Tabelle 21: Einteilung der Hyaluronsäurearten nach Molekulargewicht und Eigenschaften (basierend auf Herstellerangaben)

Bezeichnung	Molekulargewicht [MDa]	Eigenschaften
High Molecular Weight Hyaluronic Acid (HMW-HA)	≥ 1,5	Gelbildner
Standard Molecular Weight Hyaluronic Acid (SMW-HA)	1,3-1,8	Gelbildner und sehr geringe Penetrationsförderung
Low Molecular Weight Hyaluronic Acid (LMW-HA)	0,2-1,3	Penetrationsförderung (MW < 1 MDa)
Very Low Molecular Weight Hyaluronic Acid (VLMW-HA)	< 0,2	starke Penetrationsförderung

Zur Evaluierung einer geeigneten Herstellungsmethode wurden Formulierungen aus 1,0 Gew.-% VLMW-HA und 1,0 Gew.-% HMW-HA, hergestellt (siehe Tabelle 22, Hy 1 und Hy 2). Die Herstellung von Hyaluronsäuregel 1 (Hy 1) erfolgte anhand der in Kapitel 2.2.1.7 „Herstellung der Hyaluronsäuregele“ beschriebenen Herstellungsmethode 1. Herstellungsmethode 2 wurde zur Herstellung von Hyaluronsäuregel 2 (Hy 2) angewendet. Hyaluronsäuregel 1 präsentierte sich nach 24-stündiger Lagerung bei 5 °C als inhomogene Mischung mit gelierten und flüssigen Bereichen. Eine mögliche Begründung dafür ist, dass die HA-Moleküle, die durch den Kontakt zur Wasserphase zuerst in Lösung gingen, bereits mit dem Ausbilden einer Gelstruktur begonnen hatten und dadurch die noch nicht gelösten HA-Moleküle umschlossen. Dies verhindert den Aufbau einer gleichmäßigen Gelstruktur. Ähnliches wurde auch bei der Herstellung der Poloxamergele (Po 1 und Po 2) beobachtet und wurde dort ebenfalls auf einen ungleichmäßigen Gelierungsvorgang zurückgeführt. Hyaluronsäuregel 2 hingegen stellte sich als homogenes, klares und niederviskoses Gel dar (ebenfalls nach 24 Stunden Lagerung bei 5 °C). Es wird angenommen, dass durch das Anreiben der HA diese sehr viel feiner verteilt vorlag und somit alle Moleküle homogen hydratisiert werden konnten. Alle nachfolgenden Hyaluronsäuregele wurden daher nach Herstellungsmethode 2 hergestellt (Tabelle 22, Rheogramme im Anhang VII: Abbildung 82 bis Abbildung 87).

Tabelle 22: Übersicht über die hergestellten Hyaluronsäureformulierungen und deren Gelstärke bei Hauttemperatur (32 °C), Gelstärke = Mittelwert des Speichermodul G' im LVEB [Pa], nicht bestimmbar = n.b.

Gel	Anteil Hyaluronsäure [Gew.-%]				Gelstärke [Pa]
	VLMW	LMW	SMW	HMW	
Hy 1	1,00	---	---	1,00	n.b.
Hy 2	1,00	---	---	1,00	47,95 ± 1,36
Hy 3	1,00	---	1,00	---	44,79 ± 0,98
Hy 4	1,00	---	1,00	1,00	350,15 ± 10,01
Hy 5	2,00	---	---	---	n.b.
Hy 6	---	2,00	---	---	n.b.
Hy 7	---	1,00	---	1,00	76,94 ± 2,80
Hy 8	---	1,00	1,00	---	n.b.
Hy 9	---	---	---	1,00	48,99 ± 1,75
Hy 10	---	---	2,00	---	297,81 ± 7,62

Ein Vergleich der Gelstärke von Hy 2 ($47,95 \pm 1,36$ Pa) mit Hy 9 ($48,99 \pm 1,75$ Pa) zeigt, dass 1,0 Gew.-% VLMW-HA keinen Einfluss auf die Gelstärke der Formulierung hatte. LMW-HA hingegen erhöhte die Gelstärke der Formulierung (Hy 7) deutlich auf $76,94 \pm 2,80$ Pa. Ähnliche Effekte wurden auch bei der Formulierungsentwicklung der mit Hyaluronsäure ergänzten Poloxamergele erhalten (3.1.3.3 „Einfluss von Hyaluronsäure auf die Gelstärke und die Gelierungstemperatur von Poloxamergelen“). Formulierungen die lediglich VLMW-HA (Hy5) oder LMW-HA (Hy 6) beinhalteten, waren zu niederviskos für das in dieser Arbeit verfolgte Anwendungsziel, sodass auf eine rheologische Charakterisierung der Formulierungen verzichtet wurde. Die Kombination von 1,0 Gew.-% LMW-HA und 1,0 Gew.-% SMW-HA (Hy 8) lieferte eine homogene Formulierung, deren viskoser Anteil jedoch überwiegt und daher keine Gelstärke gemessen werden konnte (nicht dargestellt). Die höchsten Gelstärken wurden in Hy 4 ($350,15 \pm 10,01$ Pa) und Hy 10 ($297,81 \pm 7,62$ Pa) gemessen. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den Studien von Kobayashi et al. (Kobayashi et al. 1994) und Karim et al. (Karim et al. 1996). Beide Autorengruppen zeigten, dass Formulierungen mit höhermolekularer HA (SMW-HA, bzw. HMW-HA) eine höhere Gelstärke aufweisen als Formulierungen, die lediglich niedermolekulare HA (VLMW-HA, bzw. LMW-HA) beinhalten. Welsh et al. (Welsh et al. 1980) begründen dies mit einer kompetitiven Inhibition der Ausbildung einer 3D-Matrix durch niedermolekulare HA-Segmente. Im Detail ordnen sich höhermolekulare HA-Ketten in einem Medium durch ionische und hydrophobe Wechselwirkungen in einer dreidimensionalen Struktur an. Dies geht mit einer Erhöhung der Viskosität des Mediums einher und kann schließlich zur Ausbildung eines Geles führen. Niedermolekulare HA-Moleküle können ebenfalls in Wechselwirkungen mit den funktionellen Abschnitten der höhermolekularen HA-Moleküle treten und dadurch das Ausbilden einer übergeordneten Struktur verhindern. Zusammenfassend zeigen die rheologischen Daten den strukturbestimmenden Einfluss von HMW-HA und SMW-HA auf die Gelstärke der Formulierungen. Aufgrund dieser Ergebnisse wurden Formulierungen mit 1,0 Gew.-% VLMW-HA und 1,0 Gew.-% HMW-HA, bzw. 1,0 Gew.-% LMW-HA und 1,5 Gew.-% SMW-HA für eine detailliertere Charakterisierung im Rahmen einer Stabilitätsstudie ausgewählt.

3.1.3.3 Einfluss von Hyaluronsäure auf die Gelstärke und die Gelierungstemperatur von Poloxamergelen

HA mit einem sehr niedrigen (VLMW-HA) bzw. niedrigen Molekulargewicht (LMW-HA) kann sowohl einen Einfluss auf die Gelstärke bei Hauttemperatur als auch auf die Sol-Gel-Übergangstemperatur (T_{SG}) des Poloxamergels haben. Darüber hinaus kann niedermolekulare HA penetrationsfördernd wirken. Aus diesen Gründen wurde der Einfluss zweier niedermolekularer HA auf die physikochemischen Eigenschaften des entwickelten Poloxamergel 7 (18,0 Gew.-% Poloxamer 407 und 15,0 Gew.-% Poloxamer 188; Po 7) untersucht (Tabelle 23, Abbildung 17).

Tabelle 23: Übersicht über die Zusammensetzung der Formulierungen und deren Sol-Gel-Übergangstemperatur (T_{SG}), sowie Gelstärke bei Hauttemperatur (32 °C bis 34 °C), Gelstärke = Mittelwert des Speichermodul G' im LVEB [Pa], Hyaluronsäure mit sehr niedrigem Molekulargewicht (VLMW) und niedrigem Molekulargewicht (LMW)

Gel	Poloxamer		Hyaluronsäure		T_{SG} [°C]	Gelstärke [Pa]	
	P407	P188	VLMW	LMW			
Po 7	18,00	15,00	---	---	18,50	7386,75 ±	450,99
HyPo 1	18,00	15,00	0,50	---	15,17 ± 0,04	6031,77 ±	14,98
HyPo 2	18,00	15,00	1,00	---	15,42 ± 0,48	6181,02 ±	41,44
HyPo 3	18,00	15,00	---	0,50	15,13 ± 0,12	6198,12 ±	220,77
HyPo 4	18,00	15,00	---	1,00	15,12 ± 0,04	8139,25 ±	1074,05

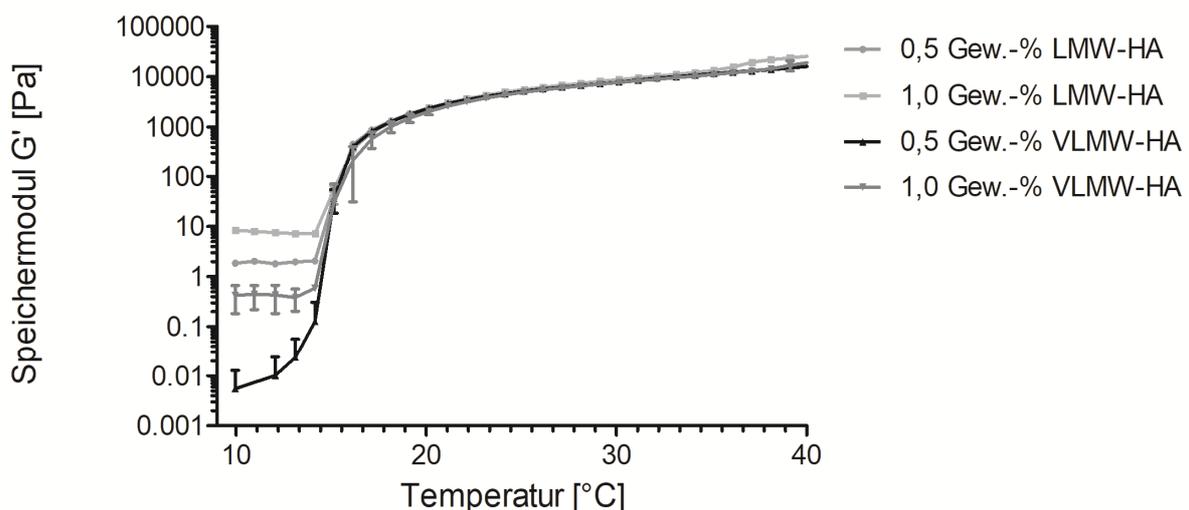


Abbildung 17: Gelstärke der hyaluronsäuremodifizierten Poloxamergele, Gelstärke als Speichermodul G' [Pa], alle Formulierungen beinhalten neben dem Hyaluronsäureanteil 18,0 Gew.-% Poloxamer 407 und 15,0 Gew.-% Poloxamer 188

Die Viskosität aller hyaluronsäuremodifizierten Poloxamerformulierungen (HyPo) war vor dem Erreichen der T_{SG} konzentrationsabhängig. Mit ansteigender Konzentration und ansteigendem Molekulargewicht der verwendeten HA erhöhte sich auch die Viskosität der Formulierungen. Nach dem Erreichen des Gelierungspunktes war die Gelstärke lediglich von den Poloxameren abhängig (Abbildung 17). Dies wird durch den nahezu identischen Verlauf der Kurven des Speichermoduls G' in Abhängigkeit von der Temperatur verdeutlicht. Bei niedrigen Temperaturen (also vor dem Erreichen des T_{SG}) zeigen sich deutliche Unterschiede in der Gelstärke. Formulierungen, die LMW-HA beinhalten, hatten einen höheren Speichermodul (G') als Formulierungen mit VLMW-HA. Da die gelbildenden Eigenschaften von HA mit höherem Molekulargewicht ansteigen und die Penetrationsförderung abnimmt (Tabelle 21) wurde ein Ergebnis in dieser Form auch erwartet. Durch das Einarbeiten von VLMA-HA konnte eine Reduzierung der Gelstärke im Vergleich zur hyaluronsäurefreien Formulierung festgestellt werden. Der Unterschied zwischen den verwendeten VLMW-HA-Konzentrationen fällt jedoch nur gering aus. Verglichen mit der ursprünglichen Formulierung (18,0 Gew.-% P407, 15,0 Gew.-% P188; Gel Po 7) reduzierte auch das Hinzufügen von 0,5 Gew.-% LMW-HA die Gelstärke. Auch eine Erhöhung der Konzentration auf 1,0 Gew.-% LMW-HA hatte keinen wesentlichen Einfluss auf die resultierende Gelstärke. Verglichen mit der Ausgangsformulierung (Po 7) zeigten alle HyPo-Gele eine geringere T_{SG} . Ein Vergleich dieser Ergebnisse mit anderen Studien zum Einfluss von HA auf die physikochemischen Eigenschaften eines Poloxamerhydrogels ist jedoch schwierig, da die Literatur diesbezüglich teilweise widersprüchlich ist. Wei et al. (Wei et al. 2002) beispielsweise zeigten, dass das Einarbeiten von HA einen Anstieg der Gelierungstemperatur und gleichzeitig eine Verringerung der Gelstärke zur Folge haben kann. Die Autoren führen dies auf eine gestörte Interaktion der Poloxamermoleküle untereinander zurück, die von der HA verursacht wird. Auch Seo und Kim zeigten, dass der Zusatz hydrophiler Substanzen die Gelstärke erniedrigen und dadurch die Gelbildung verzögern kann (Seo und Kim 2012). Mayol et al. (Mayol et al. 2008) und Eisenhardt et al. (Eisenhardt et al. 2015) hingegen beobachteten, dass der Zusatz von HA zu einem Poloxamergel dessen Gelstärke unabhängig von der Messtemperatur erhöht. Sie führen dies auf wasserbindende Eigenschaften von HA und Interaktion mit den Poloxameren zurück.

Eine mögliche Erklärung dieser unterschiedlichen Beobachtungen könnte auf den unterschiedlichen Aufbau der verwendeten Wasserphasen und den jeweils verwendeten Hyaluronsäuren beruhen. In der in dieser Arbeit verwendeten Wasserphase sind, neben PBS als Hauptbestandteil, weitere hydrophile Substanzen enthalten (Glycerol, Butylenglykol). Der Argumentation von Seo und Kim (Seo und Kim 2012) folgend, üben diese ebenfalls einen Einfluss auf die Gelstärke und die T_{SG} aus. Es ist daher wahrscheinlich, dass durch eine Interaktion der HA mit den Bestandteilen der Wasserphase der Hydratationsgrad und die bei einer Temperaturerhöhung stattfindende Dehydratation der Poloxamermoleküle beeinflusst wird. Darüber hinaus handelt es sich bei HA um ein Biomolekül, welches herstellungsbedingt Schwankungen in der Molekülmassenverteilung aufweist und somit auch einen unterschiedlichen Einfluss auf die rheologischen Eigenschaften eines Gels ausüben kann. Kleinere Hyaluronsäuremoleküle können sich leicht zwischen die PEO-Einheiten der Poloxamere anlagern, beeinflussen deren Gelstärke jedoch weniger als solche mit einem höheren Molekulargewicht. In keiner der zitierten Studien wurde zudem ein systematischer Einfluss von Hyaluronsäuren mit unterschiedlichen Molekulargewichten auf die physikochemischen Eigenschaften eines Hydrogels untersucht, sodass ein exakter Vergleich der Studiendaten nicht möglich ist. Zusammenfassend erhöhte das Einarbeiten der unterschiedlichen Hyaluronsäuren in Po 7 in jedem Fall die Gelstärke unterhalb der T_{SG} . Dies ist aus lagerungstechnischer Sicht wünschenswert. Auch die Gelierungstemperatur wurde von allen getesteten Hyaluronsäuren herabgesetzt, wobei kein wesentlicher Unterschied zwischen den verschiedenen Molekulargewichten und Einsatzkonzentrationen festgestellt werden konnte. Aus diesen Gründen wurden die Formulierungen HyPo 2 (1,0 Gew.-% VLMW-HA) und HyPo 4 (1,0 Gew.-% LMW-HA) in einer Lagerungsstabilitätsstudie weiterführend untersucht (3.1.4 „Rheologische Untersuchungen der Lagerungsstabilität geeigneter Hydrogele“).

3.1.4 Rheologische Untersuchungen der Lagerungsstabilität geeigneter Hydrogele

Im nachfolgenden Kapitel wird die Untersuchung der Lagerungsstabilität ausgesuchter Hydrogele mit Hilfe von rheologischen Oszillationsversuchen beschrieben. Die Beurteilung der Stabilität der Hydrogele und deren physikochemischer Eigenschaften erfolgt analog zu der Beurteilung der MBO-Stabilität (3.1.2.2 Rheologische Untersuchungen der Stabilität der Mikroemulsion-basierten Organogelee). Einen Überblick über die getesteten Formulierungen gibt Tabelle 24. Teile der in diesem Kapitel und den zugehörigen Unterkapiteln dargestellten Daten wurden im Rahmen einer betreuten Abschlussarbeit erhoben (Lisa Wolowczyk 2018; Betreuer Christopher Kiselmann).

Tabelle 24: Übersicht über die im Rahmen einer Lagerungsstabilität untersuchten Hydrogele

Gel	Anteil Gelbildner [Gew.-%]					
	Poloxamer			Hyaluronsäure		
	P407	P188	VLMW	LMW	SMW	HMW
Hydrogel 1	18,00	15,00	1,00	---	---	---
Hydrogel 2	18,00	15,00	---	1,00	---	---
Hydrogel 3	---	---	1,00	---	---	1,00
Hydrogel 4	---	---	---	1,00	1,50	---

3.1.4.1 *Rheologische Untersuchungen der Stabilität hyaluronsäuremodifizierter Poloxamergele (Hydrogel 1 und Hydrogel 2)*

Amplitudensweep

Zum Startzeitpunkt der Stabilitätsstudie zeigten die Rheogramme des Amplitudensweeps der Hydrogele 1 (18,0 Gew.-% P407, 15,0 Gew.-% P188, 1,0 Gew.-% VLMA-HA; HG 1) und 2 (18,0 Gew.-% P407, 15,0 Gew.-% P188, 1,0 Gew.-% LMA-HA; HG 2) ein plateauartiges Dominieren des Speichermoduls G' über den Verlustmodul G'' (Abbildung 18, Abbildung 19). Erst nach Erreichen der Nachgebegrenze fiel der Speichermodul G' ab und kreuzte an der Fließgrenze den Graphen der Messung des Verlustmodul G'' . Unabhängig von den Lagerungsbedingungen konnten auch nach einmonatiger Lagerung keine wesentlichen Veränderungen der Rheogramme von HG 1 und HG 2 verglichen mit den Graphen an Tag 1 der Untersuchungen beobachtet werden (Anhang IX: Abbildung 96 bis Abbildung 99; Anhang X: Abbildung 108 bis Abbildung 111). Beide Formulierungen konnten daher definitionsgemäß (Vries 2006) über den gesamten Lagerungszeitraum als Gele identifiziert werden.

Tabelle 25: Ergebniss des Amplitudensweeps von Hydrogel 1 (18,0 Gew.-% P407, 15,0 Gew.-% P188, 1,0 Gew.-% VLMW-HA) zu Beginn und nach einmonatiger Lagerung; Ergebnisse dargestellt als Mittelwert \pm Standardabweichung (n = 3); Gelstärke = Mittelwert Speichermodul G' [Pa] im linear-viskoelastischen Bereich (LVEB); Fließübergangsindex = Fließgrenze [Pa]/Nachgebegrenze [Pa]

Messwert	Hydrogel 1			
	Tag 1	Monat 1 (5 °C)	Monat 1 (25 °C, 60 %rH)	Monat 1 (40 °C, 75 %rH)
LVEB [%]	0,62 – 2,92	0,62 – 2,92	0,62 – 2,92	0,62 – 2,93
Gelstärke [Pa]	3036,79 \pm 651,99	3120,35 \pm 419,79	3165,70 \pm 320,28	3254,01 \pm 580,44
Nachgebegrenze γ_y Scherdef. [%]	2,92 \pm 0,01	2,92 \pm 0,00	2,92 \pm 0,01	2,93 \pm 0,00
Nachgebegrenze τ_y Schubsp. [Pa]	88,61 \pm 16,43	91,21 \pm 13,66	91,08 \pm 7,34	93,66 \pm 14,38
Fließgrenze γ_f Schubsp. [%]	5,38 \pm 0,12	5,48 \pm 0,22	5,38 \pm 0,19	5,33 \pm 0,18
Fließgrenze τ_f Schubsp. [Pa]	115,73 \pm 18,07	120,12 \pm 14,26	119,11 \pm 2,15	122,85 \pm 11,43
Fließübergangsindex (τ_f/τ_y)	1,31 \pm 0,03	1,32 \pm 0,04	1,31 \pm 0,08	1,31 \pm 0,07

Tabelle 26: Ergebniss des Amplitudensweeps von Hydrogel 2 (18,0 Gew.-% P407, 15,0 Gew.-% P188, 1,0 Gew.-% LMW-HA) zu Beginn und nach einmonatiger Lagerung; Ergebnisse dargestellt als Mittelwert \pm Standardabweichung (n = 3); Gelstärke = Mittelwert Speichermodul G' [Pa] im linear-viskoelastischen Bereich (LVEB); Fließübergangsindex = Fließgrenze [Pa]/Nachgebegrenze [Pa]

Messwert	Hydrogel 2			
	Tag 1	Monat 1 (5 °C)	Monat 1 (25 °C, 60 %rH)	Monat 1 (40 °C, 75 %rH)
LVEB [%]	0,62 – 2,93	0,62 – 2,92	0,62 – 2,92	0,62 – 2,92
Gelstärke [Pa]	4030,04 \pm 265,88	3160,36 \pm 704,14	3319,54 \pm 590,07	2699,24 \pm 593,43
Nachgebegrenze γ_y Scherdef. [%]	2,93 \pm 0,00	2,92 \pm 0,00	2,92 \pm 0,01	2,92 \pm 0,01
Nachgebegrenze τ_y Schubsp. [Pa]	112,49 \pm 7,28	92,38 \pm 17,81	95,61 \pm 15,04	78,79 \pm 28,15
Fließgrenze γ_f Schubsp. [%]	4,88 \pm 0,12	5,10 \pm 0,12	5,08 \pm 0,12	5,06 \pm 0,20
Fließgrenze τ_f Schubsp. [Pa]	137,50 \pm 4,07	118,61 \pm 14,31	120,23 \pm 14,00	100,72 \pm 15,85
Fließübergangsindex (τ_f/τ_y)	1,22 \pm 0,04	1,28 \pm 0,08	1,26 \pm 0,04	1,28 \pm 0,19

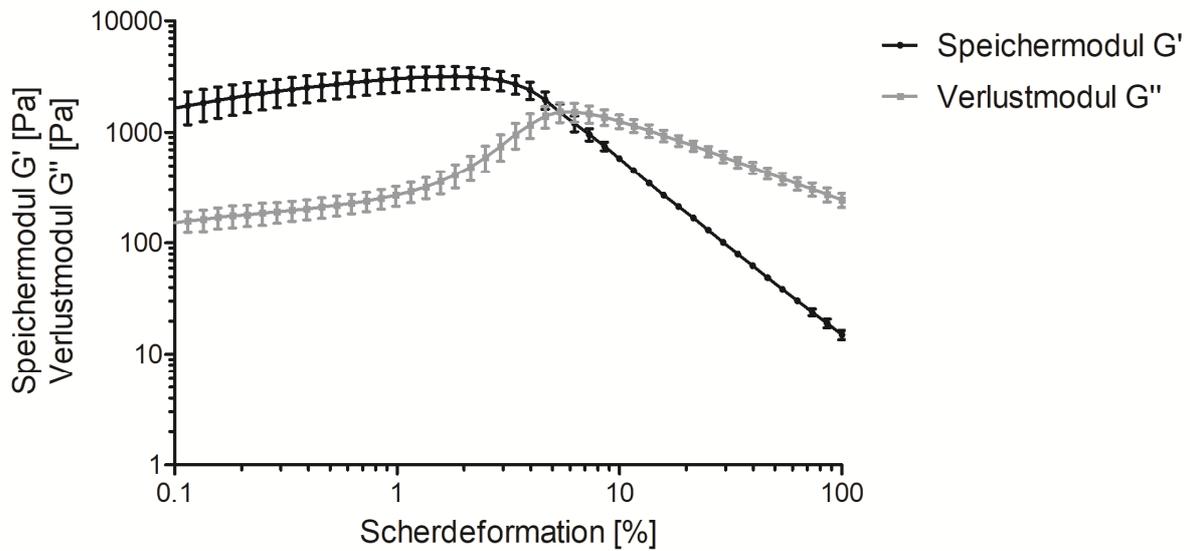


Abbildung 18: Amplitudensweep des Hydrogels 1 an Tag 1 der Lagerungsstabilität, 24 Stunden nach der Herstellung, Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (MW ± SD; n = 3), Hydrogel 1 = 1,0 % VLMW-HA, 18,0 % P407, 15,0 % P188, Kreisfrequenz = 10 rad/s, Messtemperatur = 25 °C, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt 500 µm

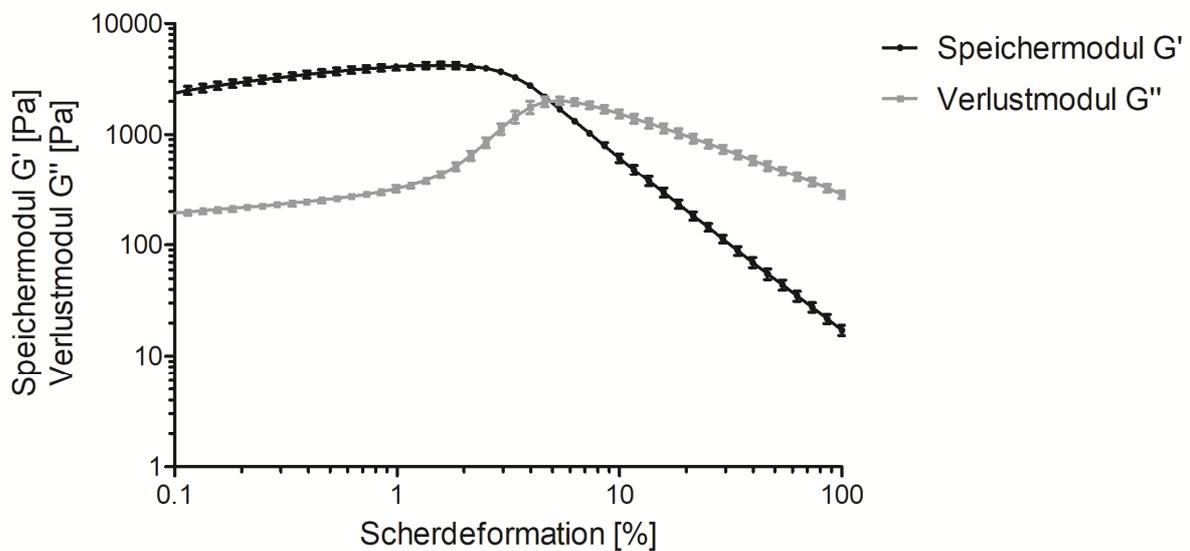


Abbildung 19: Amplitudensweep des Hydrogels 2 an Tag 1 der Lagerungsstabilität, 24 Stunden nach der Herstellung, Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (MW ± SD; n = 3), Hydrogel 2 = 18,0 % P407, 15,0 % P188, 1,0 % LMW-HA, Kreisfrequenz = 10 rad/s, Messtemperatur = 25 °C, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt 500 µm

Bestimmung des linear-viskoelastischen Bereichs

Wie bereits bei der Lagerungsstudie der MBO beschrieben, wurde auch für die Hydrogele der LVEB jeder Formulierung zu jedem Zeitpunkt der Stabilitätsuntersuchung neu bestimmt. Dies garantiert, dass während den nachfolgenden Messungen (Frequenz- und Temperatursweep) keine irreversiblen Schädigungen der Probenmatrix durch Scherung auftreten. Beide Hydrogele zeigten einen sehr ähnlichen Verlauf des Speichermodul G' , der in einem Scherdeformationsbereich von 0,62 % bis 2,92 % (HG 1), bzw 0,62 % bis 2,93 % (HG 2) ein Plateau ausbildete. Da sich der LVEB beider Gele während der Lagerung nicht wesentlich veränderte, konnten alle Temperatur- und Frequenzsweeps bei einer Scherdeformation von 1,0 % gemessen werden.

Bestimmung der Gelstärke

Zu Beginn der Stabilitätsstudie konnte eine Gelstärke von $3036,79 \pm 651,99$ Pa bestimmt werden. Nach einmonatiger Lagerung konnten Messwerte um ca. 3100 Pa unabhängig von der Lagerungstemperatur gemessen werden. Auffällig ist jedoch die zum Teil hohe Standardabweichung. Eine mögliche Ursache dafür könnte ein noch nicht endgültig ausgehärtetes Gelgerüst sein, sodass es innerhalb der einzelnen Messungen der Proben zu Abweichungen in der resultierenden Gelstärke kommt. Dies konnte bereits während der Formulierungsentwicklung beobachtet werden (Abbildung 17) und wird im nachfolgenden Temperatursweep ausführlicher erläutert. Verglichen mit den Ergebnissen der Formulierungsentwicklung konnten große Abweichungen zwischen HG 1 und der identischen Formulierung HyPo 2 festgestellt werden. Dort betrug die Gelstärke $6181,02 \pm 41,44$ Pa (Tabelle 25). Dieser Unterschied ist mit den veränderten Messtemperaturen in der Stabilitätsstudie (25 °C) und der Formulierungsentwicklung (32 °C) zu erklären. Auch für HG 2 kann ein Unterschied zwischen der beobachteten Gelstärke während der Formulierungsentwicklung ($8139,25 \pm 1074,05$ Pa) und der Lagerungsstabilität (Tabelle 26) festgestellt werden. Diese Differenz kann erneut auf die abweichende Messtemperatur (25 °C Lagerungsstabilität; 32 °C Formulierungsentwicklung) und die generelle Temperatursensitivität der Poloxamere zurückgeführt werden.

Erwartungsgemäß konnte für HG 2 zu Beginn der Stabilitätsuntersuchung eine höhere Gelstärke als für HG 1 ermittelt werden. Dies ist auf die Verwendung einer, verglichen mit HG 1, höhermolekularen HA (LMW-HA) zurückzuführen. Diese führte bereits im Rahmen der Formulierungsentwicklung zu Gelen mit einer höheren Festigkeit als die in HG 1 verwendete VLMW-HA. Nach einmonatiger Lagerung zeigte HG 2 jedoch den Trend einer zeit- und temperaturabhängigen Verminderung der Gelstärke, die in Proben, die bei 40 °C, 75 %rH gelagert waren, am deutlichsten ausgeprägt war (Tabelle 26). Da bereits während der Formulierungsentwicklung gezeigt werden konnte, dass die Gelstärke eines hyaluronsäuremodifizierten Poloxamergels auch von der Art und Menge der verwendeten HA abhängig ist, könnte ein hydrolytischer Abbau der strukturgebenden HA diesen Effekt erklären. Tokita und Okamoto (Tokita und Okamoto 1995) zeigten in ihrer Studie, dass ein hydrolytischer Abbau von HA zu einem sinkenden Molekulargewicht der verbliebenden Hyaluronsäureketten führt. Dies kann schließlich zur Zerstörung des Gelgerüsts führen. Auch Patterson et al. beschrieben den Einfluss eines degradierenden Hyaluronsäuregerüsts auf dessen mechanische Eigenschaften und versuchten sich dies im Rahmen der Knochenregeneration nutzbar zu machen (Patterson et al. 2010). Zusammenfassend kann das Gelgerüst von HG 1 als unempfindlich gegenüber den getesteten Lagerungsbedingungen angesehen werden. Die Verminderung der Gelstärke von HG 2 hingegen ist ein Anzeichen für Instabilität. Dies wird im Kontext der nachfolgenden rheologischen Messungen weiter betrachtet.

Nachgebegrenze und Fließgrenze

Die Nachgebegrenze von HG 1 zeigte leichte Schwankungen zwischen dem Beginn der Stabilitätsuntersuchung und nach einmonatiger Lagerung bei den verschiedenen Lagerungsbedingungen. Dies entspricht den Beobachtungen des Verlaufs der Gelstärke. Da die ermittelten Messwerte jedoch, die jeweiligen Standardabweichung miteinbeziehend, eine gute Vergleichbarkeit aufzeigten, kann dies als Bekräftigung für das Vorliegen eines gegenüber den getesteten Lagerungsbedingungen unempfindlichen Gelgerüsts angesehen werden. Für HG 2 hingegen konnten Schwankungen in der Nachgebegrenze ermittelt werden, die größer waren als die Streuung der Standardabweichung. Die Fließgrenze beider Hydrogele verhält sich analog zu den Ergebnissen der Gelstärke und der Nachgebegrenze. Für HG 1 wurden sehr konstante Messwerte mit lediglich kleinen Schwankungen ermittelt. Bei HG 2 konnte ein Absenken der Fließgrenze beobachtet werden, das bei 40 °C, 75 %rH am stärksten ausgeprägt war.

Fließübergangsindex

Da sich die Messwerte der Nachgebe- und der Fließgrenze beider Hydrogele in nahezu gleichem Umfang veränderten, bleibt der daraus kalkulierte Fließübergangsindex nahezu konstant. Für HG 1 weist dieser über den Lagerungszeitraum einen Wert von 1,31 auf, wohingegen HG 2 einen Fließübergangsindex von 1,22 zeigt. Beide Hydrogele zeigen somit ein sehr geringes Risiko für Spröbruchverhalten (Mezger 2016).

Frequenzsweep

Sowohl in HG 1 als auch in HG 2 dominierte bei niedrigen Frequenzen (< 10 rad/s) elastisches Verhalten klar über viskosem Verhalten ($G' > G''$). Das bedeutet, dass beide Formulierungen im Ruhezustand über ein dreidimensionales Gelnetzwerk verfügten (Abbildung 20, Abbildung 21; Anhang IX: Abbildung 100 bis Abbildung 103; Anhang X: Abbildung 108 bis Abbildung 111). Ab einer Frequenz von ca. 80 rad/s konnte zu Beginn der Stabilitätsuntersuchung ein Schnittpunkt der Kurven von G' und G'' in HG 1 bestimmt werden. Das bedeutet, dass die Formulierung ab dieser Frequenz überwiegend viskoses Verhalten zeigte und demnach die Gelstruktur irreversibel zerstört wurde. Im weiteren Verlauf der Stabilitätsstudie konnten keine wesentlichen Veränderungen im Kurvenverlauf von G' und G'' beobachtet werden. HG 1 zeigt sich somit unempfindlich gegenüber Erschütterungen, die typischerweise während der Lagerung und dem Transport auftreten. Eine starke Erschütterung des Geles, z.B. durch ein Fallenlassen des Abgabegefäßes, führt jedoch zu Instabilität der Formulierung. In den Frequenzsweeps von HG 2 zeigte sich zwar ebenfalls ein vorwiegend elastisches Verhalten ($G' > G''$), jedoch konnte eine Abnahme der Erschütterungsstabilität des Gels im Verlauf der Lagerung ermittelt werden. Visualisiert wird dies durch ein Verschieben des Schnittpunktes von G' und G'' zu niedrigeren Frequenzen. Dieses Ergebnis unterstützt die These einer Hydrolyse der LMW-HA.

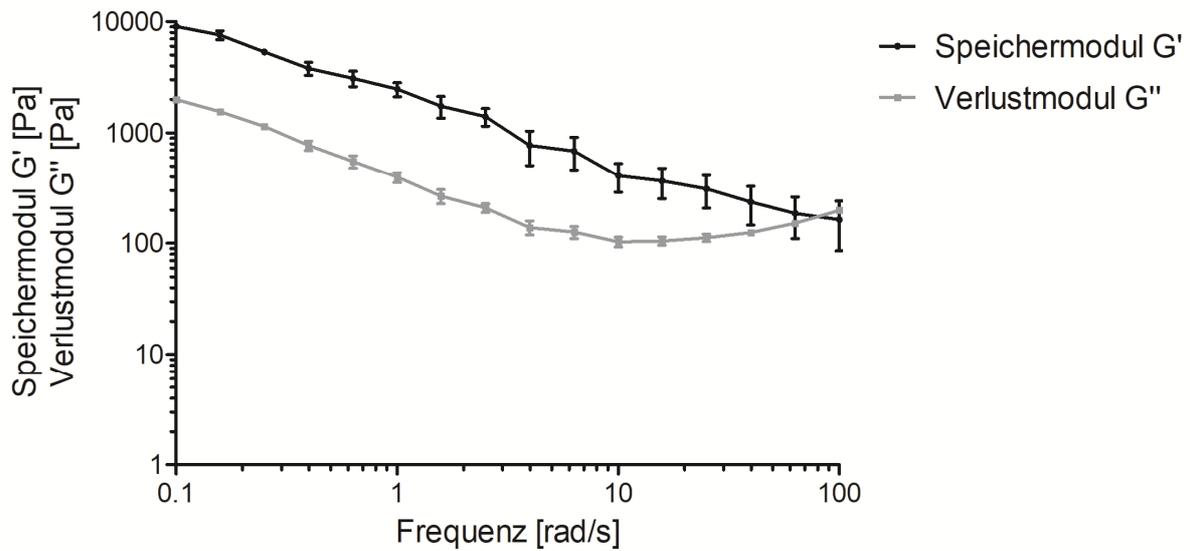


Abbildung 20: Frequenzsweep des Hydrogels 1 an Tag 1 der Lagerungsstabilität, 24 Stunden nach der Herstellung, Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (MW \pm SD; n = 3), Hydrogel 1 = 1,0 % VLMW-HA, 18,0 % P407, 15,0 % P188, Scherdeformation = 0,25 %, Messtemperatur = 25 °C, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt 500 μ m

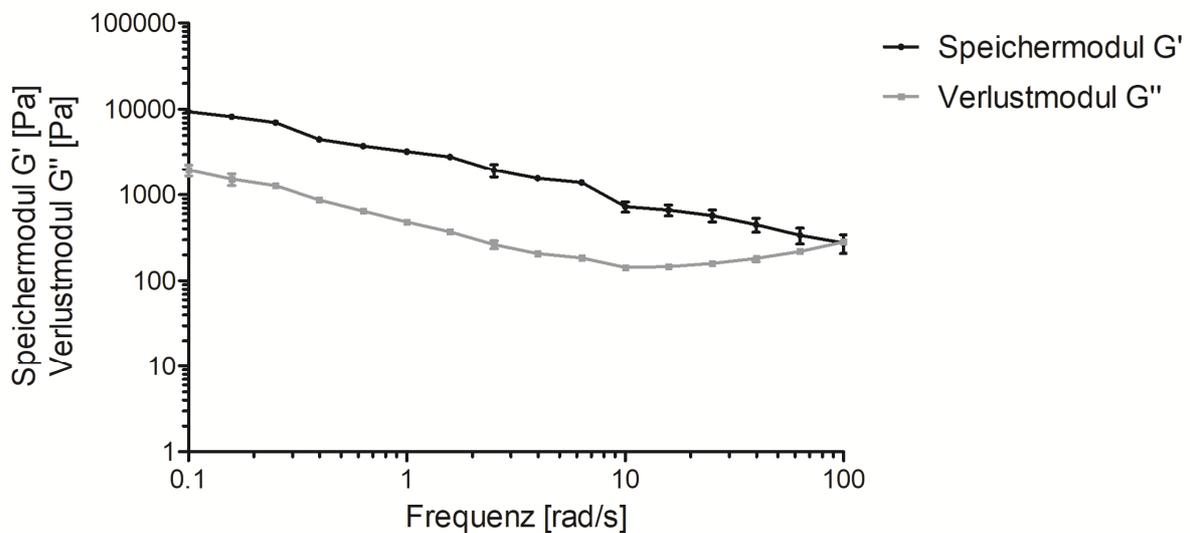


Abbildung 21: Frequenzsweep des Hydrogels 2 an Tag 1 der Lagerungsstabilität, 24 Stunden nach der Herstellung, Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (MW \pm SD; n = 3), Hydrogel 2 = 18,0 % P407, 15,0 % P188, 1,0 % LMW-HA, Scherdeformation = 0,25 %, Messtemperatur = 25 °C, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt 500 μ m

Resistenz gegen Synärese

Wie bereits bei den Stabilitätsuntersuchungen der MBO erörtert, deuten Verlustfaktoren zwischen 0,2 und 0,3 auf ein sehr geringes Synäreserisiko hin (Mezger 2016). Über den gesamten Lagerungszeitraum unterlag der Verlustfaktor ($\tan \delta$) von HG 1 keinen wesentlichen Schwankungen und wurde daher als konstant angesehen (Tabelle 27). Die kalkulierten Werte lagen innerhalb des von der Literatur empfohlenen Bereiches, sodass HG 1 als resistent gegenüber Synärese bei Lagerung unter den getesteten Konditionen angesehen werden kann. Auch der Verlustfaktor von HG 2 veränderte sich während der Lagerung nicht maßgeblich und lag innerhalb der empfohlenen Grenzen. Obwohl sich die Gelstärke von HG 2 während der einmonatigen Lagerung verringert, kann die Formulierung demnach dennoch auch als resistent gegenüber Synärese angesehen werden.

Tabelle 27: Darstellung des Verlustfaktors $\tan \delta$ von Hydrogel 1 und 2 über einen Lagerungszeitraum von einem Monat bei verschiedenen Lagerungsbedingungen, Frequenzbereich < 10 rad/s, Mittelwert \pm Standardabweichung ($n = 3$)

Zeitpunkt	$\tan \delta$	
	Hydrogel 1	Hydrogel 2
Tag 1	0,19 \pm 0,02	0,17 \pm 0,01
Monat 1, 5 °C	0,24 \pm 0,04	0,21 \pm 0,03
Monat 1, 25 °C, 60% rH	0,23 \pm 0,02	0,21 \pm 0,04
Monat 1, 40 °C, 75% rH	0,23 \pm 0,04	0,22 \pm 0,04

Temperatursweep

Wie erwartet, weisen HG 1 und HG 2 bei Temperaturen unterhalb ihres Gelierungspunktes ein viskoses Verhalten auf ($G'' > G'$) (Abbildung 22, Abbildung 23). Der Temperaturerhöhung folgend, ist ein sprunghafter Anstieg des Speichermoduls G' zu beobachten, wohingegen der Verlustmodul G'' nur langsam ansteigt. Die T_{SG} von HG 1 beträgt zu Beginn der Stabilitätsstudie $16,2 \pm 0,9$ °C und bleibt über den gesamten Lagerungszeitraum temperaturunabhängig konstant (Tabelle 28; Rheogramme Anhang IX: Abbildung 104-Abbildung 107). Auch auf die Gelstärke bei Hauttemperatur haben der Lagerungszeitraum und die verschiedenen Lagerungstemperaturen keinen wesentlichen Einfluss. Dies steht im Einklang mit den bisherigen Ergebnissen des Amplituden- und Frequenzsweeps von HG 1. HG 2 weist zu Beginn der Untersuchungen eine Gelierungstemperatur von $14,9 \pm 0,3$ °C auf. Nach einmonatiger Lagerung konnte ein Anstieg dieser auf $17,3 \pm 0,5$ °C (Lagerung bei 5 °C), $18,3 \pm 2,0$ °C (Lagerung bei 25 °C), bzw. $18,2 \pm 1,8$ °C (Lagerung bei 25 °C) beobachtet werden. Gleichzeitig verminderte sich die Gelstärke bei Hauttemperatur. Ein gegenteiliger Effekt, nämlich das Absenken der T_{SG} bei gleichzeitiger Erhöhung der Gelstärke, wurde im Rahmen der Formulierungsentwicklung für das Einarbeiten von 1,0 Gew.-% LMW-HA in ein Poloxamergel mit 18,0 Gew.-% P407 und 15,0 Gew.-% P188 erörtert (Kapitel 3.1.3.3 „Einfluss von Hyaluronsäure auf die Gelstärke und die Gelierungstemperatur von Poloxamergelen“, Tabelle 23). Dies ist ein weiterer Beleg für eine mögliche Hydrolyse der in HG 2 eingearbeiteten LMW-HA.

Tabelle 28: Gelstärke bei Hauttemperatur und Gelierungstemperatur der Hydrogele 1 und 2 ermittelt im Temperaturbereich von 32 °C bis 34 °C, Mittelwert \pm Standardabweichung (n = 3)

Zeitpunkt	Hydrogel 1		Hydrogel 2	
	Gelstärke [Pa]	T_{SG} [°C]	Gelstärke [Pa]	T_{SG} [°C]
Tag 1	$10450,8 \pm 817,2$	$16,2 \pm 0,9$	$12377,7 \pm 216,1$	$14,9 \pm 0,3$
1 Monat, 5 °C	$10264,2 \pm 866,7$	$16,4 \pm 1,3$	$10979,8 \pm 910,0$	$17,3 \pm 0,5$
1 Monat, 25 °C, 60 %rH	$10075,6 \pm 801,0$	$16,6 \pm 1,5$	$10249,2 \pm 941,3$	$18,3 \pm 2,0$
1 Monat, 40 °C, 75 %rH	$10442,0 \pm 891,1$	$16,4 \pm 1,4$	$10565,3 \pm 583,0$	$18,2 \pm 1,8$

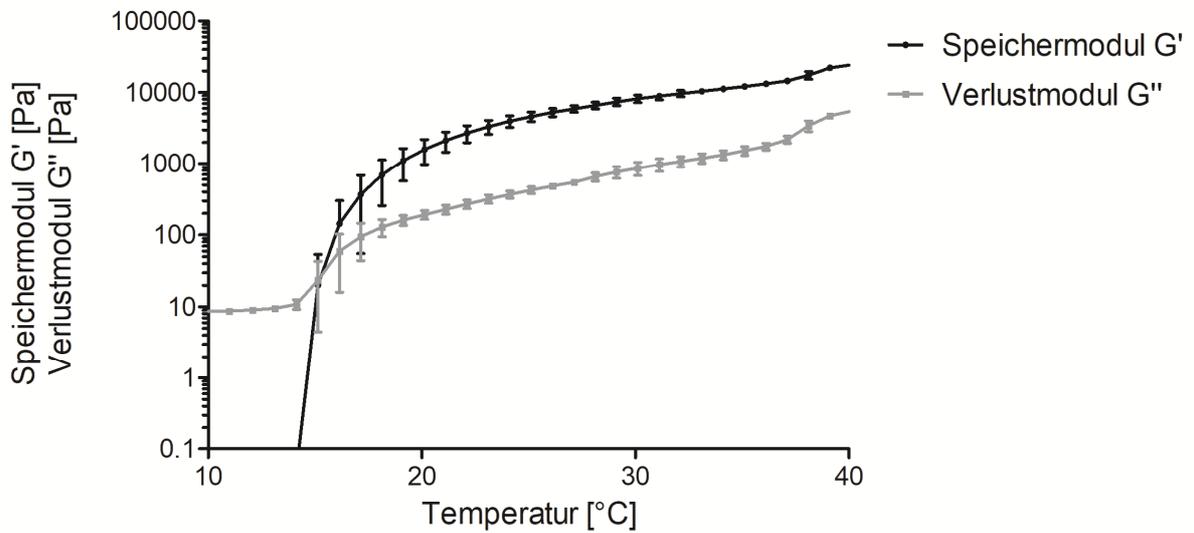


Abbildung 22: Temperatursweep des Hydrogels 1 an Tag 1 der Lagerungsstabilität, 24 Stunden nach der Herstellung, Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa ($MW \pm SD$; $n = 3$), Hydrogel 1 = 1,0 % VLMW-HA, 18,0 % P407, 15,0 % P188, Scherdeformation = 0,25 %, Kreisfrequenz = 10 rad/s, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt 500 μm

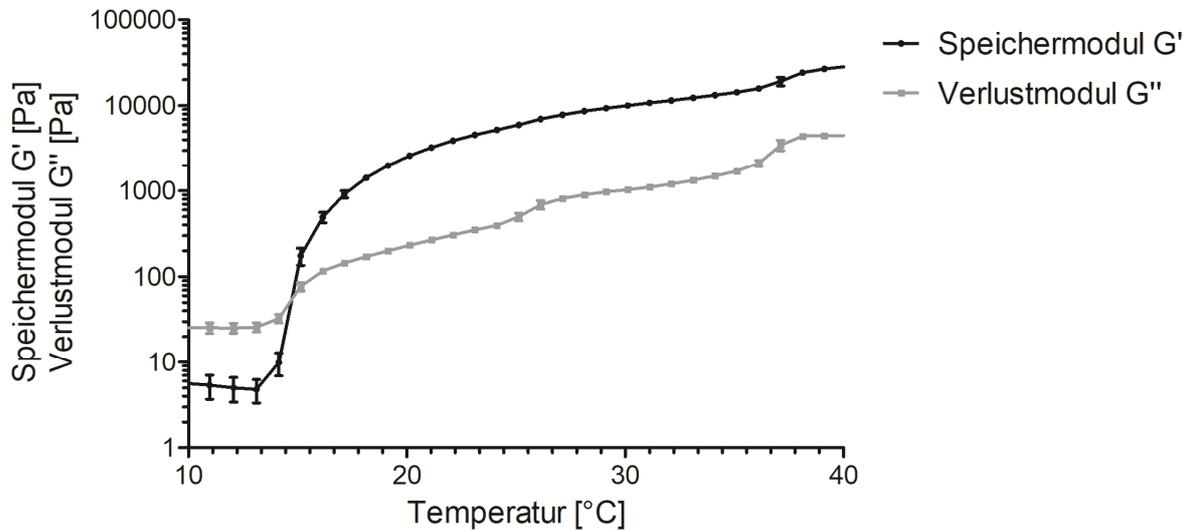


Abbildung 23: Temperatursweep des Hydrogels 2 an Tag 1 der Lagerungsstabilität, 24 Stunden nach der Herstellung, Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa ($MW \pm SD$; $n = 3$), Hydrogel 2 = 18,0 % P407, 15,0 % P188, 1,0 % LMW-HA, Scherdeformation = 0,25 %, Kreisfrequenz = 10 rad/s, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt 500 μm

3.1.4.2 *Rheologische Untersuchungen der Stabilität der Hyaluronsäuregele (Hydrogel 3 und Hydrogel 4)*

Amplitudensweep

Sowohl bei Hydrogel 3 (1,0 Gew.-% VLMW-HA und 1,0 Gew.-% HMW-HA; HG 3), als auch bei Hydrogel 4 (1,0 Gew.-% LMW-HA und 1,5 Gew.-% SMW-HA; HG 4) dominiert der Speichermodul G' über dem Verlustmodul G'' , sodass es sich bei beiden Formulierungen per Definition (Vries 2006) um Gele handelt (Abbildung 24, Abbildung 25). Auch nach einmonatiger Lagerung weisen die Rheogramme einen, verglichen mit dem Startzeitpunkt, nahezu identischen Kurvenverlauf von G' und G'' auf, sodass es sich auch hier jeweils definitionsgemäß um Gele handelt (Anhang XI: Abbildung 120 bis Abbildung 123 und Anhang XII: Abbildung 132 bis Abbildung 135).

Tabelle 29: Ergebniss des Amplitudensweeps von Hydrogel 3 (1,0 Gew.-% VLMW-HA, 1,0 Gew.-% HMW-HA) zu Beginn und nach einmonatiger Lagerung; Ergebnisse dargestellt als Mittelwert \pm Standardabweichung (n = 3); Gelstärke = Mittelwert Speichermodul G' [Pa] im linear-viskoelastischen Bereich (LVEB); Fließübergangsindex = Fließgrenze [Pa]/Nachgebegrenze [Pa]

Messwert	Hydrogel 3			
	Tag 1	Monat 1 (5 °C)	Monat 1 (25 °C, 60 %rH)	Monat 1 (40 °C, 75 %rH)
LVEB [%]	0,50 - 35,20	0,50 - 35,20	0,50 - 35,20	0,50 - 35,20
Gelstärke [Pa]	54,40 \pm 3,70	39,81 \pm 3,40	35,44 \pm 2,67	45,54 \pm 3,82
Nachgebegrenze γ_Y Scherdef. [%]	35,20 \pm 0,00	35,20 \pm 0,00	35,20 \pm 0,00	35,20 \pm 0,00
Nachgebegrenze γ_Y Schubsp. [Pa]	23,06 \pm 1,46	17,22 \pm 1,41	15,50 \pm 1,09	20,20 \pm 1,52
Fließgrenze γ_Y Schubsp. [%]	127,74 \pm 1,70	112,82 \pm 1,08	103,36 \pm 0,75	110,14 \pm 1,02
Fließgrenze γ_Y Schubsp. [Pa]	60,93 \pm 3,62	43,25 \pm 4,20	37,66 \pm 3,63	50,03 \pm 4,84
Fließübergangsindex (τ_f/τ_Y)	2,64 \pm 0,01	2,51 \pm 0,04	2,43 \pm 0,06	2,48 \pm 0,05

Tabelle 30: Ergebniss des Amplitudensweeps von Hydrogel 4 (1,0 Gew.-% LMW-HA, 1,5 Gew.-% SMW-HA) zu Beginn und nach einmonatiger Lagerung; Ergebnisse dargestellt als Mittelwert \pm Standardabweichung (n = 3); Gelstärke = Mittelwert Speichermodul G' [Pa] im linear-viskoelastischen Bereich (LVEB); Fließübergangsindex = Fließgrenze [Pa]/Nachgebegrenze [Pa]

Messwert	Hydrogel 4			
	Tag 1	Monat 1 (5 °C)	Monat 1 (25 °C, 60 %rH)	Monat 1 (40 °C, 75 %rH)
LVEB [%]	0,5 - 39,60	0,5 - 39,59	0,5 - 35,20	0,5 - 35,24
Gelstärke [Pa]	196,88 \pm 11,83	181,32 \pm 12,70	166,58 \pm 9,56	144,16 \pm 8,10
Nachgebegrenze γ_Y Scherdef. [%]	39,60 \pm 0,00	39,59 \pm 0,03	35,20 \pm 0,00	35,24 \pm 0,06
Nachgebegrenze γ_Y Schubsp. [Pa]	93,69 \pm 4,99	84,01 \pm 5,70	70,18 \pm 3,92	62,09 \pm 4,22
Fließgrenze γ_Y Schubsp. [%]	113,03 \pm 3,61	125,26 \pm 2,54	124,64 \pm 1,60	115,37 \pm 1,13
Fließgrenze γ_Y Schubsp. [Pa]	204,39 \pm 10,09	198,29 \pm 12,05	183,04 \pm 9,90	156,44 \pm 9,02
Fließübergangsindex (τ_f/τ_Y)	2,18 \pm 0,01	2,36 \pm 0,02	2,61 \pm 0,00	2,52 \pm 0,02

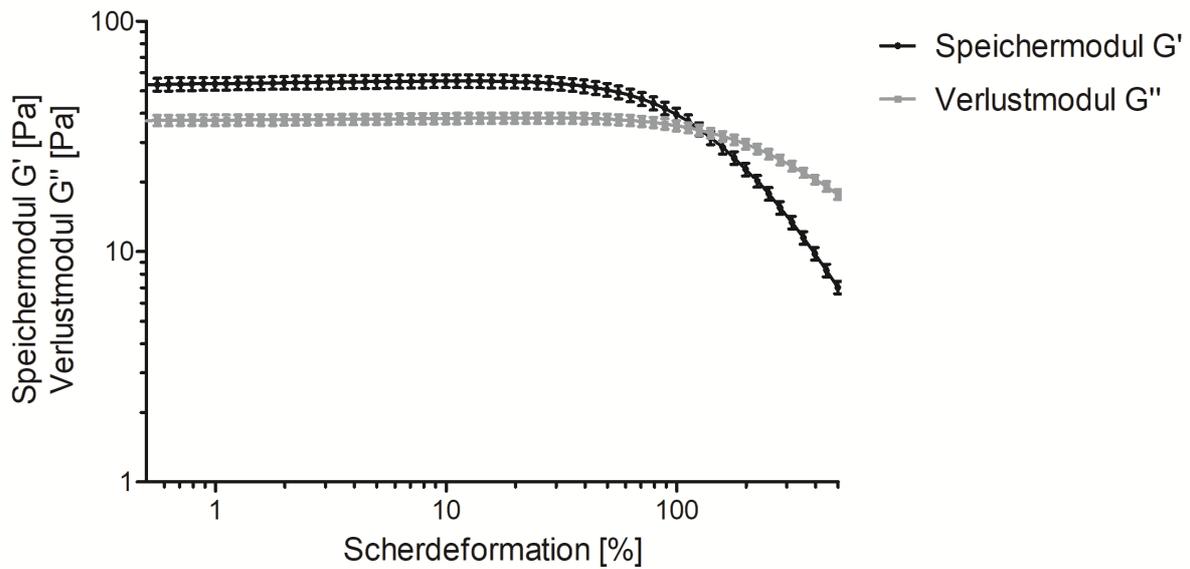


Abbildung 24: Amplitudensweep des Hydrogels 3 an Tag 1 der Lagerungsstabilität, 24 Stunden nach der Herstellung, Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (MW \pm SD; n = 3), Hydrogel 3 = 1,0 % VLMW-HA, 1,0 % HMW-HA, Kreisfrequenz = 10 rad/s, Messtemperatur = 25 °C, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt 500 μ m

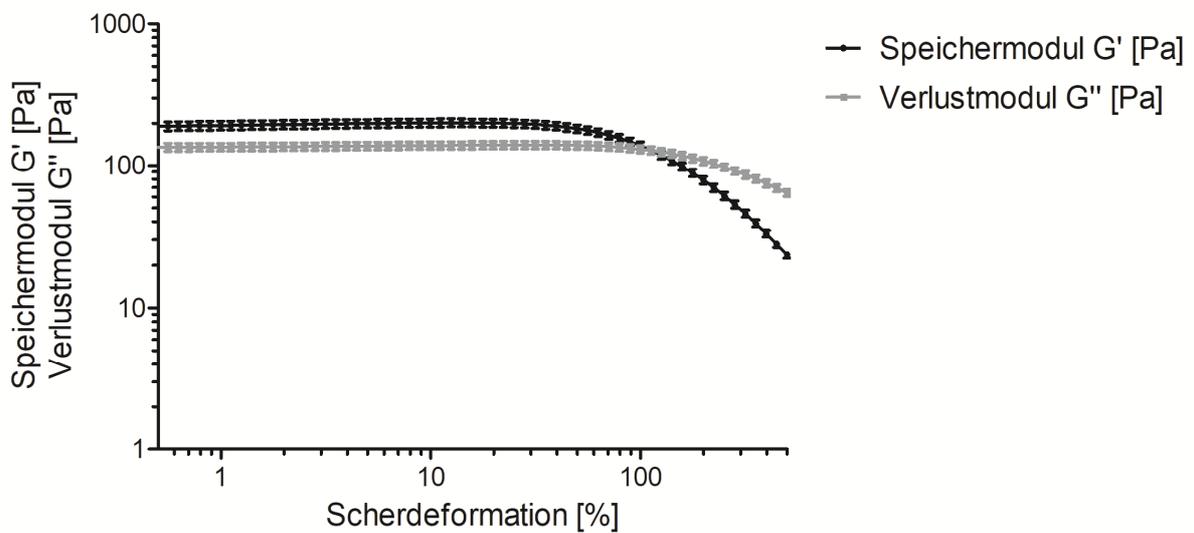


Abbildung 25: Amplitudensweep des Hydrogels 4 an Tag 1 der Lagerungsstabilität, 24 Stunden nach der Herstellung, Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (MW \pm SD; n = 3), Hydrogel 4 = 1,0 % LMW-HA, 1,5 % SMW-HA, Kreisfrequenz = 10 rad/s, Messtemperatur = 25 °C, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt 500 μ m

Bestimmung des linear-viskoelastischen Bereichs

Beide Hydrogele zeigen über einen sehr großen Scherdeformationsbereich einen Plateauwert für den Speichermodul G' . Der LVEB von HG 3 betrug über den gesamten Untersuchungszeitraum temperaturunabhängig 0,5 % bis 35,20 % Scherdeformation. Auch HG 4 zeigte einen sehr ausgeprägten LVEB. Zum Startzeitpunkt der Stabilitätsuntersuchung betrug dieser 0,5 % bis 39,60 % Scherdeformation. Nach einmonatiger Lagerung (25 °C, 60 %rH und 40 °C, 75 %rH) konnte eine geringe Verkürzung des LVEB auf 0,5 % bis 35,20 % Scherdeformation beobachtet werden (Tabelle 30). Über den gesamten Messzeitraum konnten alle Frequenz- und Temperatursweeps bei einer Scherdeformation von 5 % durchgeführt und somit ein scherbedingtes Zerstören der Messprobe ausgeschlossen werden.

Bestimmung der Gelstärke

Die Gelstärke von HG 3 unterlag einer temperaturabhängigen Abnahme nach einmonatiger Lagerung (Tabelle 29). Überraschenderweise war der Verlust der Gelstärke bei den Proben, die bei der höchsten Temperatur (40 °C, 75 %rH) lagerten, am geringsten ausgeprägt. Auch für HG 4 konnte mit ansteigender Lagerungstemperatur eine größer werdende Abnahme der Gelstärke für die eingelagerten Proben beobachtet werden (Tabelle 30). Diese Abnahme der Gelstärke in beiden Formulierungen könnte, wie bereits bei HG 2 erörtert, auf einen hydrolytischen Abbau der HA zurückzuführen sein. Die Temperaturabhängigkeit der Abnahme der Gelstärke in HG 4 stimmt dabei sehr gut mit Beobachtungen von Tokita et al. überein (Tokita und Okamoto 1996), die für HA eine erhöhte Hydrolysanfälligkeit bei höheren Temperaturen beobachten konnten. Unabhängig davon ist die Verminderung der Gelstärke in beiden Fällen als Indiz für eine Instabilität zu werten und abschließend mit den Ergebnissen der übrigen rheologischen Messungen zu evaluieren (siehe 3.1.5 „Zwischenfazit: Formulierungsentwicklung und -charakterisierung“).

Bestimmung der Nachgebe- und Fließgrenze

Sowohl bei HG 3 als auch bei HG 4 entspricht der Verlauf der Nachgebe- und Fließgrenze über den Lagerungszeitraum dem Verlauf der Gelstärke der Formulierungen. Im Fall von HG 3 bedeutet dies ein Absinken der Nachgebe- und Fließgrenze, das bei 5 °C und 25 °C, 60 %rH ausgeprägter war als bei den Proben, die bei 40 °C, 75 %rH gelagert wurden. Auch HG 4 wies, analog zu den Ergebnissen der Gelstärke, erneut eine temperaturabhängige Abnahme der Nachgebe- und Fließgrenze auf. Die Werte der Nachgebegrenzen beider Hydrogele sind mit denen handelsüblicher Bodylotions (15 bis 35 Pa) zu vergleichen (Yao und Patel 2001), sodass eine gute Spreitbarkeit der Formulierungen sichergestellt ist.

Bestimmung des Fließübergangsindex

Die Fließübergangsindices (Tabelle 29, Tabelle 30) beider Formulierungen liegen deutlich oberhalb des von Mezger empfohlenen Wertes (> 1) (Mezger 2016), sodass das Risiko für einen Spröbruch für beide Formulierungen als sehr gering eingestuft werden kann.

Frequenzsweep

Bei beiden Hyaluronsäuregele dominiert bis zu einer Frequenz von ca. 3 rad/s der Verlustmodul G'' über den Speichermodul G' , erst danach überwiegt das elastische Verhalten (Abbildung 26, Abbildung 27, Anhang XI: Abbildung 124 bis Abbildung 127, Anhang XII: Abbildung 136 bis Abbildung 139). Das bedeutet, dass sich die Hyaluronsäuregele im Bereich sehr niedriger Frequenzen wie eine unvernetztes Polymerlösung verhalten und erst ab dem Schnittpunkt von G' und G'' ein zusammenhängendes Gelnetzwerk vorliegt. Dies kann anhand des Verschlaufungsmodells erklärt werden (Mezger 2016). Die unvernetzten Hyaluronsäurepolymere liegen im Ruhezustand in dreidimensionalen, kugelförmigen Strukturen vor. Bei niedrigen Frequenzen ist die Struktur des Polymer-Verschlaufungsnetzwerks somit sehr flexibel, sodass durch die Relativbewegungen der Moleküle mehr Deformationsenergie durch Umwandlung in Reibungswärme dissipiert (G'') als in der Struktur gespeichert werden kann (G') (Mezger 2016). Im niedrigen Frequenzbereich dominiert daher ein viskoses Verhalten ($G'' > G'$). Mit steigender Frequenz kommt es zur partiellen Entschlafung, sodass das aufgebaute Verschlaufungsnetzwerk immer instabiler wird. Die Makromoleküle werden in ihrer Relativbewegung zunehmend eingeschränkt und es kann mehr Deformationsenergie gespeichert werden, als durch Reibung verloren geht. Daher dominiert zunehmend das elastische Verhalten (G'). Dies erklärt auch, das frequenzabhängige Ansteigen der Messkurven der Rheogramme beider Hydrogele. Die Nullviskosität/dynamische Viskosität ($|\eta^*|$) kann in solchen Fällen herangezogen werden, um die Viskosität der Polymermischung im Ruhezustand (bei Frequenzen von 0,1 rad/s und kleiner) zu ermitteln. Hier zeigt sich ein deutlicher Unterschied zwischen HG 3 und HG 4 (Tabelle 31). Während die dynamische Viskosität von HG 3 zu Beginn der Stabilitätsuntersuchungen einen Wert von ca. 50 Pa·s aufweist, betrug die dynamische Viskosität von HG 4 ca. 250 Pa·s. Das bedeutet, dass HG 4 im Ruhezustand deutlich viskoser ist. Für die Einarbeitung eines Wirkstoffs kann dies entscheidend sein, da Gele mit niedrigen Ruheviskositäten zu Wirkstoffsedimentation neigen können.

Im Verlauf der Lagerung nimmt die Viskosität beider Hydrogele in einem Umfang ab, der sich erneut mit den Ergebnissen des Amplitudensweeps deckt (Temperaturabhängigkeit bei HG 4, stärkster Effekt bei HG 3 bei 25 °C). Dies wird als ein weiteres Indiz für eine Hydrolyse der Hyaluronsäuremoleküle in den Formulierungen angesehen. Da G' nicht über den gesamten Messbereich über G'' dominiert, wurde für beide Formulierungen auf eine Bestimmung des Verlustfaktors verzichtet.

Tabelle 31: Verlauf der dynamischen Viskosität von Hydrogel 3 und 4 $|\eta^*|$ [Pa · s] zu Beginn der Stabilitätsstudie und nach einmonatiger Lagerung bei verschiedenen Temperaturen; Frequenz = 0,1 rad/s; alle Daten als Mittelwert \pm Standardabweichung (n = 3)

Zeitpunkt	dynamische Viskosität	
	Hydrogel 3	Hydrogel 4
Tag 1	50,81 \pm 20,08	252,47 \pm 97,26
1 Monat 5 °C	29,86 \pm 14,04	195,86 \pm 59,14
1 Monat 25 °C, 60% rH	21,88 \pm 09,67	181,20 \pm 56,03
1 Monat 40 °C, 75% rH	33,81 \pm 18,22	134,89 \pm 49,01

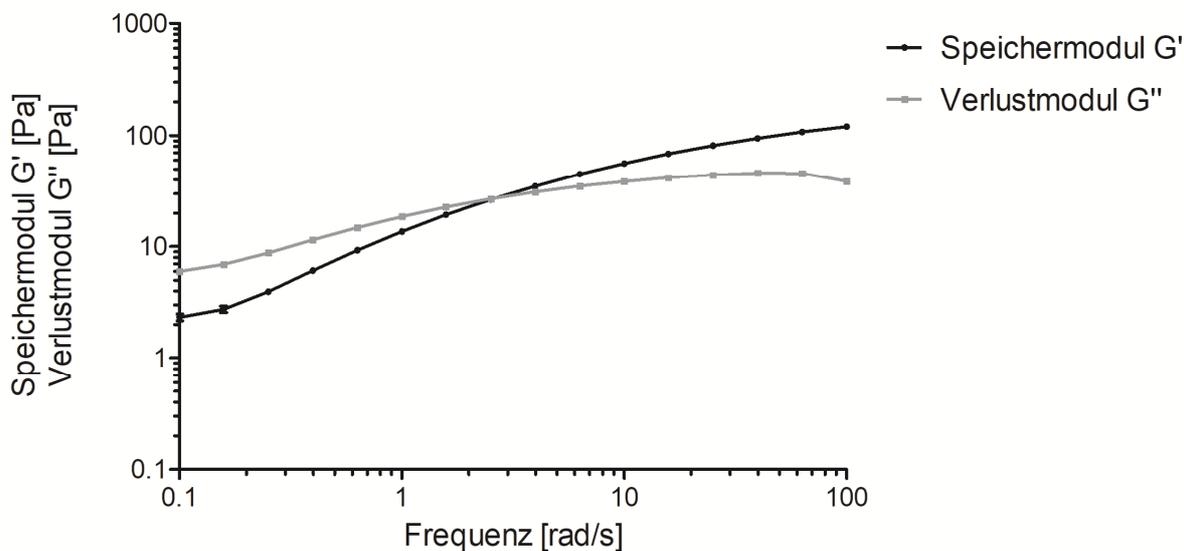


Abbildung 26: Frequenzsweep des Hydrogels 3 an Tag 1 der Lagerungsstabilität, 24 Stunden nach der Herstellung, Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa ($MW \pm SD$; $n = 3$), Hydrogel 3 = 1,0 % VLMW-HA, 1,0 % HMW-HA, Scherdeformation = 5,0 %, Messtemperatur = 25 °C, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt 500 μm

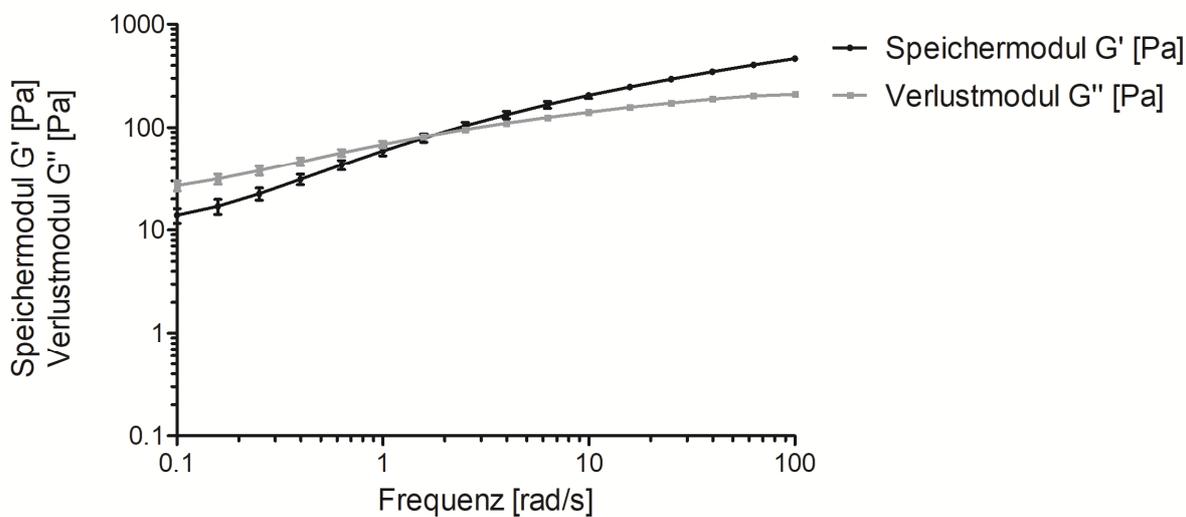


Abbildung 27: Frequenzsweep des Hydrogels 4 an Tag 1 der Lagerungsstabilität, 24 Stunden nach der Herstellung, Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa ($MW \pm SD$; $n = 3$), Hydrogel 4 = 1,0 % LMW-HA, 1,5 % SMW-HA, Scherdeformation = 5,0 %, Messtemperatur = 25 °C, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt 500 μm

Temperatursweep

Sowohl zu Beginn der Untersuchungen als auch nach einmonatiger Lagerung dominiert in HG 3 und 4 elastisches Verhalten ($G' > G''$, Abbildung 28, Abbildung 29, Anhang XI: Abbildung 128 bis Abbildung 130, Anhang XII: Abbildung 140 bis Abbildung 143). Da in keiner der beiden Formulierungen thermosensitive Gelbildner eingearbeitet wurden, konnte auch kein Sol-Gel Übergang festgestellt werden. Erneut konnte bei HG 3 eine Abnahme der Gelstärke beobachtet werden, die bei einer Lagerung bei 25 °C, 60 %rH am deutlichsten ausgeprägt war. Hydrogel 4 zeigte ebenfalls eine temperaturabhängige Verminderung der Gelstärke bei Hauttemperatur nach der Lagerung (Tabelle 32). Diese Ergebnisse bestätigen die bisherigen Erkenntnisse aus den Amplitudensweep- und Frequenzsweeps.

Tabelle 32: Gelstärke bei Hauttemperatur der Hydrogele 3 und 4, ermittelt mittels Temperatursweep im Temperaturbereich von 32 bis 34 °C, Mittelwert \pm Standardabweichung (n = 3)

Zeitpunkt	Gelstärke [Pa]	
	Hydrogel 3	Hydrogel 4
Tag 1	61,3 \pm 2,8	268,0 \pm 36,6
1 Monat 5 °C	52,2 \pm 5,7	211,1 \pm 17,1
1 Monat 25 °C, 60 %rH	45,6 \pm 5,1	191,8 \pm 13,4
1 Monat 40 °C, 75 %rH	60,5 \pm 3,2	165,0 \pm 10,8

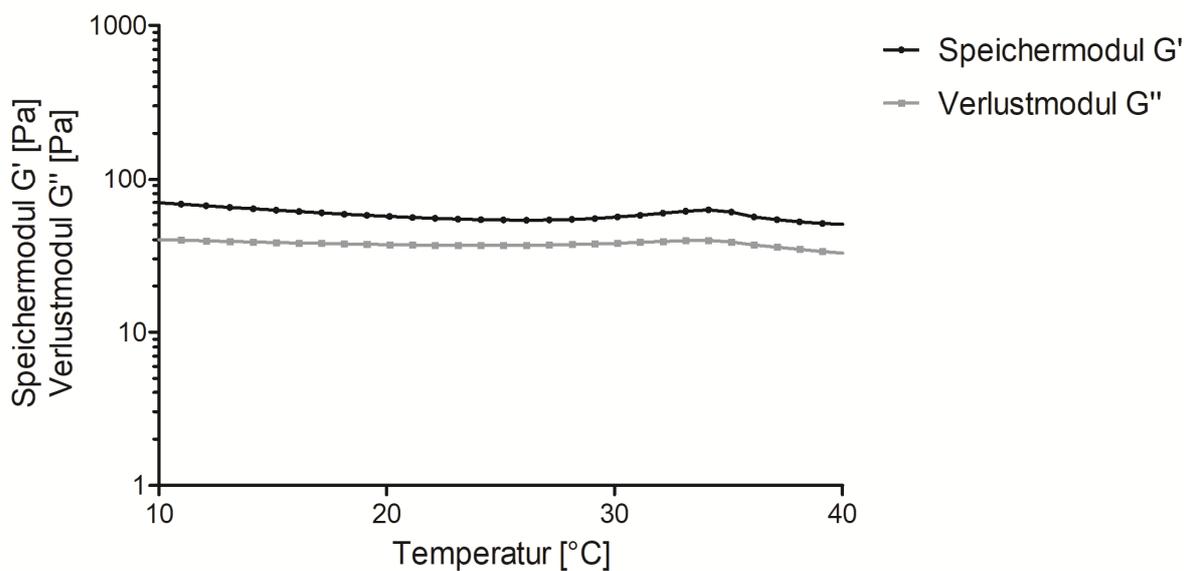


Abbildung 28: Temperatursweep des Hydrogels 3 an Tag 1 der Lagerungsstabilität, 24 Stunden nach der Herstellung, Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa ($MW \pm SD$; $n = 3$), Hydrogel 3 = 1,0 % VLMW-HA, 1,0 % HMW-HA, Scherdeformation = 5,0 %, Kreisfrequenz = 10 rad/s, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt 500 μm

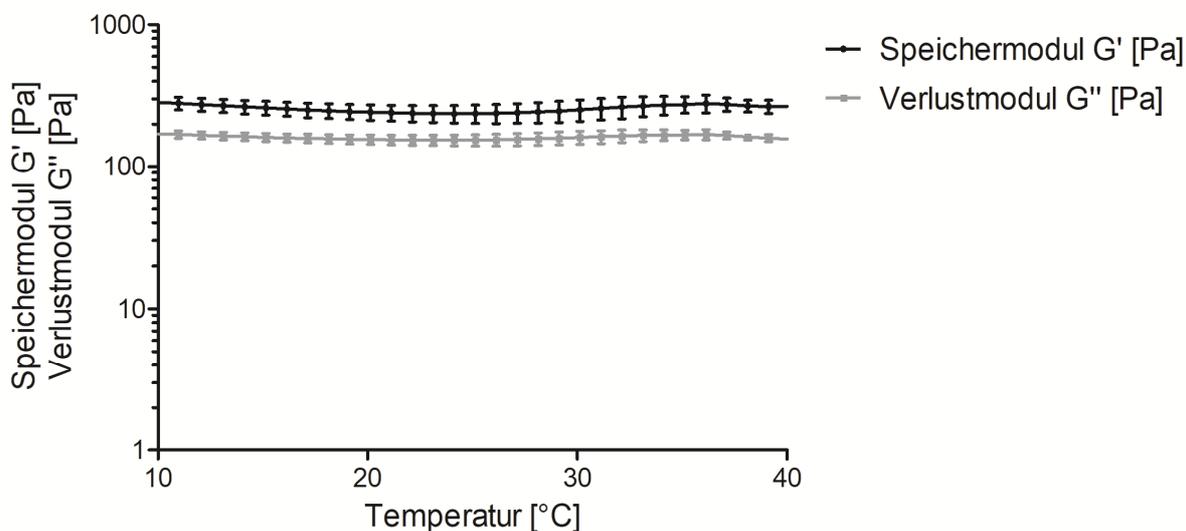


Abbildung 29: Temperatursweep des Hydrogels 4 an Tag 1 der Lagerungsstabilität, 24 Stunden nach der Herstellung, Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa ($MW \pm SD$; $n = 3$), Hydrogel 4 = 1,0 % LMW-HA, 1,5% SMW-HA, Scherdeformation = 5,0 %, Messtemperatur = 25 °C, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt 500 μm

3.1.5 Zwischenfazit: Formulierungsentwicklung und -charakterisierung

Durch Literaturrecherche wurden Rohstoffe ausgewählt, die ein möglichst geringes Risiko für Hautirritationen aufweisen. Auf der Basis dieser Rohstoffe ist es gelungen, eine stabile Mikroemulsion zu entwickeln und mit Hilfe von dynamischer Lichtstreuung und Trübungsmessungen zu charakterisieren. Im Rahmen eines Konservierungsmittelscreenings konnte darüber hinaus auch die Stabilität der Formulierung gegenüber mikrobiellem Befall untersucht und schließlich durch die Kombination von Butylenglykol und Phenoxyethanol sichergestellt werden. Durch die niedrige Viskosität der Formulierung ergeben sich jedoch Einschränkungen im Hinblick auf einen möglichen Applikationsort im Rahmen einer Therapie. Um diesen Nachteil auszugleichen wurden Mikroemulsion-basierte Organogele entwickelt und charakterisiert. Durch ein Screening mit Hilfe rheologischer Untersuchungen konnten geeignete Gelbildnerkombinationen identifiziert und evaluiert werden. Die vielversprechendsten Formulierungen (MBO 16 und MBO 18) wurden anschließend im Rahmen einer Stabilitätsuntersuchung weiterführend untersucht. Dabei wurde eine Instabilität von MBO 18 bei Lagerung unter 40 °C, 75 %rH festgestellt. Im Gegensatz dazu stellte MBO 16 eine lagerungsstabile Formulierung dar. Lichtmikroskopische Aufnahmen beider Formulierungen zeigten jedoch, dass die Struktur der als Grundlage verwendeten Mikroemulsion durch das Einarbeiten der Gelbildner nicht mehr vorhanden war. Auf der Basis der Wasserphase der Mikroemulsion konnten außerdem vier potentiell geeignete Hydrogele entwickelt und charakterisiert werden. HG 1, ein hyaluronsäure-modifiziertes Poloxamergel, erfüllte die Anforderungen an eine stabile Formulierung. Die Hydrogele 2, 3 und 4 hingegen zeigten eine Instabilität, die auf eine Hydrolyse der eingearbeiteten Hyaluronsäuren zurückgeführt werden konnte. Aus diesen Gründen wurde das Penetrationsverhalten von Api m 1 unter Verwendung der entwickelten Mikroemulsion, MBO 16 und HG 1 nachfolgend untersucht.

3.2 Konfokalmikroskopische Penetrationsuntersuchungen

Die Effektivität einer AIT wird üblicherweise *in-vitro* anhand von Änderungen in allergenabhängigen T-Zell-Subpopulationen und Antikörper-Titern beurteilt und in Korrelation zu der Schwere der allergischen Symptome nach einer *in vivo* Stichprovokation gesetzt (Shamji und Durham 2017; van de Veen et al. 2017). Diese Stichprovokationen können in Deutschland jedoch nur in einigen ausgesuchten Allergiezentren erfolgen. In dieser Arbeit wurde daher ein *ex vivo* Schweineohr-Modell genutzt, um mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM) den Einfluss der entwickelten Formulierungen auf das Penetrationsverhalten von Alexa F[®]-647 markiertem Api m 1 zu untersuchen. Schweineohren wurden aufgrund ihrer morphologischen Ähnlichkeit und vergleichbaren Penetrationscharakteristika zu humaner Haut verwendet (Diembeck et al. 1999). Untersucht wurden die finale Mikroemulsion, sowie MBO 16 (1,00 Gew.-% Aerosil[®], 3,75 Gew.-% Alginat) und Hydrogel 1 (18,00 Gew.-% P407, 15,00 Gew.-% P188, 1,00 Gew.-% VLMA-HA). Die Auswahl dieser Formulierungen erfolgte auf der Basis der Ergebnisse, die in Kapitel 3.1 erörtert wurden. Nachfolgend werden die Ergebnisse der Untersuchungen über eine achtstündige und 24-stündige Applikationszeit dargestellt und erläutert.

3.2.1 Penetration von Api m 1 nach achtstündiger Applikationsdauer

Eine Applikationsdauer von acht Stunden wurde gewählt, da sie in etwa der empfohlenen Schlafdauer eines Erwachsenen entspricht (Hirshkowitz et al. 2015). Ein mögliches Produkt, basierend auf einer der entwickelten Formulierungen, könnte im Rahmen einer AIT ggf. vor dem Schlafengehen aufgetragen werden und dann über die Schlafdauer einwirken. Eine Gegenüberstellung repräsentativer CLSM-Aufnahmen und statistischer Auswertung der erhaltenen Messwerte ist in Abbildung 30 dargestellt. Die in dunklem Rosa leuchtenden Bereiche stellen fluoreszenzmarkiertes Allergen dar. Das Fehlen dieses Fluoreszenzsignals weist auf das nicht Vorhandensein von Allergen hin. Das Fluoreszenzsignal ist bei allen Formulierungen im *Stratum corneum* am stärksten ausgebildet.

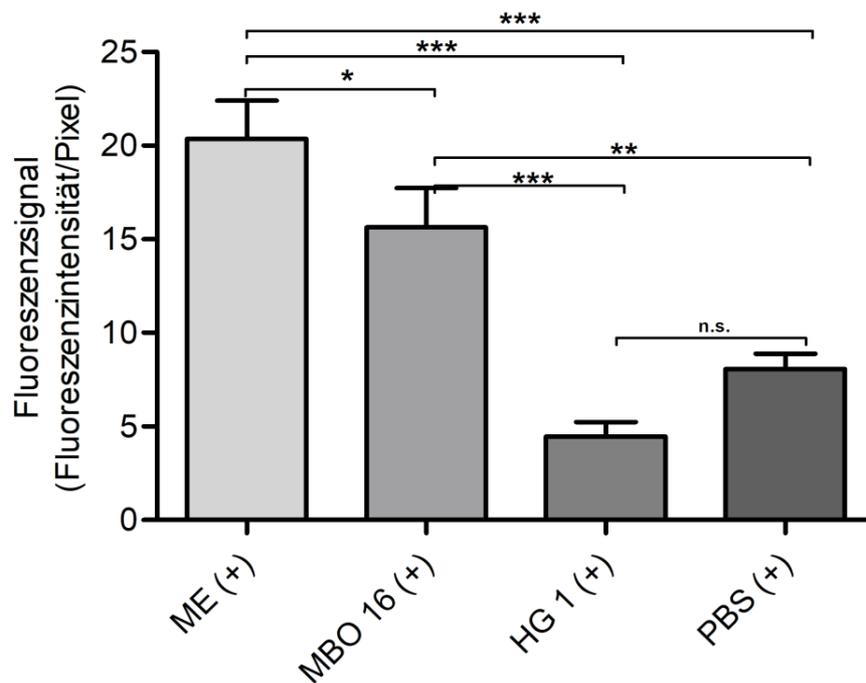
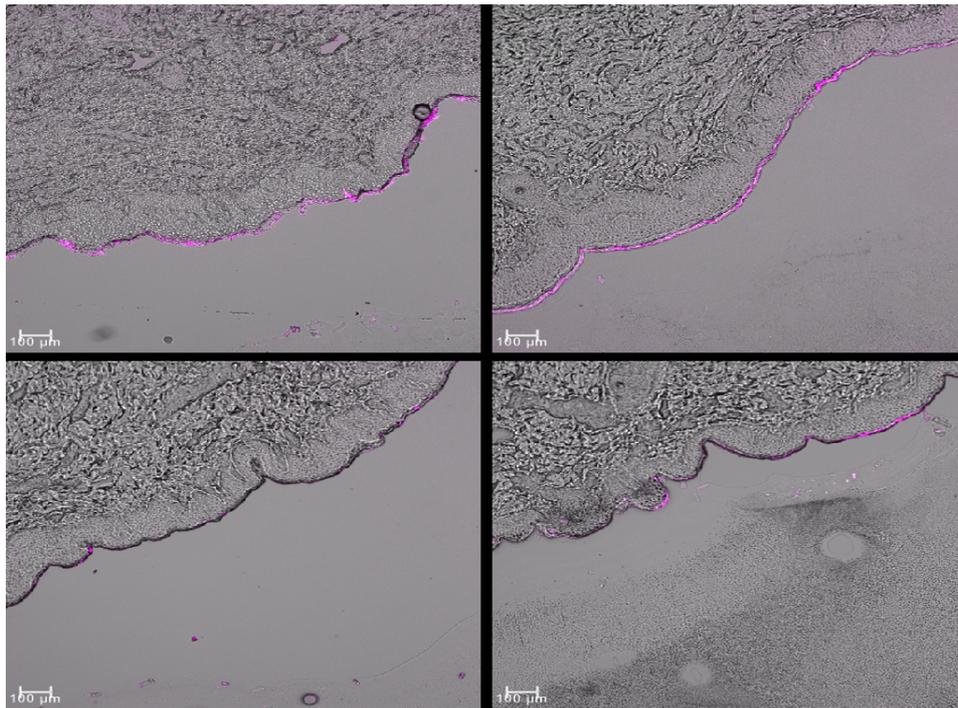


Abbildung 30: Überlagerte CLSM-Bilder aus Fluoreszenzsignal und Durchlichtbild der vertikalen Kryoschnitte der Schweineohr-Proben nach achtstündiger Applikationsdauer und deren statistische Auswertung; obere Reihe: Mikroemulsion mit Allergen (ME (+)), Mikroemulsion-basiertes Organogel 16 mit Allergen (MBO 16 (+)), untere Reihe: Hydrogel 1 mit Allergen (HG 1 (+)) und PBS mit Allergen (PBS (+)); Graph: Spektralauswertung der CLSM-Bilder präsentiert als MW \pm SD, n = 3 für ME (+), MBO 16 (+) und HG 1 (+); n = 2 für PBS (+), Auf Signifikanz (*) wurde mittels einseitigem ANOVA gefolgt von einem Tukey-Test getestet ($p < 0,05$).

Nach achtstündiger Applikationsdauer konnte ein sehr schwaches Fluoreszenzsignal von $8,07 \pm 0,81$ Fluoreszenzintensität/Pixel für die wirkstoffbeladenen PBS-Proben (PBS (+)) detektiert werden. Dies deutet die Penetration geringer Mengen fluoreszenzmarkierten Allergens in die Haut an. Aufgrund des Fehlens penetrationsfördernder Substanzen im PBS-Puffer, ist diese Penetration auf eine erhöhte Hydratation des *Stratum corneum* zurückzuführen. Eine erhöhte Hydratation lockert die kompakte Struktur der Hornschicht auf (Menon et al. 1994) und fördert auf diesem Weg im Allgemeinen das Eindringen einer Vielzahl von Substanzen in die Haut (Barry 2001). Für die mit wirkstoffhaltiger Mikroemulsion (ME (+)) bzw. wirkstoffhaltigem MBO 16 (MBO 16 (+)) behandelten Proben, konnte ein Fluoreszenzintensität/Pixel-Verhältnis von $20,73 \pm 2,04$ (ME (+)) und $15,63 \pm 2,12$ (MBO 16 (+)) detektiert werden. Beide Formulierungen ermöglichten somit signifikant größeren Mengen an fluoreszenzmarkiertem Allergen in die Haut zu penetrieren, verglichen mit den Hydrogel- und PBS-Proben. Um den großen Unterschied zwischen MBO 16 und Mikroemulsion mit den PBS-Proben einerseits und den signifikanten Unterschied zwischen MBO 16 und der Mikroemulsion andererseits zu begründen, muss der penetrationsfördernde Einfluss der ME und des MBO auf Wirkstoffe (verglichen mit wässrigen Lösungen) und der allgemeine Penetrationsprozess von Substanzen in die Haut betrachtet werden. Mikroemulsionen können die Löslichkeit von Wirkstoffen in der Haut und die Hauthydratation erhöhen, die Lipidbarriere des *Stratum corneum* stören und die Beweglichkeit von Substanzen in oder durch die Haut verbessern (Benson 2005; Kreilgaard 2002; Lopes 2014; Williams und Barry 2012). Verantwortlich dafür sind penetrationsfördernde Substanzen, sogenannte Penetrationenhancer, die in einer Mikroemulsion eingearbeitet sind. Diese Penetrationenhancer fördern das Eindringen von Wirkstoffen in die Haut durch verschiedenste Mechanismen. Eine grobe Klassifikation ist jedoch mittels des „lipid-protein-partitioning“-Konzeptes möglich (Barry 1991). Diesem Konzept folgend können Penetrationenhancer die Organisation der Lipide im *Stratum corneum* stören („Lipid action“), in dem sie die kompakte Struktur der Doppellipidschicht durch Molekülschwingungen, Rotation, Translokation und Bildung von Mikrokavitäten aufbrechen und somit den Diffusionskoeffizienten des Wirkstoffs in die Haut stark erhöhen. Dieser Effekt wurde für sehr viele Enhancer beobachtet, darunter Fettsäuren, Fettsäureester und Polymere.

Der penetrationsfördernde Mechanismus von Labrasol® (Caproylocaproyl macrogol-8-glyceride) wurde für eine dermale Applikation noch nicht erforscht. Dessen Eigenschaft als Enhancer generell ist jedoch bekannt (Prasad et al. 2003; Caddeo et al. 2012) und für die corneale Applikation bereits erforscht (Guo et al. 2018). Auf der Basis dieser Studien und der chemischen Struktur von Labrasol® könnte dessen Penetrationsförderung ebenfalls über eine Störung der Lipidorganisation in der Membran erfolgen. Des Weiteren sind Penetrationenhancer in der Lage die chemische Umgebung des *Stratum corneum* so zu verändern, dass der Partitionskoeffizient von Wirkstoffen oder anderen Enhancern erhöht wird („Partitioning promotion“). Dieser Mechanismus wird vor allem für Alkohole und Glykole, wie z.B. das in dieser Arbeit verwendete Butylenglykol beobachtet und führt häufig zu synergistischen Effekten mit anderen Surfactants (Williams und Barry 2012). Die dritte Möglichkeit der Penetrationsförderung durch Penetrationenhancer beruht auf der Modifikation der Membranproteine der Keratinozyten des *Stratum corneum* („Protein modification“), was wiederum zu einer Förderung des transzellulären Wirkstofftransports führt. Vor allem ionische Surfactants können auf diesem Wege wirken. Diese wurden in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht verwendet. Unter der Annahme, dass nach einiger Zeit „Steady-State“-Bedingungen vorliegen, kann die Penetration von Stoffen durch oder in die Haut allgemein als Diffusion einer Substanz durch eine passive Membran (in diesem Fall das *Stratum corneum*) betrachtet werden (Williams und Barry 2012; Hadgraft 2001).

Der Penetrationsprozess kann dann anhand einer modifizierten Gleichung des 1. Fick'schen Diffusionsgesetzes erklärt werden (Hadgraft 2001; Williams und Barry 2012):

$$\frac{dm}{dt} = \frac{D \cdot C_o}{h} ,$$

Formel 6: 1. Fick'sches Diffusionsgesetz

mit der Menge an freigesetztem Wirkstoff in einer bestimmten Zeitperiode (dm/dt), der Konzentration an freigesetztem Wirkstoff im *Stratum corneum* C_o , der Dicke der genutzten Membran, bzw. der Dicke des Hautschnittes h und dem Diffusionskoeffizienten des freizusetzenden Wirkstoffs D .

Da die Konzentration des freigesetzten Wirkstoffs im *Stratum corneum* oftmals nicht vermessen werden kann (so auch in dieser Arbeit), verwendet man dafür häufiger die Konzentration des freizusetzenden Wirkstoffs in der gewählten Formulierung (C'_o). Der Partitionskoeffizient des Wirkstoffs zwischen Formulierung und *Stratum corneum* dient als Proportionalitätsfaktor (P), sodass sich folgende Modifikation von Formel 6 ergibt (Williams und Barry 2012):

$$\frac{dm}{dt} = \frac{D \cdot C'_o \cdot P}{h}$$

Formel 7: Modifikation des 1. Fick'schen Diffusionsgesetzes

Da P, h und C'_o durch die gewählten Versuchsbedingungen (infinite-dose) während der gesamten Versuchsdauer als konstant angesehen werden können, ergibt sich, dass die Penetration des Wirkstoffs aus der Formulierung maßgeblich vom Diffusionskoeffizienten von $A \cdot m^{-1}$ abhängig ist.

Der Diffusionskoeffizient D ist generell von verschiedenen Faktoren abhängig, was wie folgt beschrieben werden kann:

$$D = \frac{R \cdot T}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r \cdot N}$$

Formel 8: Modifikation der Stokes-Einstein-Gleichung zur Bestimmung des stoffspezifischen Diffusionskoeffizienten

mit D = Diffusionskoeffizient, R = allgemeine Gaskonstante, T = Temperatur, η = Viskosität der Formulierung, r = hydrodynamischer Radius des Wirkstoffs in der Formulierung und N = Loschmidt-Konstante.

Daraus wird ersichtlich, dass mit steigender Viskosität der Formulierung und mit ansteigendem hydrodynamischem Radius des Wirkstoffs in der Formulierung der Diffusionskoeffizient kleiner wird. Dies hat zur Folge, dass weniger Wirkstoffmoleküle pro Zeiteinheit an die Grenzfläche von Formulierung und Haut gelangen und dort in die Haut penetrieren können. Die entwickelte Mikroemulsion zeigte das rheologische Verhalten eines Newton'schen Fluids, wohingegen MBO 16 ein Gelgerüst mit einer Stärke von $473,0 \pm 67,0$ Pa bei Hauttemperatur aufweist (vgl. 3.1.2.2 „Rheologische Untersuchungen der Stabilität der Mikroemulsion-basierten Organogele“, Unterkapitel „Gelstärke bei Hauttemperatur“).

Es kann vermutet werden, dass die stark erhöhte Penetration von Api m 1 aus Mikroemulsion in die Haut sowohl auf einem verbesserten Diffusionskoeffizienten von Api m 1 aus der Formulierung in die Haut als auch einem besseren Partitionskoeffizienten von Api m 1 in der Haut beruht. Da sich die Formulierungen der Mikroemulsion und MBO 16 lediglich durch das Vorhandensein, bzw. Fehlen der Gelbildner Aerosil® und Alginat voneinander unterscheiden, kann geschlussfolgert werden, dass die erhöhte Mobilität von Api m 1 in der Mikroemulsion die Ursache für den geringen, jedoch signifikanten Unterschied der Penetration von Api m 1 zwischen beiden Formulierungen sein muss. Obwohl HG 1 ebenfalls penetrationsfördernde Substanzen beinhaltet (Glycerol, Butylenglykol, VLMW-HA, Poloxamer), konnte keine gesteigerte Penetration von Api m 1 in die Haut detektiert werden. Mit einem Fluoreszenzintensität/Pixel-Signal von $4,47 \pm 0,76$ fiel die Penetration von Api m 1 sogar geringer aus als bei den PBS (+)-behandelten Proben. Es konnte jedoch keine Signifikanz festgestellt werden (Abbildung 30). Auf der obigen Diskussion aufbauend, ergibt sich auch hier ein Zusammenhang zwischen der Gelstärke der Formulierungen, der Mobilität des Wirkstoffs in diesen und den Penetrationenhancer. Die entwickelte Mikroemulsion zählt, wie auch PBS, zu den newton'schen Fluiden, in denen sich Api m 1 frei bewegen kann. Die Gelstärke von HG 1 ($10.450,8 \pm 817,2$ Pa) bei Hauttemperatur ist deutlich größer als die von MBO 16 ($473,0 \pm 67,0$ Pa). Eine erhöhte Gelstärke entspricht generell einem dichter gepackten Gelgerüst, sodass möglicherweise eine verminderte Mobilität des Wirkstoffs und der Surfactants in HG 1 verglichen mit MBO 16 vorlag. Daher kann geschlussfolgert werden, dass die Penetration von Api m 1 aus dem Hydrogel aufgrund zu geringer Mobilität von Api m 1 in der Formulierung (kleiner Diffusionskoeffizient) nicht ausreichend war und daher sogar unterhalb des Niveaus der PBS-Proben lag.

3.2.2 Penetration von Api m 1 nach 24-stündiger Applikationsdauer

Um zu untersuchen, ob eine prolongierte Applikationsdauer einen positiven Einfluss auf das Penetrationsverhalten von Api m 1 hat, wurde ein erneutes Penetrationsexperiment mit einer Applikationsdauer von 24 Stunden durchgeführt. Aufgrund der stärksten Penetrationsförderung im vorherigen Experiment (achtstündige Applikationsdauer), wurde die Mikroemulsion ausgewählt. Als Kontrollgruppen fungierten neben wirkstofffreier Mikroemulsion (ME (-)) sowohl wirkstofffreier- (PBS (-)) als auch wirkstoffbeladener PBS (PBS (+)). Eine Gegenüberstellung repräsentativer CLSM-Aufnahmen und statistischer Auswertung der erhaltenen Messwerte ist in Abbildung 31 dargestellt (Kiselman et al. 2018). Die Proben, die mit PBS (-), bzw. ME (-) beladen wurden, zeigten ein sehr ähnliches Fluoreszenzintensität/Pixel-Signal von $5,06 \pm 0,94$ (PBS (-)), bzw. $5,21 \pm 1,19$ (ME (-)) (Kiselman et al. 2018). Da es sich jeweils um wirkstofffreie Formulierungen handelt, ist das detektierte Fluoreszenzsignal auf Autofluoreszenzeffekte der Haut zurückzuführen, welche bereits in der Literatur beschrieben wurden (Alvarez-Román et al. 2004; Maeder et al. 2012). Aufgrund des geringen, nicht signifikanten Unterschieds (Daten nicht gezeigt) zwischen den Ergebnissen beider Placeboformulierungen, ist zur besseren Übersicht in Abbildung 31 lediglich Placebo ME (ME (-)) als Referenz dargestellt. Erneut konnte für die mit wirkstoffhaltiger Mikroemulsion (ME (+)) behandelten Proben ein sehr starkes Fluoreszenzsignal in der oberen Epidermis detektiert werden. Die mit wirkstoffhaltigem PBS behandelten Proben (PBS (+)) wiesen ein signifikant schwächeres Fluoreszenzsignal auf (Kiselman et al. 2018). In Zahlen ausgedrückt, ergibt sich ein Messwert von $130,60 \pm 19,79$ (Fluoreszenzintensität/Pixel) für ME (+) und $56,58 \pm 29,94$ (Fluoreszenzintensität/Pixel) für PBS (+) (Kiselman et al. 2018). Verglichen mit den Messwerten des achtstündigen Penetrationstests entspricht dieses Ergebnis einer ca. sechsfachen Steigerung der Penetration von Api m 1 über einen vierfach verlängerten Penetrationszeitraum. Dies zeigt, dass es durch eine verlängerte Applikationsdauer möglich ist, größere Mengen an Api m 1 in die Epidermis penetrieren zu lassen. Ein mögliches Produkt könnte demnach durch eine verlängerte Applikationsdauer oder wiederholte Anwendungen die benötigte Menge an Allergen dermal zur Verfügung zu stellen.

Auch im vorliegenden Fall ist die Penetrationssteigerung der Mikroemulsion im Vergleich zu PBS auf den Einfluss der Diffusions- und Partitionskoeffizienten von Api m 1 in die Haut zurückzuführen.

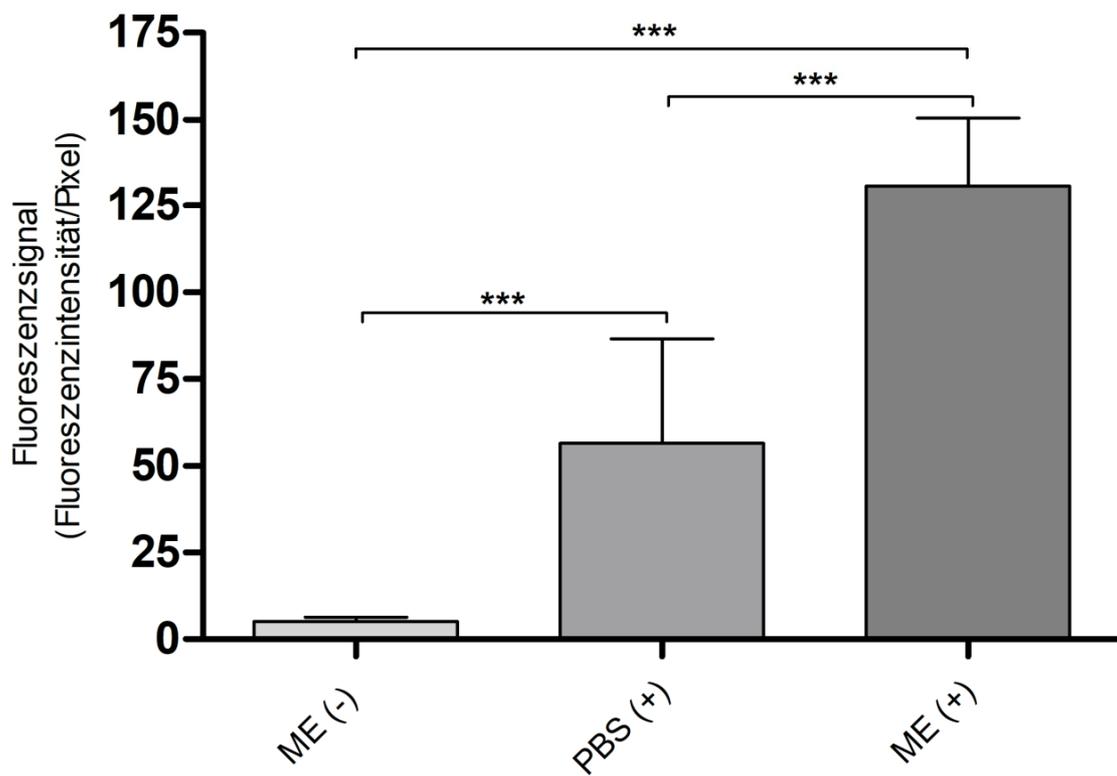
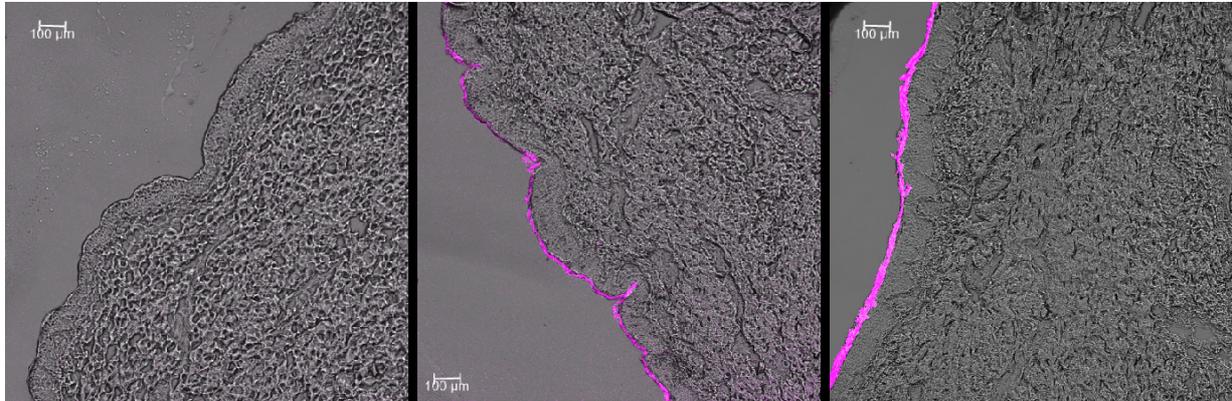


Abbildung 31: Überlagerte CLSM-Bilder aus Fluoreszenzsignal und Durchlichtbild der vertikalen Kryoschnitte der Schweineohr-Proben nach 24-stündiger Applikationsdauer und deren statistische Auswertung; oben: Mikroemulsion ohne Allergen (ME (-)), PBS mit Allergen (PBS (+)), Mikroemulsion mit Allergen (ME (+)); unten: Daten der Spektralauswertung der CLSM-Bilder präsentiert als MW \pm SD (n = 4), auf Signifikanz (*) wurde mittels einseitigem ANOVA gefolgt von einem Tukey Test getestet ($p < 0,05$). (Kiselmann et al. 2018)

3.2.3 Zwischenfazit der Penetrationsuntersuchungen

Es ist gelungen eine Mikroemulsion zu entwickeln, die in der Lage ist zeitabhängig das Modellallergen Api m 1 in die Haut penetrieren zu lassen. Auch MBO 16 ermöglichte die Penetration von Api m 1 in die Haut, jedoch war die Gesamtmenge an penetriertem Allergen in den Mikroemulsionsproben signifikant größer. Das HG 1 hingegen ist für eine dermale Applikation von Api m 1 ungeeignet, da die Menge an penetriertem Allergen in etwa derjenigen der wirkstoffhaltigen PBS-Proben entsprach. Eine mögliche Ursache dafür ist eine zu geringe Mobilität des Wirkstoffs in der Formulierung. Das detektierte Fluoreszenzsignal war, unabhängig von der getesteten Galenik, hauptsächlich auf die oberste epidermale Schicht, genauer das *Stratum corneum* beschränkt. In einigen der mit Mikroemulsion behandelten Hautproben konnte jedoch nach 24-stündiger Applikation auch ein schwaches Fluoreszenzsignal unterhalb des *Stratum corneum* gemessen werden. Denkbar wäre die Bildung eines Api m 1 Depots innerhalb des *Stratum corneum*, aus welchem über die Zeit Wirkstoff an tiefer gelegene Hautschichten abgegeben werden könnte (Kiselman et al. 2018). Solche Depots wurden bereits von Hadgraft in einem theoretischen Ansatz, basierend auf einem mathematischen Modell, beschrieben (Hadgraft 1979). Auch Ongpipattanakul et al. haben die Bildung solcher Depots für Ölsäure beschrieben (Ongpipattanakul et al. 1991). Die Autoren zeigten, dass Ölsäure eine separate Phase innerhalb des *Stratum corneum* bilden kann. Analog dazu könnte auch der in dieser Arbeit verwendete Ölsäurediester Plurol oleique® ein epidermales Depot für Api m 1 erschaffen. Um die Ergebnisse aus den Penetrationstestungen mit einem klinischen Outcome und immunologischen Veränderungen im Körper zu assoziieren, verwendeten Schuppe et al. (Schuppe et al. 2018) die entwickelte Mikroemulsion in einem Api m 1-allergischen Mausmodell. Die Versuchstiere konnten dosisabhängig vor Anaphylaxien nach durchgeführter Stichprovokation geschützt werden. Dies konnten die Autoren mit einem Anstieg der Anzahl an Api m 1-spezifischen IgG AK assoziieren. In einer vorherigen Studie von Möbs et al. (Möbs et al. 2015) konnte demonstriert werden, dass eine Allergentoleranz von dieser Antikörper-Subklasse herbeigeführt wird.

Diese Ergebnisse bestätigen das in dieser Arbeit formulierte Postulat, dass die entwickelte Mikroemulsion in der Lage ist, für eine induzierte Immuntoleranz ausreichende Mengen an Allergen auch in tiefere Hautschichten penetrieren zu lassen, obwohl das dabei entstehende Signal vermutlich zu schwach ist, um mit den verwendeten Analysegeräten detektiert zu werden. Es kann daher trotzdem geschlossen werden, dass die entwickelte Mikroemulsion potentiell im Rahmen einer AIT eingesetzt werden könnte.

3.3 Entwicklung einer Api m 1 Analytik

Die Ergebnisse der vorherigen Kapitel zeigen, dass die entwickelte Mikroemulsion, aufgrund ihrer physikochemischen Stabilität und der Penetrationsförderung von Api m 1, die potentiell geeignetste Formulierung für den in dieser Arbeit verfolgten Ansatz einer dermalen AIT darstellt. Das nachfolgende Kapitel beschreibt die Entwicklung einer HPLC-Analytik für Api m 1 und einer Extraktion des Allergens aus der entwickelten Mikroemulsion. Im Anschluss an die erfolgreiche Methodenentwicklung erfolgte die Bestimmung wichtiger Validierungsparameter, wie Spezifität, Robustheit und Wiederfindung.

3.3.1 Entwicklung einer RP-HPLC Methode

In der Literatur findet man diverse HPLC-Methoden zur Bestimmung der einzelnen Komponenten des Bienengiftes aus natürlichem Extrakt (Haghi et al. 2013; Rybak-Chmielewska und Szczêsna 2004; Szókán et al. 1994; Pacakova et al. 1995; Kokot und Matysiak 2009). Zum Stand der Entstehung dieser Arbeit gibt es allerdings noch keine Analyseverfahren, die spezifisch für Api m 1 entwickelt oder optimiert ist. Daher wurde zunächst eine HPLC-Methode entwickelt um Api m 1 aus PBS-Puffer zu analysieren. Als Basis diente eine von Haghi et al. (Haghi et al. 2013) beschriebenen Methode zur Bestimmung von Melittin in Honigbienengift, die in adaptierter Form getestet wurde (Tabelle 33).

Tabelle 33: Modifizierte Gradientenelutionsmethode nach Haghi et al. (Haghi et al. 2013) zur Bestimmung von Api m 1 aus PBS, Acetonitril + 0,1 % TFA (Eluent A), Gereinigtes Wasser + 0,1 % TFA (Eluent B), Flow = 1 ml/min, Säulenofentemperatur = 25 °C, Detektionswellenlänge = 220 nm

Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]
0,0	5,0	95,0
5,0	5,0	95,0
20,0	52,0	48,0
25,0	80,0	20,0
30,0	100,0	0,0
35,0	5,0	95,0
40,0	5,0	95,0

Unter Verwendung dieser Methode wurde nachfolgendes Chromatogramm erhalten (Abbildung 32).

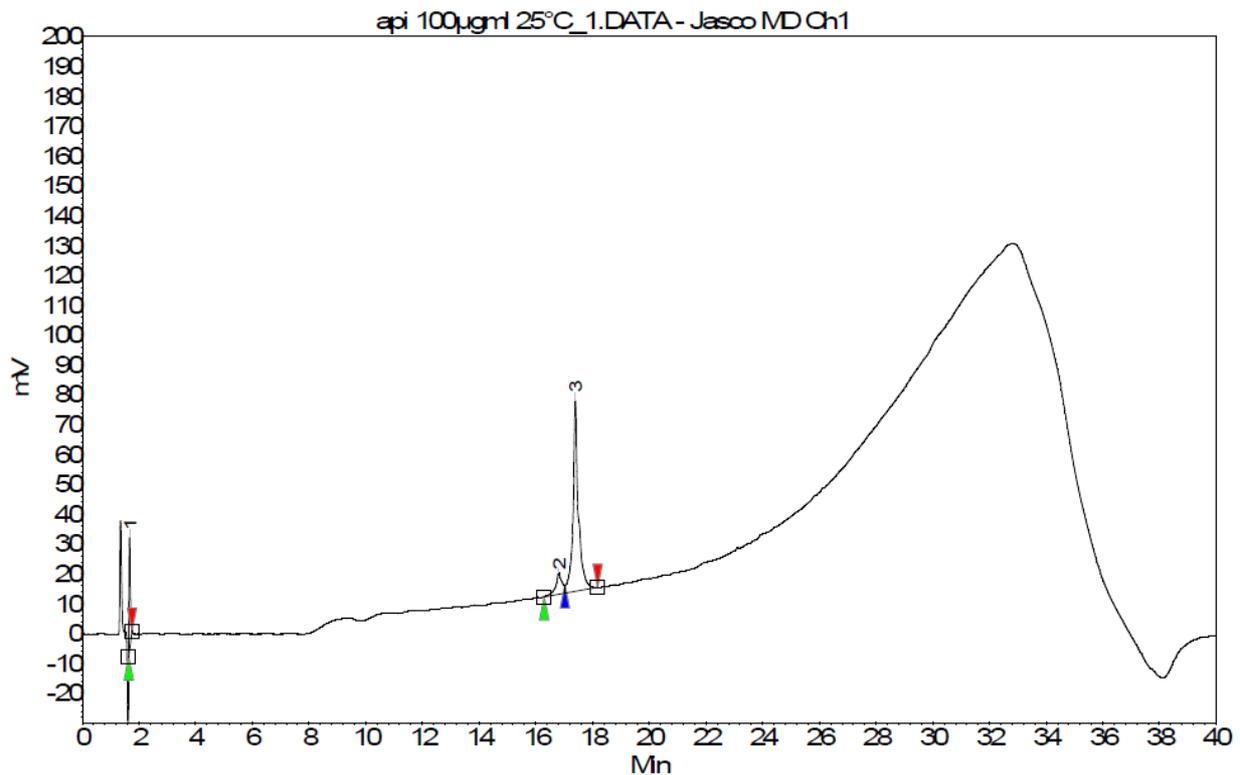


Abbildung 32: Chromatogramm von Api m 1 in PBS ($c = 0,1 \text{ mg/ml}$), Säule: Phenomenex Jupiter® C18 (300 Å, $5 \mu\text{m}$ $100 \times 4,6 \text{ mm}$), Temperatur = $25 \text{ }^\circ\text{C}$, Absorption in Millivolt (mV), Detektionswellenlänge = 220 nm , Flussrate = $1,0 \text{ ml/min}$, Eluent A: Acetonitril + $0,1 \text{ \% TFA}$, Eluent B: Gereinigtes Wasser + $0,1 \text{ \% TFA}$, Gradient (min, %A): (0; 5), (5; 5) (20; 52), (25; 80), (30; 100), (35; 5), (40; 5); Peaks: 1 = Injektionspeak, 2 = Api m 1 Vorpeak, 3 = Api m 1 Hauptpeak

Das Chromatogramm zeigt das typische Verlaufsmuster einer Gradientenelution. Der Anstieg und anschließende Abfall der Baseline ist auf den ansteigenden Anteil von Acetonitril im Elutionsmittel zurückzuführen, da dieses durch eine vorhandene Nitrilgruppe bei einer Detektionswellenlänge von 220 nm ebenfalls eine Absorption aufweist. Der mit (1) gekennzeichnete Peak entspricht dem Injektionspeak. Bei einer Retentionszeit von $16,67 \text{ Minuten}$ konnte ein kleiner Peak detektiert werden, der in Abbildung 32 mit (2) markiert ist. In kurzem Abstand eluierte ein deutlich größerer Peak (3) bei einer Retentionszeit von $16,81 \text{ Minuten}$. Im Nachfolgenden wird der erste Peak als „Vorpeak“ und der zweite Peak als „Hauptpeak“ bezeichnet. Die chromatographische Auflösung zwischen Vor- und Hauptpeak betrug $1,95$, sodass diese per Definition basisliniengetreunt vorlagen (Lottspeich und Engels 2012). Im abfallenden Teil des Hauptpeaks konnte außerdem ein leichtes Tailing beobachtet werden.

Dieses ist ebenfalls in den Chromatogrammen vergangener Studien mit Api m 1 beobachtet worden (Rybak-Chmielewska und Szczêsna 2004; Kokot und Matysiak 2009), wurde dort jedoch nicht weiter untersucht. Mögliche Ursachen für Tailing können ein geänderter pH-Wert der mobilen Phase, Säulenalterung, Überladen der HPLC-Säule mit Probensubstanz oder eine Kontamination der Messprobe/der mobilen Phase sein. Da den Laufmitteln stets Trifluoressigsäure (TFA) hinzugefügt wurde, können relevante pH-Wert-Schwankungen als mögliche Ursache des Tailings im vorliegenden Fall ausgeschlossen werden. Auch eine Säulenalterung ist höchst unwahrscheinlich, da für die Methodenentwicklung auf eine neue Säule zurückgegriffen wurde. Pacakova et al. (Pacakova et al. 1995) konnten bei der Vermessung eines Api m 1 Standards ebenfalls einen Doppelpeak mit ähnlichen Proportionalitätsverhältnissen feststellen und postulierten eine herstellungsbedingte Verunreinigung des verwendeten Standards als Ursache. Um eine Probenverunreinigung im vorliegenden Fall auszuschließen, wurde die Absorption des Api m 1-haltigen PBS in einem Wellenlängenbereich zwischen 200 bis 280 nm vermessen und analysiert (Anhang XIII: Abbildung 144 bis Abbildung 152). Die Messprobe zeigte in allen Spektren übereinstimmendes Absorptionsverhalten für Vor- und Hauptpeak. Rein chemisch betrachtet, muss es sich demnach um Substanzen handeln, die über ein ähnlich, bzw. identisch aufgebautes Chromophor verfügen. Da sich beide Peaks in den Retentionszeiten nur minimal unterscheiden kann angenommen werden, dass das lyophilisierte Api m 1 herstellungsbedingt in zwei unterschiedlichen Konformationen vorliegt. Dies würde die beobachteten geringen Unterschiede in der Retentionszeit erklären, die auf konformationsspezifische Wechselwirkungen mit der stationären und der mobilen Phase des HPLC-Systems zurückzuführen wären. Aufgrund dieser Ergebnisse wurden beide Peaks als von Api m 1 verursachte Signale interpretiert und das beobachtete Tailing auf eine Überladung der Säule zurückgeführt. Im Hinblick auf eine Optimierung der Peakform, der Auflösung und der Analysendauer wurden in nachfolgenden Schritten der Einfluss der Flussrate und Säulenofentemperatur, sowie der Gradientenverlauf bei ansonsten gleichbleibender Fließmittelzusammensetzung evaluiert.

3.3.1.1 Optimierung der Flussrate und der Säulenofentemperatur

Im ersten Schritt der Methodenoptimierung wurden die Flussrate und die Säulenofentemperatur variiert (Tabelle 34; Anhang XIV: Abbildung 153).

Tabelle 34: Einfluss unterschiedlicher Flussraten auf die Retentionszeiten der Api m 1 Peaks und der chromatographischen Auflösung (R_s)

Flussrate [ml/min]	t_0 [min]	t_{Vorpeak} [min]	$t_{\text{Hauptpeak}}$ [min]	Auflösung R_s
0,75	2,22	17,80	18,39	1,90
1,00	1,67	16,81	17,39	1,95
1,50	1,11	15,74	16,33	2,11
2,00	0,83	15,18	15,76	2,39

Eine Verminderung der Flussrate von 1,0 ml/min auf 0,75 ml/min führte zu einer Erhöhung der Retentionszeiten beider Api m 1 Peaks. Der Vorpeak konnte bei 17,80 Minuten detektiert werden, während der Hauptpeak bei einer Retentionszeit von 18,39 Minuten eluierte. Die chromatografische Auflösung unterschied sich in einem nicht relevanten Bereich (1,90 bei 0,75 ml/min; 1,95 bei 1,0 ml/min). Die Peakform entsprach der bei einem Flow von 1,0 ml/min beobachteten, jedoch konnte der Tailingeffekt behoben werden. Eine Erhöhung der Flussrate auf 1,5 ml/min bzw. 2,0 ml/min führte zu einer Verschlechterung der Analyse. Die Retentionszeit der Api m 1 Peaks konnte zwar auf 15,74 Minuten und 16,33 Minuten (1,5 ml/min) bzw. 15,18 Minuten und 15,76 Minuten (2,0 ml/min) verkürzt werden, jedoch verschlechterte sich dabei die Peakform und die Peaksymmetrie drastisch. Die Erhöhung der Flussrate führte dazu, dass auch der Vorpeak ein Tailing aufwies. Der Tailingeffekt des Hauptpeaks war, verglichen mit der ursprünglichen Analysenmethode, deutlicher ausgeprägt. Um einen möglichen Einfluss der Säulenofentemperatur auf die HPLC-Analytik von Api m 1 zu untersuchen, wurde diese von 25 °C auf 35 °C erhöht (Daten nicht dargestellt). Die Flussrate betrug 1,0 ml/min. Durch die Temperaturerhöhung konnte eine leichte Verschlechterung der Peaksymmetrie beobachtet werden. Die Retentionszeit der beiden Api m 1 Peaks blieb unbeeinflusst.

Da eine veränderte Säulenofentemperatur allgemein vielfältigen Einfluss auf eine HPLC-Analytik haben kann (z.B. Denaturierung der Probe während der Analyse, veränderter Diffusionskoeffizient, Viskositätsänderung des Fließmittels, etc.), kann die verschlechterte Peaksymmetrie im vorliegenden Fall nicht auf einen einzelnen Faktor zurückgeführt werden. Da eine Flussrate von 0,75 ml/min. bei einer Säulenofentemperatur von 25 °C die besten Analysenergebnisse lieferte, wurden alle nachfolgenden Optimierungsversuche unter diesen Bedingungen durchgeführt.

3.3.1.2 Optimierung des Gradientenverlaufs

Die in den vorherigen Versuchen gewonnenen Erkenntnisse, bezüglich des Einflusses der Flussrate und der Säulenofentemperatur auf die Retentionszeit und Peaksymmetrie von Api m 1, dienen im Nachfolgenden als Basis zur Optimierung der HPLC-Methode. Der Fokus der Optimierung lag auf einer verkürzten Analysezeit. Kurze Analysezeiten ermöglichen einen höheren Probendurchsatz und minimieren gleichzeitig das Risiko für Beschädigungen der Messprobe (Proteindegradation, Absorption an Oberflächen, Konformationsänderungen). Eine Zusammenfassung über den Einfluss der Methodenverkürzungen auf die Totzeit und die Retentionszeiten von Vor- und Hauptpeak, sowie die chromatographische Auflösung liefert Tabelle 35.

Tabelle 35: Übersicht der Methodenverkürzungen 1 bis 4 auf die Totzeit, Retentionszeiten von Vor- und Hauptpeak (t_{Vorpeak} , $t_{\text{Hauptpeak}}$) und die chromatographische Auflösung (R_s)

Methodenverkürzung	t_0 [min]	t_{Vorpeak} [min]	$t_{\text{Hauptpeak}}$ [min]	Auflösung R_s
1	2,22	11,31	11,59	1,19
2	2,21	11,32	11,59	1,09
3	2,22	11,34	11,61	1,11
4	2,23	11,32	11,61	1,18

Methodenverkürzung 1

Verglichen mit der ursprünglichen Methode wurde die Fließmittelzusammensetzung nicht verändert, jedoch wurden die Zeiträume zum Erreichen der jeweiligen Mischungsverhältnisse verkürzt (Tabelle 36). Dies hatte einen direkten Einfluss auf die Chromatographie von Api m 1 (Abbildung 33).

Tabelle 36: Gradientenverlauf von Methodenverkürzung 1, Acetonitril + 0,1 % TFA (Eluent A), Gereinigtes Wasser + 0,1 % TFA (Eluent B), Flow = 0,750 ml/min, Säulenofentemperatur = 25 °C, Detektionswellenlänge = 220 nm

Methodenverkürzung 1		
Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]
0,0	5,0	95,0
3,0	5,0	95,0
10,5	52,0	48,0
15,5	80,0	20,0
20,0	100,0	0,0
24,0	5,0	95,0
26,0	5,0	95,0

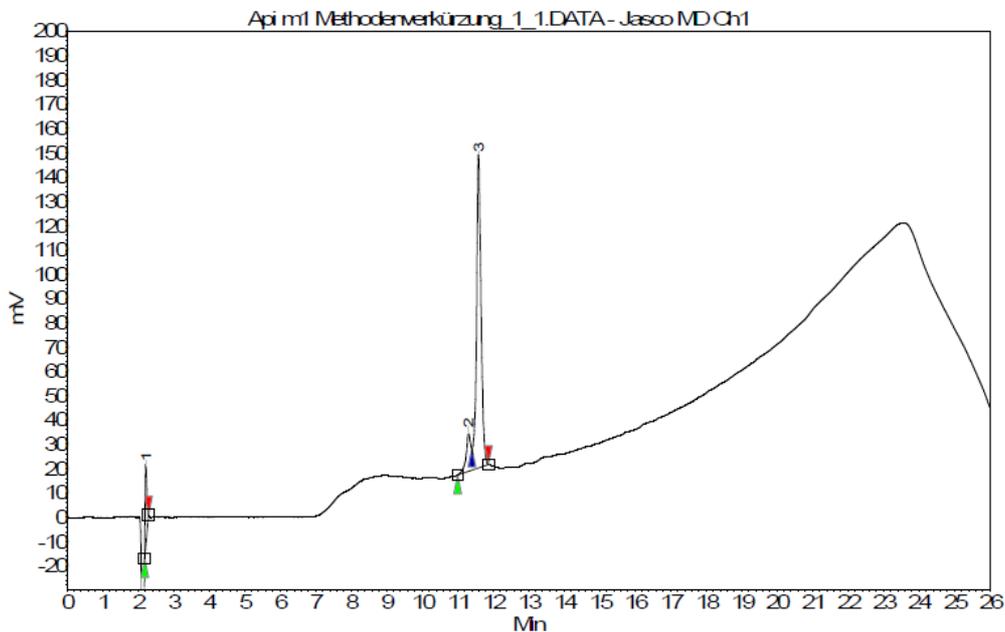


Abbildung 33: Chromatogramm von Methodenverkürzung 1 von Api m 1 in PBS (c = 0,1 mg/ml), Säule: Phenomenex Jupiter® C18 (300 Å, 5 µm 100x4,6 mm), Säulenofentemperatur = 25 °C, Absorption in Millivolt (mV), Detektionswellenlänge = 220 nm, Flussrate = 0,75 ml/min, Eluent A: Acetonitril + 0,1 % TFA, Eluent B: Gereinigtes Wasser + 0,1 % TFA, Gradient (min, %A): (0; 5), (3; 5) (10,5; 52), (15,5; 80), (20; 100), (24; 5), (26; 5),; Peaks: 1 = Injektionspeak, 2 = Api m 1 Vorpeak, 3 = Api m 1 Hauptpeak

Die Analysendauer verkürzte sich von 40 auf 26 Minuten. Erwartungsgemäß konnte ein steiler Anstieg der Baseline ab 15,5 Minuten beobachtet werden, der auf die erhöhte Absorption des rasch ansteigenden Acetonitrilanteils im Laufmittelgemisch zurückzuführen ist. Sowohl Vor- als auch Hauptpeak eluierten unter nahezu identischen chromatographischen Bedingungen bei 11,31 Minuten (Vorpeak) bzw. 11,59 Minuten (Hauptpeak) und stellten sich als symmetrische, scharfe Peaks dar. Bedingt durch den Gradientenverlauf verkürzten sich die Retentionszeiten von Vor- und Hauptpeak, sodass sich die chromatographische Auflösung von ursprünglichen 1,90 auf 1,19 verschlechterte. Um sicherzustellen, dass beide Peaks trotzdem ausreichend voneinander getrennt vorlagen wurde erneut die Absorption im Bereich von 200 bis 280 nm aufgenommen und analysiert (Anhang XV: Abbildung 154 bis Abbildung 162). Eine Auswertung der Peaks war mit Lotfällung durchführbar.

Methodenverkürzung 2

Anstelle des „Zwischenschritt“ im Gradientenverlauf von Methodenverkürzung 1 (15,5 Minuten; 80 % organischer (Acetonitril + 0,1 %) und 20 % wässriger (Gereinigtes Wasser + 0,1 % TFA) Anteil am Fließmittel) wurde nach Erreichen einer Fließmittelzusammensetzung von 52 % organischem Anteil und 48 % wässrigem Anteil (10,5 Minuten) der organische Anteil der Fließmittelzusammensetzung innerhalb von 1,5 Minuten auf 95 % erhöht (Tabelle 37). Dies ist im zugehörigen Chromatogramm durch einen rapiden Anstieg der Baseline erkennbar (Abbildung 34). Das Beibehalten dieser Fließmittelzusammensetzung (5 Minuten) sollte es ermöglichen, dass ggf. in der Probenmatrix vorhandene lipophilen Substanzen von der Säule eluieren. Direkt im Anschluss erfolgte eine Umkehrung der Fließmittelzusammensetzung auf lediglich 5 % organischen Anteil. Dies ermöglichte der Säule eine prolongierte Umspülungsphase und stellte die Startbedingungen für die nächsten Analysen wieder her.

Tabelle 37: Gradientenverlauf von Methodenverkürzung 2, Acetonitril + 0,1 % TFA (Eluent A), Gereinigtes Wasser + 0,1 % TFA (Eluent B), Flow = 0,75 ml/min, Säulenofentemperatur = 25 °C, Detektionswellenlänge = 220 nm

Methodenverkürzung 2		
Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]
0,0	5,0	95,0
3,0	5,0	95,0
10,5	52,0	48,0
12,0	95,0	5,0
17,0	95,0	5,0
20,0	5,0	95,0
26,0	5,0	95,0

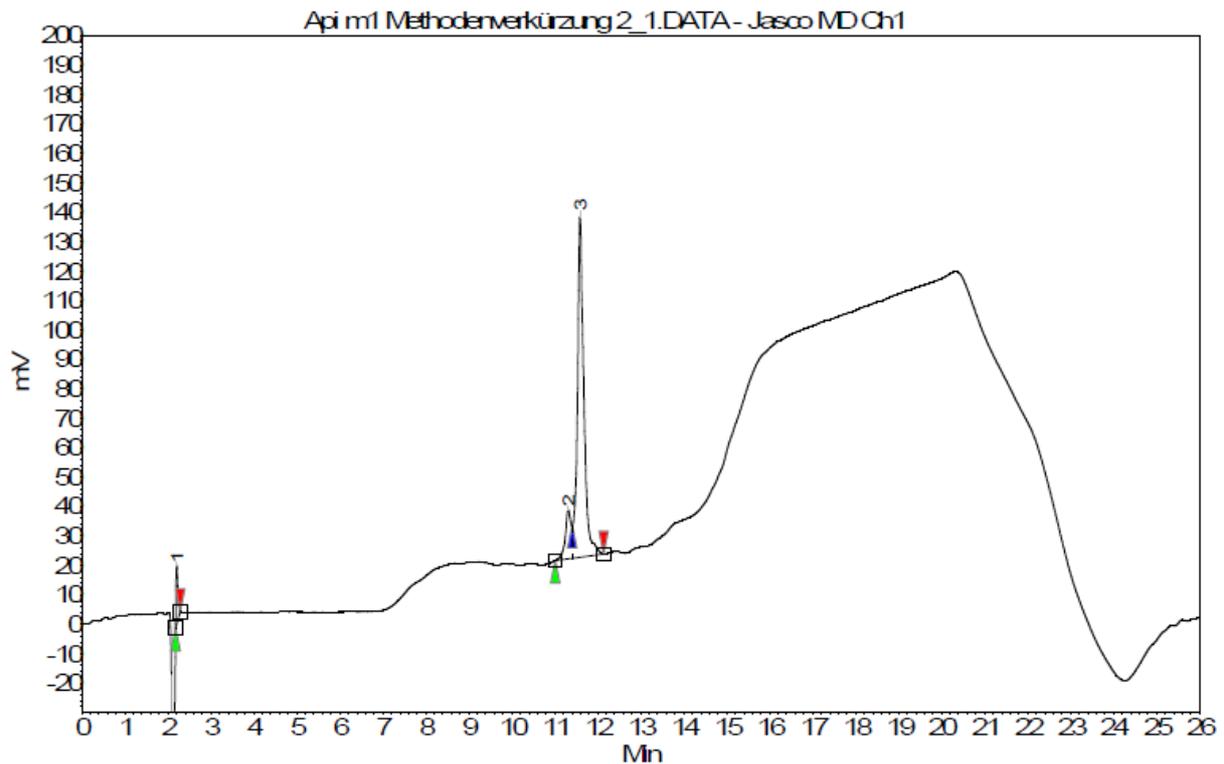


Abbildung 34: Chromatogramm von Methodenverkürzung 2 von Api m 1 in PBS (c = 0,1 mg/ml), Säule: Phenomenex Jupiter® C18 (300 Å, 5µm 100x4,6 mm), Säulenofentemperatur = 25 °C, Absorption in Millivolt (mV), Detektionswellenlänge = 220 nm, Flussrate = 0,75 ml/min, Eluent A: Acetonitril + 0,1 % TFA, Eluent B: Gereinigtes Wasser + 0,1 % TFA, Gradient (min, %A): (0; 5), (3; 5) (10,5; 52), (12; 95), (17; 95), (20; 5), (26; 5); Peaks: 1 = Injektionspeak, 2 = Api m 1 Vorpeak, 3 = Api m 1 Hauptpeak

Sowohl Vorpeak als auch Hauptpeak waren durch die Veränderungen symmetrisch und scharf. Im Vergleich mit Methodenverkürzung 1 konnten keine wesentlichen Veränderungen der Retentionszeiten für Vor- und Hauptpeak detektiert werden (Vorpeak: 11,32 Minuten; Hauptpeak: 11,59 Minuten), jedoch verschlechterte sich die chromatographische Auflösung auf 1,09.

Methodenverkürzungen 3 und 4

Beide Methodenverkürzungen sind Varianten der Methodenverkürzung 2 und unterscheiden sich lediglich durch die jeweilige Fließmittelzusammensetzung und die Dauer der Wash-Out-Phase (Tabelle 38). Die getroffenen Veränderungen hatten keinen wesentlichen Einfluss auf die Retentionszeiten von Vor- und Hauptpeak, sowie deren Peakform (Abbildung 35, Abbildung 36). Jedoch konnte durch beide Veränderungen eine leichte Verbesserung der chromatographischen Auflösung, verglichen mit Methodenverkürzung 2, erreicht werden (Tabelle 35).

Tabelle 38: Gradientenverlauf der Methodenverkürzungen 3 und 4, Acetonitril + 0,1 % TFA (Eluent A), Gereinigtes Wasser + 0,1 % TFA (Eluent B), Flow = 0,750 ml/min, Säulenofentemperatur = 25 °C, Detektionswellenlänge = 220 nm

Methodenverkürzung 3			Methodenverkürzung 4		
Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]	Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]
0,0	5,0	95,0	0,0	5,0	95,0
3,0	5,0	95,0	3,0	5,0	95,0
10,5	52,0	48,0	10,5	52,0	48,0
12,0	95,0	5,0	12,0	95,0	5,0
18,0	95,0	5,0	19,0	95,0	5,0
21,0	5,0	95,0	22,0	5,0	95,0
27,0	5,0	95,0	28,0	5,0	95,0

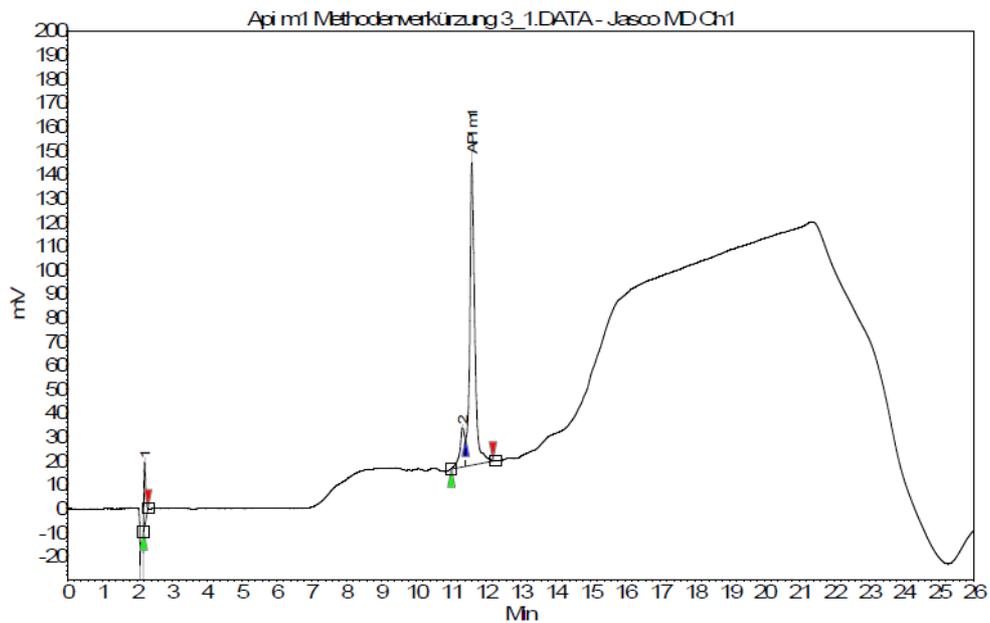


Abbildung 35: Chromatogramm von Methodenverkürzung 3 von Api m 1 in PBS ($c = 0,1 \text{ mg/ml}$), Säule: Phenomenex Jupiter® C18 (300 Å, $5\mu\text{m}$ 100x4,6 mm), Säulenofentemperatur = $25 \text{ }^\circ\text{C}$, Absorption in Millivolt (mV), Detektionswellenlänge = 220 nm, Flussrate = $0,75 \text{ ml/min}$, Eluent A: Acetonitril + 0,1 % TFA, Eluent B: Gereinigtes Wasser + 0,1 % TFA, Gradient (min, %A): (0; 5), (3; 5) (10,5; 52), (12; 95), (18; 95), (21; 5), (27; 5); Peaks: 1 = Injektionspeak, 2 = Api m 1 Vorpeak, 3 = Api m 1 Hauptpeak

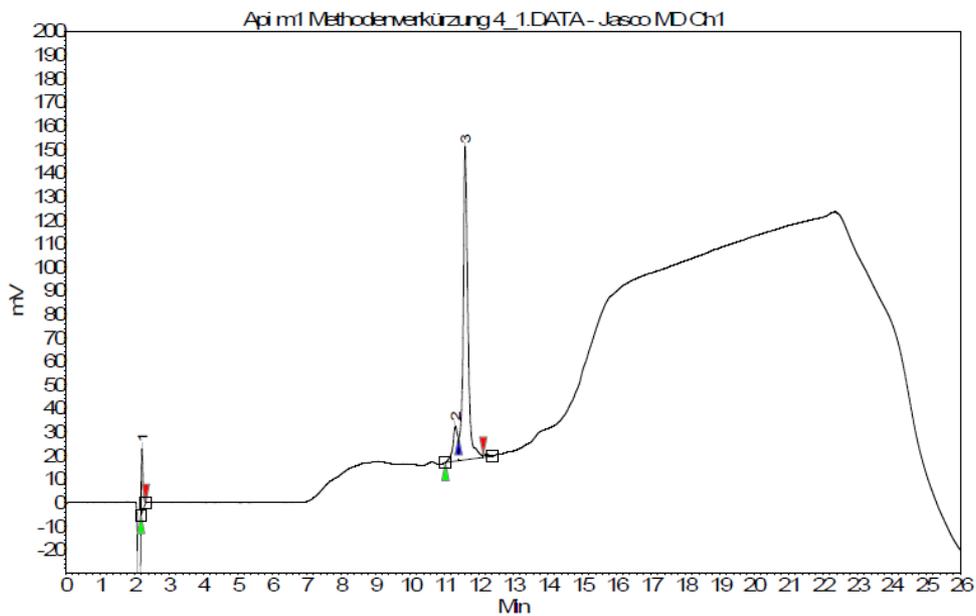


Abbildung 36: Chromatogramm von Methodenverkürzung 4 von Api m 1 in PBS ($c = 0,1 \text{ mg/ml}$), Säule: Phenomenex Jupiter® C18 (300 Å, $5\mu\text{m}$ 100x4,6 mm), Säulenofentemperatur = $25 \text{ }^\circ\text{C}$, Absorption in Millivolt (mV), Detektionswellenlänge = 220 nm, Flussrate = $0,75 \text{ ml/min}$, Eluent A: Acetonitril + 0,1 % TFA, Eluent B: Gereinigtes Wasser + 0,1 % TFA, Gradient (min, %A): (0; 5), (3; 5) (10,5; 52), (12; 95), (19; 95), (22; 5), (28; 5); Peaks: 1 = Injektionspeak, 2 = Api m 1 Vorpeak, 3 = Api m 1 Hauptpeak

3.3.1.3 *Zwischenfazit der HPLC-Methodenentwicklung*

Aufbauend auf einer Analysemethode für Bienengift (Haghi et al. 2013) konnte eine HPLC-Methode zur Bestimmung von Api m 1 aus wässriger Lösung entwickelt werden. Relevante Parameter (Flussrate, Gradientenverlauf, Ofentemperatur) wurden variiert und deren Einfluss auf das Analyseergebnis evaluiert. Zusammenfassend konnte das ursprünglich beobachtete Tailing durch eine Verminderung der Flussrate von 1,0 ml/min auf 0,75 ml/min behoben werden. Eine Erhöhung der Säulenofentemperatur von 25 °C auf 35 °C verschlechterte die Peaksymmetrie deutlich, hatte jedoch keinen Einfluss auf die Retentionszeiten von Vor- und Hauptpeak. Durch Variationen des Gradientenverlaufs (Fließmittelzusammensetzung und Zeitdauer des Beibehaltens einer bestimmten Fließmittelzusammensetzung) konnte die Analysezeit deutlich verringert werden, jedoch verschlechterte sich dadurch die chromatographische Auflösung. Durch eine Analyse der Absorption im Wellenlängenbereich von 200 bis 280 nm konnten Vor- und Hauptpeak eindeutig dem Wirkstoff Api m 1 zugeordnet werden. Da für die nachfolgenden Untersuchungen zur Bestimmung des Api m 1 Gehalts die Peakflächen von Vor- und Hauptpeak aufsummiert wurden, stellte die Methodenverkürzung 4, unter Einbeziehung aller relevanten Parameter, den besten Kompromiss aus Peakschärfe, Analysedauer und chromatographischer Auflösung dar.

3.3.2 Entwicklung einer Probenaufarbeitung von Api m 1 aus Mikroemulsion

Im Gegensatz zu PBS-Puffer enthält die entwickelte Mikroemulsion Substanzen, die einen negativen Einfluss auf die Analytik von Api m 1 ausüben können. Detergenzien, wie beispielsweise Labrasol® und Plurol oleique®, eluieren oftmals über den kompletten Gradientenverlauf und können daher Peakverbreitungen, eine Verschlechterung der chromatographischen Auflösung und Änderung der Retentionszeiten verursachen (Swiderek et al. 1995). Solche Substanzen müssen daher aus der Probenmatrix entfernt werden. Daher wurden Experimente zur Extraktion von Api m 1 aus der Mikroemulsionsmatrix mittels Ultrazentrifugation und Lösungsmittelfällung durchgeführt.

3.3.2.1 *Extraktion von Api m 1 durch Ultrafiltration*

Für die Aufarbeitung von Api m 1 aus der Mikroemulsion durch Ultrafiltration wurden zwei Rotationsfilter mit einer molekularen Ausschlussgröße (MWCO) von 3 kDa, bzw. 10 kDa getestet. Das Funktionsprinzip dieser Aufarbeitungsmethode beruht darauf, dass Substanzen, die auf die Filtermembran aufgetragen wurden, mit Hilfe der Zentrifugalkraft durch die Filtermembran gepresst werden. Biomoleküle mit einem Molekulargewicht, welches größer als der Filter-MWCO ist, sollten von der Filtermembran zurückgehalten werden. Anschließend können zurückgehaltene Substanzen erneut in einem Lösungsmittel solvatisiert werden. Eine wässrige Api m 1 Stammlösung konnte ohne sichtbaren Rückstand durch den Filter mit einem 3 kD MWCO filtriert werden. Das von der Filtermembran zurückgehaltene Protein wurde in gereinigtem Wasser aufgenommen und mit der entwickelten HPLC-Methode analysiert (Abbildung 37). Im Chromatogramm des erhaltenen Filtrats konnten keine Api m 1 Signale detektiert werden. Das Chromatogramm stimmte mit der Analyse einer wässrigen Blankprobe überein. Die HPLC-Analyse des aufgeschwämmten Filtrerrückstands zeigte den charakteristischen Api m 1 Doppelpeak. Die geringfügigen Unterschiede hinsichtlich der Retentionszeiten von Vor- und Hauptpeak sind auf einen Wechsel der HPLC-Anlagen im Laufe dieser Promotionsarbeit zurückzuführen (siehe „Material und Methoden“).

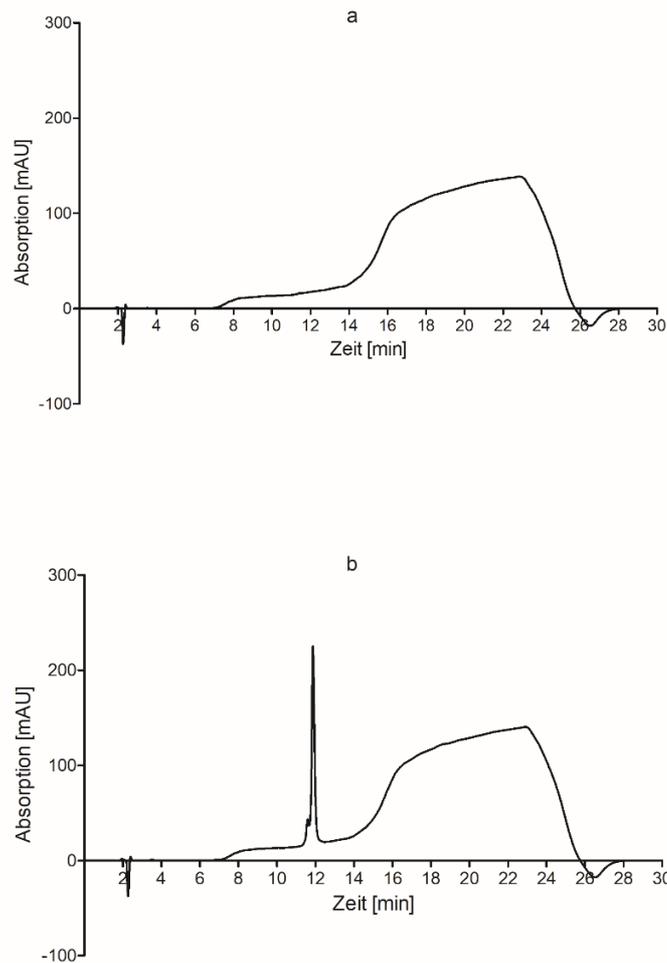


Abbildung 37: Chromatogramme von wässriger Api m 1 Stammlösung (0,01 mg/ml) nach einer Filtration durch einen Rotationsfilter mit einem molekularen Cut-Off von 3 kD; Analyse des Filtrats (a), Analyse des wiederaufgeschwämmten Filtrerrückstandes (b)

Die Messprobe der mit gereinigtem Wasser verdünnten Api m 1 haltigen Mikroemulsion war bereits vor der Filtration milchig-trüb. Dies zeigt das Aufbrechen der Mikroemulsionsstruktur und Übergang in eine Makroemulsion an (vgl. 3.1.1 „Entwicklung einer Mikroemulsion“, Abbildung 7). Bei der Filtration passierte nur ein geringer Teil der aufgetragenen Probe die Filtermembran. Das erhaltene Filtrat war farblos und klar, der auf der Filtermembran verbliebene Überstand milchig-trüb. Eine Variation der Filtrationszeit verbesserte das Ergebnis nicht. Aufgrund ihrer geringen Größe sollten alle Mikroemulsionsbestandteile, mit Ausnahme des Wirkstoffs, die Filtermembran passieren können. Da ein solches Phänomen bei der Filtration der wässrigen, wirkstoffhaltigen Proben nicht beobachtet werden konnte, ist eine wirkstoffverursachte Filterverblockung auszuschließen.

Die Filtermembran der eingesetzten Filter besteht aus einem modifizierten Polyethersulfon. Dieser zeichnet sich durch eine hohe Hydrolysestabilität (durch Polyetherstruktur) und Temperaturbeständigkeit bei gleichzeitiger chemischer Inertheit aus (Herstellerangabe). Chemisch betrachtet sind Polyethersulfone aus alternierenden Phenylether- und Phenylsulfoneinheiten aufgebaut. Dadurch entsteht eine hydrophobe Oberfläche, die aufgrund der Sauerstoffatome der Ethergruppen und der Sulfonate trotzdem auch hydrophile Wechselwirkungen eingehen kann. Die Ursache für die Filterblockade muss also auf die Surfactants und Öle der Mikroemulsion zurückzuführen sein. Da sowohl Surfactants als auch Öle zu einer nachhaltigen Schädigungen des HPLC-Systems führen können (Blockade/Zerstörung der Säule, Adsorption an Kapillaren, etc.) (Feist und Hummon 2015), wurde auf eine weiterführende Analyse des milchig-trüben Überstandes verzichtet. Das Experiment wurde mit einem zweiten Rotationsfilter (MWCO von 10 kDa) wiederholt. Die deutlich größere Porenweite sollte es ermöglichen, trotz eventuell vorhandener Wechselwirkungen der Surfactants und Öle mit der hydrophoben Filtermembran, alle Mikroemulsionsbestandteile erfolgreich abzutrennen. Das Molekulargewicht von Api m 1 ist ebenfalls ausreichend um auch von der größeren Porenmembran zurückgehalten zu werden. Die Filtration einer wässrigen Api m 1 Stammlösung lieferte analog zu den vorherigen Ergebnissen ein klares Filtrat ohne Überstand. Eine anschließende HPLC-Analyse dieses Filtrats und des aufgeschwämmten Filtrückstandes lieferte ein überraschendes Ergebnis (Abbildung 38).

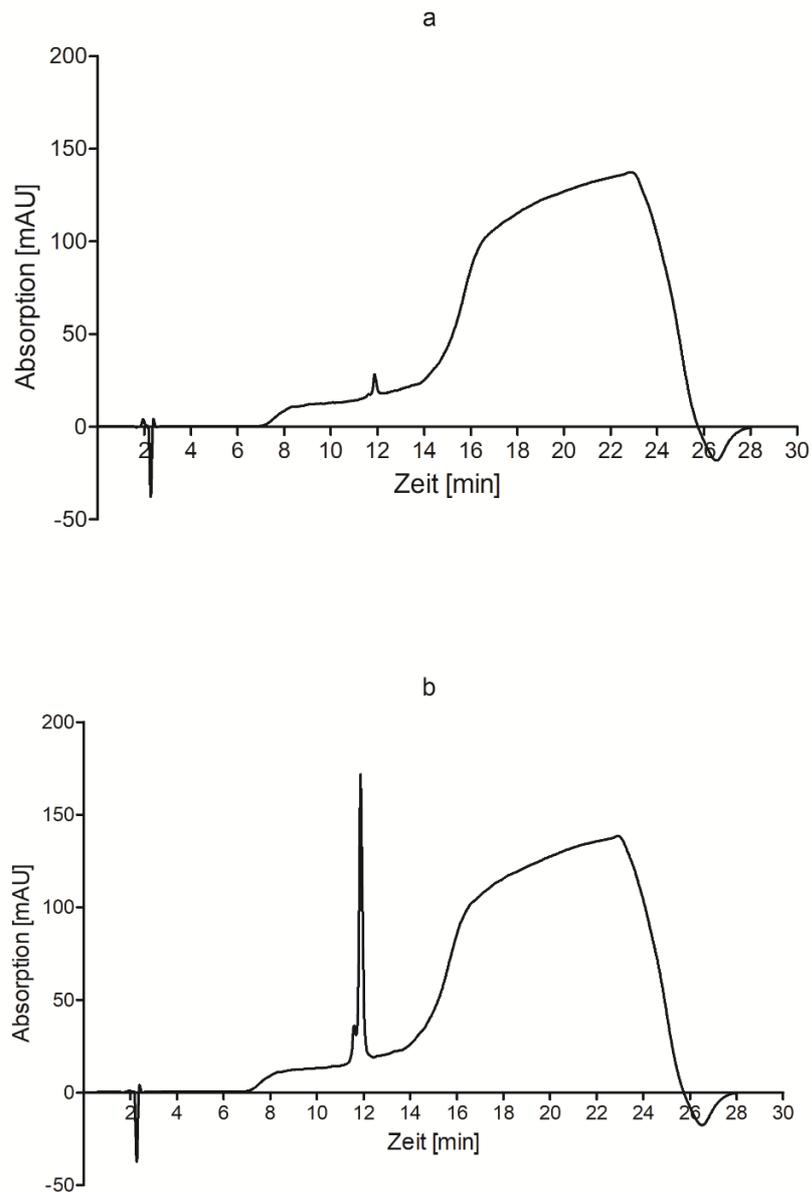


Abbildung 38: Chromatogramme von wässriger Api m 1 Stammlösung (0,01 mg/ml) nach einer Filtration durch einen Rotationsfilter mit einem molekularen Cut-Off von 10 kD; Analyse des Filtrats (a), Analyse des wiederaufgeschwämmtten Filtrerrückstandes (b)

Auch im Filtrerrückstand konnte eine geringe Menge Api m 1 detektiert werden. Das bedeutet, dass kleinere Mengen Api m 1 die großporigere Filtermembran passieren können. Die Filtration der Api m 1 haltigen Mikroemulsion lieferte optisch ein nahezu identisches Ergebnis zu dem Filtrationsversuch mit dem 3 MWCO-Filter. Erneut konnten sowohl ein klares, farbloses Filtrat als auch ein milchig-trüber Überstand erhalten werden.

Um zu überprüfen, was für die Filterblockade verantwortlich ist, wurden sowohl das Filtrat als auch der Überstand chromatographisch analysiert (Abbildung 39).

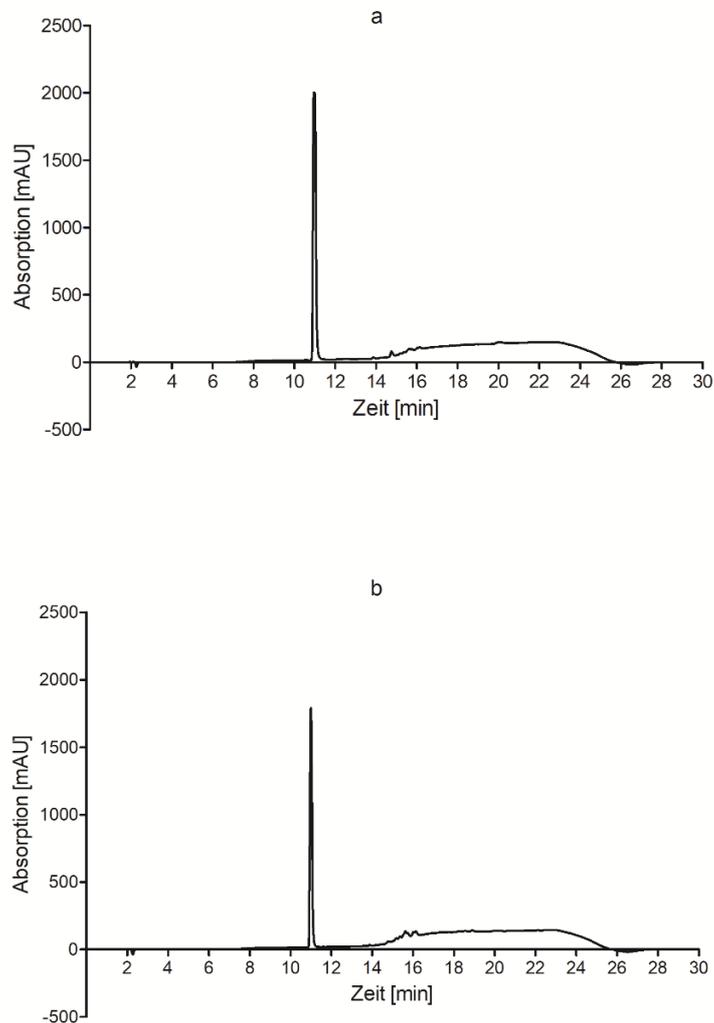


Abbildung 39: Chromatogramme von Api m 1 in Mikroemulsion (0,01 mg/ml) nach einer Filtration durch einen Rotationsfilter mit einem molekularen Cut-Off von 10 kD; Analyse des Filtrats (a), Analyse des wiederaufgeschwämten Filtrerrückstandes (b)

Es ist deutlich zu erkennen, dass sowohl im Filtrat als auch im Überstand ein Peak bei einer Retentionszeit von 11 Minuten eluierte. Im weiteren Verlauf des Chromatogramms konnten in beiden Proben zusätzliche Signale detektiert werden. Der charakteristische Api m 1 Doppelpeak konnte weder im Filtrat noch im Filtrerrückstand gefunden werden. Unter Einbeziehung der vorherigen Analysen kann geschlussfolgert werden, dass der detektierte Peak das Api m 1 Signal deutlich übertreffen muss und dieses daher nicht mehr detektiert werden kann.

Durch den Vergleich dieser Chromatogramme mit den Chromatogrammen wässriger Standards der einzelnen Mikroemulsionsbestandteile, konnte der detektierte Peak (Abbildung 39) Phenoxyethanol zugeordnet werden (nicht dargestellt). Dies verdeutlicht noch einmal die Notwendigkeit alle störenden Mikroemulsionsbestandteile aus der Probenmatrix zu entfernen. Zusammenfassend ist es nicht gelungen die störenden Bestandteile aus der Probenmatrix mit Rotationsfiltern zu entfernen. Die Testung eines weiteren Membranfilters mit der nächsthöheren Ausschlussgrenze wäre nicht zielführend, da dieser nicht mehr in der Lage wäre Api m 1 zurückzuhalten. Aus diesem Grund wurde die Extraktion des Proteins aus der Probenmatrix mit organischen Lösungsmitteln untersucht.

3.3.2.2 Probenaufarbeitung mit Hilfe von organischen Lösungsmittel

Teile der in diesem Kapitel und den zugehörigen Unterkapiteln dargestellten Daten wurden im Rahmen einer betreuten Abschlussarbeit erhoben (Christoph Gerhard Döring 2017, Betreuer Christopher Kiselmann). Hydrophile Proteine, zu denen auch Api m 1 gehört (Dennis et al. 2011), besitzen in einer wässrigen Umgebung eine Hydrathülle. Diese verhindert die Interaktion zwischen benachbarten Proteinen und sorgt dafür, dass die Moleküle einzeln in Lösung gehalten werden (Arakawa und Timasheff 1985). Durch das Hinzufügen organischer Lösungsmittel kann diese Hydrathülle gestört werden, sodass es zur Interaktion benachbarter Proteinmoleküle kommen kann. Dies kann zu Aggregation und Präzipitation führen. Versuche bei denen einer wirkstoffhaltigen Mikroemulsion tiefgekühltes Aceton (-20 °C) hinzugefügt wurde, destabilisierten die Mikroemulsion (sichtbar durch Eintrübung der Formulierung ins milchig-trübe), führten jedoch nicht zur Gewinnung eines Präzipitats. Das gleiche Ergebnis wurde erzielt, in dem einer wirkstoffhaltige Mikroemulsion eine Methanol-Chloroform-Mischung (3:1 Vol.-%) hinzugefügt wurde. Daher kann geschlussfolgert werden, dass die Formulierung in der Lage war die hinzugefügten organischen Lösungsmittel zu emulsifizieren. Dadurch wurde die Hydrathülle der Proteine vermutlich nicht ausreichend destabilisiert und eine Proteinpräzipitation somit verhindert. Um die emulsifizierende Wirkung der Surfactants auf die hinzugefügten organischen Lösungsmittel abzuschwächen wurde der Mikroemulsion daher ein Überschuss an PBS-Puffer bzw. PBS-Puffer/Ameisensäure (85 %) hinzugefügt und anschließend erneut mit Aceton (-20 °C) bzw. Methanol-Chloroform-Mischung (3:1 Vol.-%) durchmischt.

Das genaue Versuchsprotokoll ist im Anhang zu finden (Anhang XVI, Tabelle 59 bis Tabelle 61). In allen Proben konnte ein Präzipitat gewonnen werden, dass mit der entwickelten HPLC-Methode analysiert werden konnte. Durch alle drei Methoden konnten alle störenden Bestandteile der Mikroemulsionsmatrix entfernt und Api m 1 detektiert werden. Es konnten jedoch deutliche Unterschiede hinsichtlich der Ausbeute beobachtet werden (Abbildung 40). Durch die Methanol-Chloroform-Extraktion konnten keine größeren Mengen Api m 1 präzipitiert werden. Dies steht im Einklang zu den Beobachtungen von Ferro et al. (Ferro et al. 2000). Die Autoren beschreiben eine Methanol-Chloroform-Extraktion als besser geeignet für membranständige Proteine. Durch die Verwendung von Aceton konnte hingegen eine große Menge an Api m 1 präzipitiert und detektiert werden. Das durch die Verwendung von Aceton größere Ausbeuten bei der Präzipitation hydrophiler Proteine erhalten werden, wird auch von Crowell et al. und Feist und Hummon beschrieben (Crowell et al. 2013; Feist und Hummon 2015). Das Ansäuern der Probenmatrix verbesserte die Ausbeute an Api m 1 zusätzlich geringfügig. Die Gründe dafür werden im nachfolgenden Kapitel ausführlicher diskutiert. Um höhere Ausbeuten zu erzielen und die Zeitdauer der Aufarbeitung zu reduzieren wurde die Acetonpräzipitationsmethode weiter optimiert.

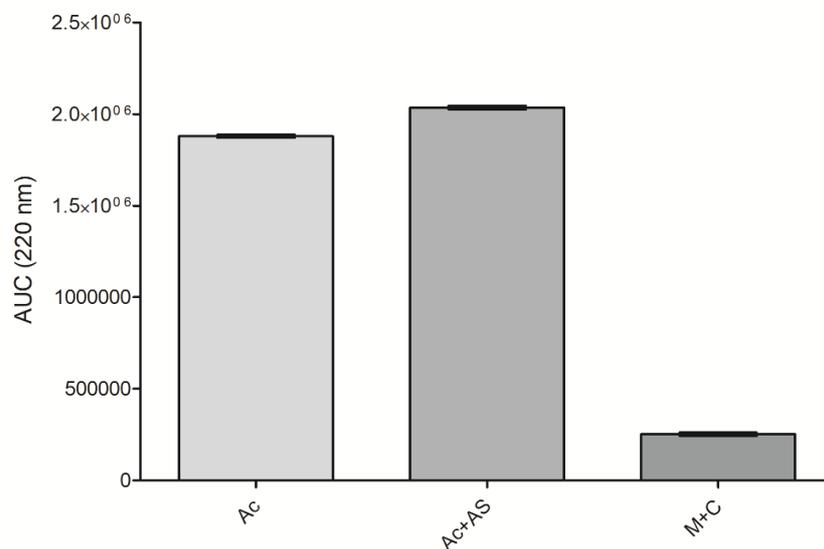


Abbildung 40: Vergleich der Ausbeuten der HPLC-Analyse von Api m 1 in Mikroemulsion [1 mg/ml] nach vorheriger Extraktion, Acetonextraktion (Ac); Acetonextraktion + 50 µl Ameisensäure (Ac+AS); Methanol-Chloroform-Extraktion (M+C); MW ± SD (n = 3); Area under the curve (AUC); Detektionswellenlänge = 220 nm

Einfluss des pH-Wertes auf die Extraktionsausbeute

Um den Einfluss des pH-Wertes auf die Fällungsreaktion weiter zu untersuchen, wurden Proben mit Ameisensäure, bzw. Ammoniak versetzt und deren Ausbeute mit nicht säure-/basenmodifizierten Messproben verglichen (Tabelle 39). Das Versuchsprotokoll ist in Tabelle 62 dargestellt (Anhang XVI).

Tabelle 39: Übersicht über die pH-Werte der Messproben und die erhaltene Ausbeute an Api m 1 nach Acetonfällung und anschließender Analyse mittels HPLC; Peaksumme = MW ± SD (n = 2); RSD = relative Standardabweichung in Prozent

Probe	pH-Wert	Peaksumme [mAU]	RSD [%]
Ohne Säure/Base	7,3	2357748 ± 106733	4,5
Säurezugabe	2,2	2432818 ± 93588	3,8
Basenzugabe	10,4	2019743 ± 14680	0,7

Durch das Ansäuern der Probe mit Ameisensäure (85 %) konnte die Api m 1-Ausbeute, verglichen mit den Proben ohne Säure- bzw. Basenzusatz, nicht wesentlich erhöht werden. Das Verschieben des pH-Werts der Proben in ein basisches Milieu führte zu einer deutlichen Reduktion der Ausbeute an präzipitiertem Api m 1. Begründen lässt sich dies mit einer Veränderung des Ionisationsgrades des Proteins durch den pH-Wert des Umgebungsmediums. Dieser hat einen großen Einfluss auf die Lösungseigenschaften einer Substanz im Umgebungsmedium. Eine Veränderung des pH-Wertes kann, allgemein betrachtet, zu einer Protonierung bzw. Deprotonierung von funktionellen Gruppen führen. Dies kann über den Ionisationsgrad ausgedrückt werden, der mit nachfolgender Gleichung beschrieben wird (Voigt und Fahr 2010):

$$\alpha_S = \frac{K_S}{K_S + [H^+]} = \frac{1}{1 + 10^{pK_S - pH}}, \text{ bzw. } \alpha_B = \frac{[H^+]}{[H^+] + K_S} = \frac{1}{1 + 10^{pH - pK_S}},$$

Formel 9: Berechnung des pH-Wert abhängigen Ionisationsgrades

mit dem Ionisationsgrad der Säureform α_S , dem Ionisationsgrad der Basenform α_B , der Säurekonstante K_S und der Konzentration an frei vorliegenden Hydroniumionen $[H^+]$.

Nachdem die schützende Hydrathülle, die Proteine in wässrigen Lösungen umgibt, durch organische Lösungsmittel gestört wurde, kommt es, je nach Ionisationsgrad der Proteine, zur gegenseitigen Anziehung oder Abstoßung benachbarter Moleküle. Durch das Hinzufügen von Ammoniak könnten daher einige der vormals bei neutralem pH-Wert in protonierter Form vorliegenden funktionellen Gruppen (beispielsweise Aminogruppen basischer Aminosäuren) von Api m 1 deprotoniert worden sein. Dies kann in der Folge eine verstärkte Abstoßung benachbarter Proteinmoleküle zur Folge haben, sodass mehr Api m 1 in Lösung verbleibt. Ein umgekehrter Effekt könnte folglich die leicht erhöhte Ausbeute der angesäuerten Proben erklären. Eine Erklärung für den trotzdem sehr geringen Unterschied zwischen der Ausbeute der angesäuerten und unbehandelten Proben liefern Crowell et al. (Crowell et al. 2013). Die Autoren schlussfolgern, dass der pH-Wert zwar einen Einfluss auf eine Fällungsreaktion haben kann, dieser jedoch verglichen mit anderen Einflussfaktoren (z.B. Ionenstärke durch Salze) lediglich eine untergeordnete Rolle spielt und dementsprechend oftmals überschätzt wird. Obwohl der Zugewinn an Api m 1-Ausbeute durch das Ansäuern lediglich sehr gering ausfällt, ermöglicht es doch den möglichen Einfluss von Schwankungen im pH-Wert der Proben bei den nachfolgenden Untersuchungen auszuschließen. Daher wurden alle Proben der nachfolgend beschriebenen Versuche ebenfalls mit 5 µl Ameisensäure (85 %) angesäuert.

Einfluss der Proteinkonzentration auf die Extraktionsausbeute

Zusammenhänge zwischen der Ausbeute einer Lösungsmittelpräzipitation und der Konzentration der verwendeten Proteinlösung wurden bereits von Barritault et al. beschrieben (Barritault et al. 1976). Auch in der vorliegenden Arbeit konnte ein erheblicher Einfluss der Ausgangskonzentration einer Api m 1-haltigen Mikroemulsion auf die Ausbeute der Fällungsreaktion festgestellt werden (Tabelle 40). Um die zu analysierende Probenkonzentration nach der Aufarbeitung vergleichbar zu halten, wurden die verwendeten Volumina der jeweiligen Lösungsmittel sowie das Probenvolumen angepasst (Anhang XVI, Tabelle 63 und Tabelle 64). Proben mit einer Ausgangskonzentration von 0,625 mg/ml und 1,0 mg/ml zeigten vergleichbare Proteinausbeuten.

Eine Verminderung der Proteinkonzentration auf 0,25 mg/ml reduzierte die Ausbeute an Api m 1 erheblich. Relativ gesehen betrug die Wiederfindung lediglich 71 % der theoretisch möglichen Ausbeute. Diese Ergebnisse stimmen weitestgehend mit den Beobachtungen von Barritault et al. (Barritault et al. 1976) überein. Die Autoren zeigten in ihrer Arbeit zur Isolation ribosomaler Proteine durch Acetonpräzipitation, dass die Ausbeute für niedrigkonzentrierte Proteinlösungen sehr gering ausfiel (20-30 % der theoretisch zu erwartenden Menge). Obwohl die Autoren bereits direkt nach dem Hinzufügen von Aceton eine Präzipitation in den untersuchten Proben beobachten konnten, führte lediglich eine drastische Erhöhung der Inkubationszeit auf bis zu 16 Stunden zu einer deutlichen Erhöhung der Proteinausbeute. Die Ursache für dieses Phänomen konnte von den Autoren jedoch nicht benannt werden. Wie bereits erläutert, stören organische Lösungsmittel die Hydrathülle von Proteinen in Lösung, sodass Wechselwirkungen zwischen benachbarten Proteinmolekülen auftreten. Diese Wechselwirkungen können sowohl zu einer Aggregation als auch einer Repulsion führen und schließlich eine Präzipitation auslösen oder die Löslichkeit erhöhen. Je höher die Proteinkonzentrationen der untersuchten Probe, desto größer ist auch die Wahrscheinlichkeit des Zusammentreffens und Interagierens zweier Moleküle. Demzufolge ist die Wahrscheinlichkeit zweier gelöster Moleküle miteinander zu interagieren in höherkonzentrierten Proben größer, sodass theoretisch bereits nach geringer Zeit hohe Präzipitatausbeuten erhalten werden können. Ein weiterer Grund dafür, dass die Präzipitatausbeute in der niedrigkonzentrierten Probe deutlich geringer ausfiel, ist der relative Fehler der Aufarbeitungsmethode. Dieser könnte beispielsweise durch Adsorption kleiner Mengen von Protein an die Oberfläche der verwendeten Verbrauchsmaterialien bedingt sein. Dies beeinflusst das Messergebnis von Proben mit geringeren Proteinkonzentrationen deutlich stärker. Auf Grund dieser Ergebnisse wurden alle weiteren Untersuchungen mit einer Proteinkonzentration von 1 mg/ml durchgeführt.

Tabelle 40: Übersicht über den Einfluss der Ausgangskonzentration einer Api m 1-haltigen Mikroemulsion auf die erhaltene Ausbeute nach Acetonfällung und anschließender Analyse mit Hilfe einer HPLC; Peaksumme = MW ± SD (n = 2); RSD = relative Standardabweichung in Prozent

Ausgangskonzentration [mg/ml]	Peaksumme [mAU]		RSD [%]
1,00	2400600	± 46670	1,9
0,625	2309201	± 41132	1,8
0,25	1718749	± 153354	8,9

Einfluss von Inkubationszeit, Zentrifugationsdauer und Temperatur auf die Extraktionsausbeute

Auf den bisherigen Ergebnissen aufbauend, wurde der Einfluss der Inkubationszeit, der Zentrifugationsdauer und der Temperatur auf die Präzipitatusbeute untersucht (Tabelle 41).

Tabelle 41: Übersicht über den Einfluss der Inkubationszeit, Zentrifugentemperatur und Zentrifugationsdauer auf die Ausbeute von Api m 1 nach Acetonfällung und anschließender HPLC-Analytik; Inkubationszeit (Ink.-zeit), Zentrifugentemperatur (Zent.-temperatur), Zentrifugationsdauer (Zent.-dauer), Peaksumme = MW ± SD (n = 2); RSD = relative Standardabweichung in Prozent

Ink.-zeit [min]	Zent.-temperatur [°C]	Zent.-dauer [min]	Peaksumme [mAU]		RSD [%]
30	RT	5	2333116	± 94646	4,1
60	RT	5	2378124	± 30142	1,3
90	RT	5	2346745	± 85702	3,7
60	4	5	2301076	± 64222	2,8
60	10	5	2183619	± 114781	5,3
60	20	5	2093755	± 23371	1,1
60	RT	5	2375746	± 127566	5,4
60	RT	10	2359634	± 33378	1,4
60	RT	15	2355894	± 38863	1,6

Weder eine Verringerung der Inkubationszeit auf 30 Minuten noch eine Erhöhung auf 90 Minuten hatten einen Einfluss auf die Präzipitatusbeute. Auch eine Variation der Zentrifugationsdauer konnte diese nicht merklich beeinflussen. Im Gegensatz dazu konnte ein klarer Zusammenhang zwischen Zentrifugentemperatur und Proteinausbeute beobachtet werden.

So erzielte ein Herunterkühlen auf 4 °C während der Zentrifugation eine leicht erhöhte Ausbeute, wohingegen eine auf 20 °C temperierte Zentrifuge die Ausbeute etwas verschlechterte. Da die Löslichkeitsgrenze einer Substanz in ihrem Umgebungsmedium temperaturabhängig ist und ein Unterschreiten dieser zur Präzipitation führen kann, war dieses Ergebnis nicht unerwartet. Vor allem ein Absenken der Temperatur verringert die Löslichkeitsgrenze einer Vielzahl von Substanzen, unter anderem von Proteinen (Cohn et al. 1946). Paradoxaerweise wurden in den vorherigen Versuchen jedoch mit einer auf Raumtemperatur temperierten Zentrifuge reproduzierbar noch größere Ausbeuten erzielt.

3.3.2.3 Zusammenfassung der Api m 1 Aufarbeitung aus Mikroemulsion

Nachdem der wirkstoffhaltigen Mikroemulsion ein Überschuss an PBS hinzugefügt wurde, konnte diese destabilisiert werden. Anschließend ermöglichte die Verwendung von tiefgekühltem Aceton die Präzipitation von Api m 1. Auch eine Methanol-Chloroform-Mischung konnte eine geringe Menge an Api m 1 aus der destabilisierten Mikroemulsion präzipitieren, jedoch mit einer unzureichenden Ausbeute. Ein Ansäuern der destabilisierten Mikroemulsion mit 5 µl Ameisensäure (85 %) und anschließender Inkubation mit tiefgekühltem Aceton, verbesserte die Ausbeute nicht wesentlich. Jedoch ermöglichte dies für die weitere Methodenoptimierung eine einheitliche Proteinladung und damit den Ausschluss einer potentiellen Fehlerquelle. Im nächsten Schritt konnte ein Zusammenhang zwischen Präzipitatausbeute und Proteinkonzentration der Probenlösung festgestellt werden, wobei höhere Proteinkonzentrationen auch größere Ausbeuten zur Folge hatten. Dieser Effekt wurde bereits in der Literatur beschrieben (Barritault et al. 1976). Die Parameter Inkubationszeit und Zentrifugationsdauer hatten im untersuchten Bereich keinen wesentlichen Einfluss auf die Proteinausbeute einer Api m 1 Lösung mit einer Konzentration von 1,0 mg/ml. Bei zunehmender Zentrifugentemperatur konnte dagegen eine Verringerung der Präzipitatausbeute beobachtet werden. Dies entspricht den Beobachtungen vorheriger Studien von Cohn et al. (Cohn et al. 1946). Im Widerspruch dazu erzielte eine auf Raumtemperatur temperierte Zentrifuge die höchsten Ausbeuten an Api m 1. Auf der Basis dieser Ergebnisse konnte die nachfolgend beschriebene Präzipitationsmethode etabliert werden (Tabelle 42).

Tabelle 42: Optimierte Aufarbeitung von Api m 1 aus Mikroemulsion mit Hilfe einer Acetonfällung, Raumtemperatur (RT)

Reihenfolge	Anweisung
1	20 µl Api m 1 in Mikroemulsion [1 mg/ml] + 200 µl PBS + 5 µl Ameisensäure; 30 Sekunden bei 1800 rpm durchmischen (Vortex-Mischer)
2	5 Minuten zentrifugieren (20.000 x g, RT)
3	1 ml Aceton (-20 °C) hinzufügen; durchmischen (Vortex-Mischer)
4	Inkubation bei -20 °C für 1 Stunde
5	5 Minuten zentrifugieren (9000 x g; RT)
6	Überstand verwerfen; 1 ml Aceton (-20 °C) hinzufügen; vortexen
7	5 Minuten zentrifugieren (9000 x g; RT)
8	Überstand verwerfen; Restacetone abdampfen lassen
9	Solubilisieren des entstandenen Pellets in 500 µl PBS

3.3.3 Bestimmung von Validierungsparametern

Um eine valide Aussage über die Funktionalität der entwickelten Probenaufarbeitung mit Hilfe von Aceton und der HPLC-Analytik zu treffen, wurden einige Validierungsparameter in Anlehnung an die ICH Q2-Richtlinie (Validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1) 2005) ermittelt. Dazu gehören Spezifität, Linearität, Bestimmungs- und Nachweisgrenze, sowie die Wiederholpräzision und Richtigkeit des Verfahrens. Darüber hinaus konnte ein Referenzstandard definiert werden.

3.3.3.1 *Spezifität*

Eine Methode wird als spezifisch bezeichnet, wenn sie in der Lage ist, den zu bestimmenden Analyten eindeutig und ohne Verfälschung durch andere, in der Probe ggf. vorhandene, Komponenten zu erfassen (Validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1) 2005). Die ICH Q2-Richtlinie (Validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1) 2005) gibt zur Überprüfung der Spezifität einer Analysenmethode verschiedene Empfehlungen. Dazu gehört z.B. das Spiken der Probenlösung mit möglichen Verunreinigungen. Da in dieser Arbeit bereits erörtert wurde, dass das Analysieren der unaufgearbeiteten Mikroemulsion zu irreversiblen Schäden der Chromatographiesäule und/oder der HPLC-Anlage führen kann, wurde die Spezifität durch einen Vergleich der Chromatogramme einer Api m 1 Referenzlösung in PBS, einer aufgearbeiteten Probe Api m 1 in Mikroemulsion und einer aufgearbeiteten Placebo-Mikroemulsion untersucht (Abbildung 41). Der direkte Vergleich der Api m 1 Peaks aus der PBS-Stammlösung mit den Peaks der aufgearbeiteten Api m 1-haltigen Mikroemulsion zeigen eine Übereinstimmung hinsichtlich Retentionszeit und Peakform. Auffällig ist jedoch, dass sich das Verhältnis von Vor- zu Hauptpeak durch die Mikroemulsion leicht zu Gunsten des Vorpeaks veränderte. Dies liefert einen Hinweis auf die bereits in vorherigen Kapiteln geäußerte Vermutung, dass es sich bei beiden Peaks um zwei unterschiedliche Api m 1 Konformationen handeln könnte. Dieser Aspekt wird im nachfolgenden Kapitel (3.3.4 „Stabilitätsuntersuchungen von Api m 1 in Mikroemulsion“) genauer erläutert.

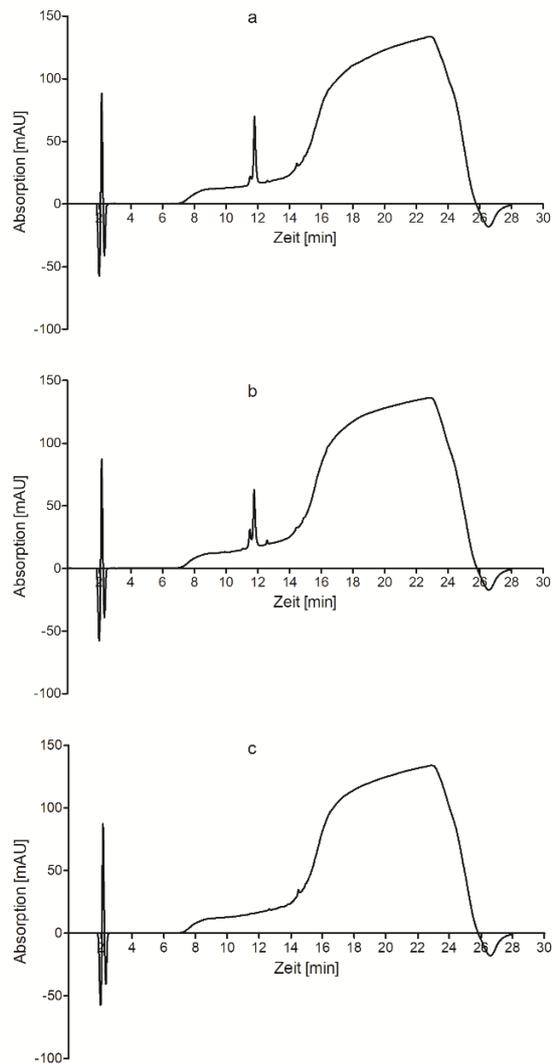


Abbildung 41: HPLC-Chromatogramme von: Api m 1 in PBS [1 mg/ml] (a), aufgearbeiteter Api m 1-haltiger Mikroemulsion [1 mg/ml] (b) und aufgearbeiteter Placebo-Mikroemulsion (c), Detektionswellenlänge = 220 nm, Flussrate = 0,75 ml/min, Eluent A: Acetonitril + 0,1 % TFA, Eluent B: Gereinigtes Wasser + 0,1 % TFA, Gradient (min, %A): (0; 5), (5; 5) (20; 52), (25; 80), (30; 100), (35; 5), (40; 5); Absorption in Milliabsorptionseinheiten (mAU)

Durch eine Analyse der Absorption zwischen 200 nm und 280 nm (analog zu 3.3.1: Entwicklung einer RP-HPLC-Analytik von Api m 1) konnten beide Peaks eindeutig Api m 1 zugeordnet werden (Daten nicht dargestellt).

Darüber hinaus zeigte der Vergleich beider Chromatogramme mit dem Chromatogramm der aufgearbeiteten Placebo-Mikroemulsion deutlich, dass durch die entwickelte Probenaufarbeitung (Acetonpräzipitationsmethode) alle störenden Bestandteile der Mikroemulsionsmatrix entfernt werden konnten und es daher zu keinerlei Interferenzen der Api m 1 Peaks mit der Mikroemulsionsmatrix kommen kann. Die entwickelte Analytik kann daher als selektiv für die Bestimmung von Api m 1 angesehen werden.

3.3.3.2 Linearität, LOD, LOQ

Eine Messmethode gilt in einem bestimmten Konzentrationsbereich als linear, wenn es einen direkt proportionalen Zusammenhang aus dem detektierten Messsignal und der Analytenkonzentration in der Messprobe gibt (Validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1) 2005). Bei der Nachweisgrenze (LOD; Limit of Detection) und der Bestimmungsgrenze (LOQ; Limit of Quantification) handelt es sich hingegen um die jeweils kleinste Konzentration eines Analyten, die sicher qualitativ (LOD) bzw. quantitativ (LOQ) durch die gegebene Analyseverfahren bestimmt werden kann (Validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1) 2005). Die Linearität der Analytik konnte in einem Bereich von 20 µg/ml bis 60 µg/ml bestätigt werden (Tabelle 43; Anhang XVII: Abbildung 163). Das dazugehörige Bestimmtheitsmaß (R^2) betrug 0,9997. Die Bestimmungs- und Nachweisgrenze (LOD, bzw. LOQ) der Standardlösungen konnte mit sehr guten Werten von 1,9 µg/ml (LOD) und 5,7 µg/ml (LOQ) ermittelt werden. Damit wurden bisher ermittelte Bestimmungs- und Nachweisgrenzen von > 3,2 µg/ml (LOD), bzw. 9,8 µg/ml (LOQ) für Api m 1 deutlich unterboten (Kokot und Matysiak 2009; Szókán et al. 1994; Pacakova et al. 1995).

Tabelle 43: Ermittlung der Linearität, Bestimmungs- und Nachweisgrenze der Analyseverfahren, Konzentration Api m 1 in PBS (Konz.), relative Standardabweichung (RSD), Bestimmtheitsmaß der linearen Regression (R^2), Bestimmungsgrenze (LOD, Limit of Detection) und Nachweisgrenze (LOQ, Limit of Quantification), n = 3

Konz. [µg/ml]	Peaksumme [mAU]	RSD [%]	Regressionsgl.	R^2	LOD [µg/ml]	LOQ [µg/ml]
20	1216227 ± 20841	1,7	Absorption =	0,9991	1,9	5,7
40	2521006 ± 50797	2,0	64771*Konzentration -			
60	3823597 ± 31699	0,8	11741			

3.3.3.3 Wiederholpräzision, Richtigkeit

Die Wiederholpräzision wurde bestimmt um zu überprüfen, ob die Aufarbeitung und anschließende Analytik reproduzierbar ist. Der Variationskoeffizient über alle Messproben (sechs Proben separat gefällt und jeweils in Dreifachbestimmung vermessen) betrug lediglich 0,83 %, bezogen auf die erhaltene kumulative AUC von Vor- und Hauptpeak (Daten nicht dargestellt). Die Wiederholpräzision des Analyseverfahrens ist somit gegeben. Die Richtigkeit des Analyseverfahrens wurde anhand der Wiederfindung ermittelt. Dazu wurden sowohl wirkstoffhaltiger PBS-Puffer als auch wirkstoffhaltige Mikroemulsion analysiert (Tabelle 44).

Tabelle 44: Vergleich der Wiederfindung mittels Acetonpräzipitation und anschließender HPLC-Analytik von Api m 1 aus PBS und aus Mikroemulsion (ME). Als Referenz diente natives Api m 1 in PBS. Milliabsorptionseinheiten (mAU), relative Standardabweichung (RSD), n = 2 (MW ± SD)

Probe	Peaksumme [mAU]	RSD [%]	Wiederfindung [%]
Api m 1 nativ in PBS	2746894 ± 64352	2,3	100,00
Api m 1 aufgearbeitet aus PBS	2329716 ± 18051	0,8	84,81 ± 0,30
Api m 1 aufgearbeitet aus ME	2400599 ± 46670	1,9	87,39 ± 1,66

Die Wiederfindung von Api m 1 aus einer PBS-Lösung (aufgearbeitet mit entwickelter Acetonpräzipitationsmethode) betrug $84,81 \pm 0,30$ % (verglichen mit nativem, nicht-aufgearbeitetem Api m 1 in PBS), die relative Standardabweichung zwischen den sechs Messläufen lediglich 0,77 %. Die Wiederfindung von Api m 1 aus Mikroemulsion (aufgearbeitet mit entwickelter Acetonpräzipitationsmethode) betrug $87,39 \pm 1,66$ %. Auch hier war die relative Standardabweichung mit 1,94 % sehr gering. Verglichen mit der Referenzlösung (natives, nicht-gefälltes Api m 1 in PBS) konnte sowohl in den aufgearbeiteten PBS-Proben als auch der aufgearbeiteten Mikroemulsion ein Wirkstoffverlust von ca. 15 % festgestellt werden. Da die Referenzproben lediglich durch Verdünnung aus einer Stammlösung (Api m 1 in PBS, 1 mg/ml) hergestellt wurden und anschließend per HPLC-Analytik analysiert wurden, muss die Acetonpräzipitation ursächlich für diesen Verlust sein.

Möglicherweise hätte eine Erhöhung der Inkubationszeit mit tiefgekühltem Aceton über den in der Methodenentwicklung untersuchten Zeitraum von bis zu 90 Minuten eine Erhöhung der Wiederfindung zur Folge. Aus diesen Beobachtungen ist zu schlussfolgern, dass die zu erwartenden Matrixeffekte der Mikroemulsion (allen voran störende Surfactants) in diesem Fall keinen Einfluss auf die Proteinausbeute hatten.

3.3.3.4 Zusammenfassung: Analytik und Aufarbeitung von Api m 1

Im vorherigen Kapitel konnte sowohl die Entwicklung einer HPLC-Methode als auch die erfolgreiche Aufarbeitung von Api m 1 aus der entwickelten Mikroemulsion beschrieben werden. Durch die Verwendung der entwickelten Acetonpräzipitationstechnik und der HPLC-Analyse konnten alle störenden Matrixbestandteile der Mikroemulsion entfernt und somit die Spezifität der Analytik gezeigt werden. Ausgehend von einer Kalibriergeraden mit Api m 1 in PBS-Standards konnte die Linearität im angestrebten Messbereich von 20 bis 60 µg/ml gezeigt und die Bestimmungs- und Nachweisgrenze mit 1,9 bzw. 5,7 µg/ml ermittelt werden. Der Variationskoeffizient der Wiederholpräzision der Aufarbeitung und HPLC-Analytik von Api m1 aus Mikroemulsion betrug lediglich 0,83 %, sodass die Methode als ausreichend präzise im Hinblick auf die Wiederholbarkeit angesehen werden kann. Durch einen Vergleich der Wiederfindung von Api m 1 (aufgearbeitet aus PBS und Mikroemulsion) mit nativem Api m 1 in PBS konnte jedoch ein aufarbeitungsbedingter Wirkstoffverlust von ca. 15 % festgestellt werden. Da die Messungen der aufgearbeiteten PBS- und Mikroemulsionsproben eine gute Vergleichbarkeit zeigten, wird im nächsten Kapitel die Verwendung aufgearbeiteter, wirkstoffhaltiger PBS-Proben als Referenzstandard untersucht.

3.3.4 Stabilitätsuntersuchungen von Api m 1

Bisher konnte die Entwicklung einer stabilen Mikroemulsion und deren Penetrationsförderung von Api m 1 in die Haut gezeigt werden. Darüber hinaus wurde erfolgreich eine Analysemethode inklusive Probenaufarbeitung entwickelt und beschrieben. Im nachfolgenden Kapitel soll nun die Lagerungsstabilität von Api m 1 Referenzstandards und in Mikroemulsion untersucht werden.

3.3.4.1 *Bestimmung eines Referenzstandards*

Teile der in diesem Kapitel und den zugehörigen Unterkapiteln dargestellten Daten wurden im Rahmen einer betreuten Abschlussarbeit erhoben (Christoph Gerhard Döring 2017; Betreuer Christopher Kiselmann). Der Api m 1-Restgehalt der bei Raumtemperatur bzw. tiefgekühlt gelagerten Proben ist in Tabelle 45 dargestellt. Es ist auffällig, dass in den bei Raumtemperatur gelagerten Proben mit einer Konzentration von 20 µg/ml eine deutliche Abnahme des Restgehaltes an Api m 1 beobachtet werden konnte. Für höhere Konzentrationen (40 und 60 µg/ml) wurde dieser Effekt nicht beobachtet. Auch bei den tiefgekühlt gelagerten Proben mit einer Konzentration von 20 µg/ml konnte eine Abnahme des Proteingehalts nach siebentägiger Lagerung festgestellt werden. Dieser war jedoch deutlich geringer ausgeprägt als bei den bei Raumtemperatur gelagerten Proben. Interessanterweise waren die Unterschiede im Restgehalt von Api m 1 zwischen den höherkonzentrierten Proben bei beiden Lagerungsbedingungen nicht so deutlich ausgeprägt. Für die beobachteten Unterschiede können verschiedene Ursachen verantwortlich sein. Es ist denkbar, dass durch die Lagerung in den Probegefäßen eine undefinierte Menge an Protein an den Oberflächen adsorbiert ist und auch durch ein homogenisieren der Probe vor der Abfüllung in HPLC-Vials nicht vollständig resolubilisiert werden konnte. Auch eine Proteindegradation könnte die Ursache für den verringerten Wirkstoffgehalt sein. Vor allem höhere Lagerungstemperaturen können eine Proteindegradation fördern, was wiederum den höheren Wirkstoffverlust der bei Raumtemperatur gelagerten Proben erklären könnte. Die HPLC-Analyse der Proben zeigte jedoch zu keiner Zeit Abbaufragmente oder Aggregate (Chromatogramme nicht dargestellt). Da die tiefgekühlt gelagerten Proben lediglich einen geringen, vertretbaren Wirkstoffverlust zeigten wurden für alle weiteren Untersuchungen aus PBS gefällte und tiefgekühlt gelagerte Api m 1-Standards als Referenz verwendet.

Tabelle 45: Vergleich des Restgehalt von gefällttem Api m 1 aus PBS zu verschiedenen Zeitpunkten nach Lagerung bei Raumtemperatur (RT) und tiefgekühlt (TK, - 21 °C), n = 3 (MW ± SD)

Konzentration [µg/ml]	Lagerungsbedingung	Lagerungsdauer [d]	Restgehalt [%]		
20	RT	0	100,00	±	3,20
	RT	1	82,86	±	1,36
	RT	7	75,15	±	3,26
	TK	1	105,53	±	0,39
	TK	7	94,08	±	2,44
40	RT	0	100,00	±	0,73
	RT	1	96,94	±	0,41
	RT	7	95,88	±	0,40
	TK	1	100,44	±	0,30
	TK	7	98,79	±	1,05
60	RT	0	100,00	±	0,42
	RT	1	96,87	±	0,11
	RT	7	97,26	±	0,28
	TK	1	96,37	±	1,24
	TK	7	96,80	±	0,52

3.3.4.2 Stabilitätsuntersuchungen von Api m 1 in Mikroemulsion

Basierend auf der entwickelten Analysenmethode konnten Untersuchungen zur Stabilität von Api m 1 in der entwickelten Mikroemulsion durchgeführt werden. Dazu wurde die Api m 1-haltige Mikroemulsion [1 mg/ml] bei Raumtemperatur gelagert und der Restgehalt an Protein aus der Summe beider Peaks zu verschiedenen Zeitpunkten kalkuliert (Tabelle 46).

Tabelle 46: Ermittlung des Restgehalts von Api m 1 in Mikroemulsion [1 mg/ml] gelagert bei Raumtemperatur. Probenaufarbeitung mittels Acetonpräzipitation und anschließender HPLC-Analyse. Als Referenz diente tiefgekühlt gelagertes, gefälltes Api m 1 in PBS. Dreifachbestimmung (MW \pm SD), Milliabsorptionseinheiten (mAU), relative Standardabweichung (RSD), Raumtemperatur (RT)

Lagerungsdauer	Peaksumme [mAU]	RSD [%]	Restgehalt [%]
Startwert	2787400 \pm 48473	1,74	100,00
1d RT	2548973 \pm 25954	1,02	92,00 \pm 0,76
3d RT	2309039 \pm 7364	0,32	82,63 \pm 0,22
6d RT	2730814 \pm 7941	0,29	98,27 \pm 0,23
16d RT	2459093 \pm 12423	0,51	88,50 \pm 0,36

Die Kalkulation des Proteingehalts wies im Verlauf der Untersuchungen starke Schwankungen auf. So konnten nach einem Tag Lagerung bei Raumtemperatur (RT) nur noch 92,00 \pm 0,76 % Api m 1 detektiert werden. Nach einer Lagerungsdauer von drei Tagen bei RT war der Gehalt sogar auf 82,83 % abgesunken. Dies würde für einen starken Abbau des Proteins sprechen. Nach sechstägiger Lagerung konnten jedoch 98,27 \pm 0,23 % des Wirkstoffs wiedergefunden werden, nach sechzehntägiger Lagerung noch 88,50 \pm 0,36 %. So große Schwankungen der Analyseergebnisse sind nicht allein durch einen potentiellen Proteinabbau zu erklären, sondern lassen sich vermutlich auch auf Fehler in der Probenbehandlung zurückführen. Denkbar wäre, dass es bei der Proteinaufarbeitung aus der Mikroemulsion während der Entfernung des überschüssigen Aceton (Kapitel 3.3.2.3 „Zusammenfassung der Api m 1 Aufarbeitung aus Mikroemulsion“, Tabelle 42 Schritt 6) zu einem Aufnehmen und Verwerfen eines Teiles des Wirkstoffs kam. Eine weitere Fehlerquelle stellt eine unzureichende Probenhomogenisation dar. Da aus der gelagerten Formulierung lediglich 20 μ l pro Probenaufarbeitung entnommen werden, führt eine nicht ausreichende Probenhomogenisierung zu starken Abweichungen.

Trotz der starken Schwankungen innerhalb der Messergebnisse zeigen die erhaltenen Chromatogramme (Abbildung 42) eindeutig, dass nach der sechzehntägigen Lagerung eine große Menge Api m 1 detektiert werden konnte.

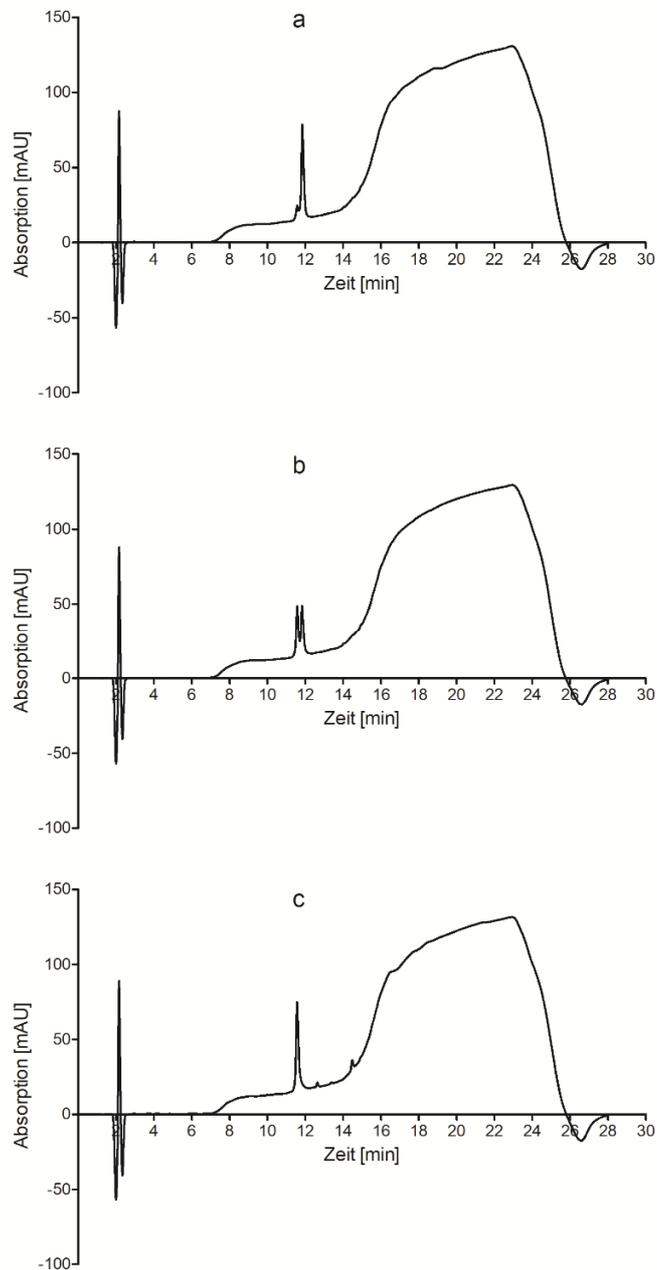


Abbildung 42: HPLC-Chromatogramme von Api m 1 in Mikroemulsion [1 mg/ml] nach vorheriger Probenaufarbeitung mittels Acetonfällung zum Start der Stabilitätsuntersuchungen (a), nach eintägiger (b) und nach dreitägiger Lagerung bei Raumtemperatur (c), Detektionswellenlänge = 220 nm, Flussrate = 0,75 ml/min, Eluent A: Acetonitril + 0,1 % TFA, Eluent B: Gereinigtes Wasser + 0,1 % TFA, Gradient (min, %A): (0; 5), (5; 5) (20; 52), (25; 80), (30; 100), (35; 5), (40; 5); Absorption in Milliabsorptionseinheiten (mAU)

An den niedrigsten Messwerten orientierend kann der Wirkstoffverlust daher auf ca. 20 % beziffert werden. Während des Untersuchungszeitraums zeigten sich außerdem Veränderungen im Chromatogramm von Api m 1. Zu Beginn der Untersuchungen lieferte das Chromatogramm von aufgearbeitetem und in PBS-Lösung resuspendiertem Api m 1 das bekannte Bild des charakteristischen Api m 1-Doppelpeaks (Abbildung 42). Nach eintägiger Lagerung konnte jedoch eine Verschiebung des Peakflächenverhältnisses von Vor- zu Hauptpeak beobachtet werden. Im Detail betrug das Peakverhältnis, bezogen auf die AUC, etwa 50:50. Im weiteren Verlauf der Untersuchungen verschob sich das Verhältnis weiter zu Gunsten des Vorpeaks, bis nach sechstägiger Lagerung lediglich ein einzelner Peak detektiert werden konnte. Während der gesamten Lagerungszeit konnten keine Peaks detektiert werden, die auf eine Proteindegradation hindeuteten. Daher kann erneut angenommen werden, dass sich diese Ergebnisse auf das Vorhandensein zweier unterschiedlicher Api m 1-Konformationen zurückführen lassen. Um dies abschließend durch ein zusätzliches Analyseverfahren zu verifizieren, wurden die bis zu sechs Tage gelagerten Messproben mit Hilfe von SDS-PAGE auf das Vorhandensein möglicher Abbaumuster oder Aggregatbildung untersucht (Anhang XVIII, Abbildung 164). Das Bandenmuster der wirkstoffhaltigen PBS-Standards und der wirkstoffhaltigen Mikroemulsionsproben war über den gesamten Untersuchungszeitraum identisch. Darüber hinaus konnten keine Zusatzbanden identifiziert werden, die bei einem Abbau des Api m 1 Moleküls hätten auftreten können. Dies bestätigt die Vermutung, dass es sich bei dem sich verändernden Doppelpeak um zwei verschiedene Konformationen von Api m 1 handelt. Die entwickelte Mikroemulsion besteht hauptsächlich aus PBS und einem geringen Ölanteil, die jeweils als unkritisch für eine Konformationsänderung angesehen werden können. Da der Einfluss von oberflächenaktiven Substanzen auf die Konformation von Proteinen bereits beschrieben wurde (Jones 1992; Otzen 2011), kann postuliert werden, dass die in der Mikroemulsion verwendeten Surfactants für die Konformationsänderung von Api m 1 verantwortlich sind. Um dies zu überprüfen wurde wirkstoffhaltiger PBS-Puffer [1 mg/ml] mit den jeweiligen Inhaltsstoffen der Mikroemulsion versetzt und für 24 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.

Die anschließende Analyse der mit Plurol® oleique (Surfactant) inkubierten Proben zeigte tatsächlich eine Peakumwandlung, wie sie auch während der Stabilitätsuntersuchung der wirkstoffhaltigen Mikroemulsion zu beobachten war (nicht dargestellt). Aus regulatorischer Sicht ist dies kritisch zu sehen, aus immunologisch-klinischer Sicht jedoch nicht zwingend. Prinzipiell können für eine konventionelle SCIT neben den nativen Allergenen auch Allergoide verwendet werden. Allergoide sind Allergene mit einer chemisch veränderten Struktur. Das Ziel dieser Strukturänderung ist es Nebenwirkungen verursachende, IgE-bindende Epitope (meistens Konformationsepitope) zu maskieren und immunogene T-Zell-Epitope zu erhalten (Pfützner 2016). Die Möglichkeiten einer effektiven AIT unter Einsatz dieser Allergoide wurde bereits in klinischen Studien belegt (Corrigan et al. 2005; Pfaar et al. 2010; Pfaar et al. 2012; Zielen et al. 2010). Denkbar wäre es, dass die von Plurol® oleique verursachte Konformationsänderung einen ähnlichen Effekt auf Api m 1 ausübt und die Immunogenität somit nicht negativ beeinflusst wird.

4 Fazit und Ausblick

Das Ziel der vorliegenden Dissertation war die Entwicklung und Charakterisierung einer Formulierung um die dermale Applikation und Penetration von Api m 1, dem Hauptallergen der europäischen Honigbiene, in die Haut zu ermöglichen. Aufbauend auf dem Stand der Wissenschaft wurde eine Rohstoffauswahl getroffen, die ein möglichst niedriges Risiko für Hautirritationen aufweist. Dies erhöht die potentielle Therapietreue eines Patienten. Um Mikroemulsionen zu identifizieren wurde das zeiteffiziente Screeningverfahren der PDMPD (Schmidts et al. 2009) verwendet und mit einer simultanen Bestimmung der OD₆₀₀ ergänzt. Im Gegensatz zur PDMPD-Methode und der klassischerweise zur Identifizierung von Mikroemulsionen verwendeten „Drop-Method“ (Kreilgaard 2002; Lawrence und Rees 2012), die mit einer visuellen Evaluation auf das Vorhandensein einer Mikroemulsion entscheiden, konnte so mit Hilfe von vorher festgelegten, objektiven Kriterien eine Mikroemulsion entwickelt werden. Eine Kombination aus Butylenglykol und Phenoxyethanol schützte die Formulierung erfolgreich gegen mikrobiellen Befall. Die physikochemischen Eigenschaften der Mikroemulsion konnten im Rahmen einer Stabilitätsuntersuchung evaluiert werden. Die entwickelte Mikroemulsion war über einen dreimonatigen Zeitraum bei 25 °C, 60 %rH lagerungsstabil. Aufgrund ihrer niedrigen Viskosität ergeben sich jedoch Einschränkungen im Hinblick auf den möglichen Applikationsort im Rahmen einer Therapie (Verlaufen der Mikroemulsion vom Applikationsort). Basierend auf der Mikroemulsion wurden daher diverse Gelbildner(kombinationen) in die Mikroemulsion eingearbeitet und geeignete Formulierungen mit Hilfe von rheologischen Messungen weiter evaluiert. Die geeignetsten Formulierungen (MBO 16 und MBO 18) wurden anschließend in einer Kurzzeit-Stabilitätsuntersuchung weiterführend untersucht. Im Verlauf der Lagerung konnte für MBO 16 ein temperatur- und zeitabhängiger Anstieg der Gelstärke beobachtet werden. Auch die bei 25 °C, 60 %rH gelagerten Proben von MBO 18 zeigten ein ähnliches Verhalten. Es konnte daher geschlussfolgert werden, dass dieser Effekt auf das Zusammenspiel der Gelbildner Aerosil® und Natriumalginat mit der Mikroemulsionsmatrix zurückzuführen ist. Jedoch konnte abschließend kein spezieller Mechanismus dafür benannt werden.

Darüber hinaus zeigte MBO 18 eine Instabilität bei höheren Lagerungstemperaturen (40 °C, 75 %rH), die eine Zerstörung der Gelstruktur zur Folge hatte. Dies zeigte sich durch das Vorliegen von freier Flüssigkeit in den gelagerten Proben. Des Weiteren konnte bereits bei der Entwicklung der MBO ein milchig-weißes Eintrüben der vormals optisch klaren Mikroemulsion beobachtet werden. Dieser Effekt trat unabhängig von der Art der verwendeten Gelbildner(kombinationen) und deren Einsatzkonzentration auf. Durch lichtmikroskopische Aufnahmen der MBO 16 und 18 konnte diese Eintrübung analog zu den Beobachtungen von Chen et al. (Chen et al. 2006) auf eine Zerstörung der Mikroemulsionsstruktur zurückgeführt werden. Zusammenfassend konnte MBO 16 als lagerungsstabile Formulierung identifiziert werden. Im Rahmen der Entwicklung eines für Api m 1 geeigneten Hydrogels wurden diverse Kombinationen aus Poloxamer 407 und Poloxamer 188, sowie vier verschiedene Hyaluronsäuren getestet und rheologisch untersucht. Der dabei festgestellte Einfluss von HA auf die T_{SG} und die Gelstärke einer Poloxamerformulierung (Absenken der T_{SG} bei gleichzeitigem Anstieg der Gelstärke) steht teilweise im Einklang mit der Literatur (Seo und Kim 2012; Mayol et al. 2008), teilweise jedoch auch im Widerspruch (Eisenhardt et al. 2015; Wei et al. 2002). Dies wurde auf die Komplexität der in dieser Arbeit verwendeten Wasserphase und die Unterschiede bezüglich der verwendeten Hyaluronsäuren zurückgeführt. Auf der Basis dieser Ergebnisse konnten vier potentiell geeignete Hydrogele (HG 1 bis HG 4) entwickelt und in einer Kurzzeit-Lagerungsstabilitätsstudie rheologisch genauer untersucht werden. Im Verlauf der Lagerung zeigten die HG 2, 3 und 4 eine Instabilität, die mit einem hydrolytischen Abbau der strukturgebenden Hyaluronsäuren begründet werden konnte. HG 1 hingegen konnte als lagerungsstabile Formulierung identifiziert werden. Auf der Basis der Ergebnisse aus der Formulierungsentwicklung und den Stabilitätsuntersuchungen wurden die Mikroemulsion sowie MBO 16 und HG 1 für weiterführende Penetrationsuntersuchungen an einem *ex-vivo* Schweineohrmodell und anschließender CLS-Mikroskopie ausgewählt. Hier zeigte sich, dass die entwickelte Mikroemulsion eine zeitabhängige Penetration von Api m 1 in die Haut ermöglichte. Auch MBO 16 zeigte einen geringen penetrationsfördernden Effekt, der jedoch deutlich unterhalb des Niveaus der Mikroemulsion lag. Die Ursache dafür waren vermutlich unterschiedliche Diffusionskoeffizienten von Api m 1 in beiden Galenika.

Im Hinblick auf das Penetrationsverhalten von Api m 1 zeigte HG 1 keinen Unterschied zu wirkstoffhaltiger PBS-Kontrolllösung und ist somit für einen therapeutischen Einsatz ungeeignet. Unabhängig von der untersuchten Formulierung war die Penetration von Api m 1 auf die oberste epidermale Schicht, genauer das *Stratum corneum* beschränkt. In einigen der mit Mikroemulsion behandelten Hautproben konnte jedoch nach 24-stündiger Penetrationsdauer auch ein schwaches Fluoreszenzsignal unterhalb des *Stratum corneum* gemessen werden. Dies könnte auf die Bildung eines Api m 1-Depots innerhalb des *Stratum corneum* hindeuten. Solche Wirkstoffdepots wurden bereits von Hadgraft in einem theoretischen Ansatz beschrieben (Hadgraft 1979). Um dieses Postulat zu unterstützen und die Ergebnisse der Penetrationstestungen mit einem klinischen Outcome und immunologischen Veränderungen im Körper zu assoziieren, verwendeten Schuppe et al. (Schuppe et al. 2018) die entwickelte Mikroemulsion in einem Api m 1-allergischen Mausmodell. Die Versuchstiere konnten nach durchgeführter Stichprovokation dosisabhängig vor Anaphylaxien geschützt und dies mit einem Anstieg der Anzahl an Api m 1-spezifischen IgG AK assoziiert werden. In einer Studie von Möbs et al. (Möbs et al. 2015) konnte demonstriert werden, dass eine Allergentoleranz von dieser Antikörper-Subklasse herbeigeführt wird. Weiterführende Untersuchungen könnten dazu dienen das Potential der entwickelten Mikroemulsion und des entwickelten MBO 16 zur dermalen Applikation weiterer Hymenopterenallergene zu evaluieren. Denkbar wäre beispielsweise die Einarbeitung von Wespengiftallergenen, die aufgrund potentieller Kreuzreaktivitäten bei Bienengiftallergikern besondere Relevanz haben (Przybilla et al. 2011). Darüberhinaus konnte in dieser Arbeit eine für Api m 1 optimierte Analytik entwickelt werden. Diese beinhaltete sowohl die Aufarbeitung aus der entwickelten Mikroemulsion mit Hilfe einer Acetonpräzipitation als auch eine sich anschließende RP-HPLC-Analytik. Die entwickelte Methode hatte eine LOD von 1,9 µg/ml und eine LOQ von 5,7 µg/ml, womit die in der Literatur beschriebenen Nachweis- und Bestimmungsgrenzen deutlich unterboten werden konnten (Kokot und Matysiak 2009; Szókán et al. 1994; Pacakova et al. 1995). Um die Methode weiter zu optimieren, könnten weitere Untersuchungen an gestresstem Api 1-Material durchgeführt werden. Dies könnte die Charakterisierung potentieller Degradationsprodukte ermöglichen.

Im Rahmen einer Kurzzeit-Stabilitätsuntersuchung von Api m 1-haltiger Mikroemulsion bei Raumtemperatur konnte die hohe Robustheit des Proteins gezeigt und selbst nach sechzehntägiger Lagerung ein Restproteingehalt von $88,50 \pm 0,36$ % wiedergefunden werden. Jedoch zeigte sich während der Lagerung eine Veränderung im Chromatogramm bezüglich des Verhältnisses von Haupt- zu Nebenpeak. Sowohl durch die HPLC-Analytik als auch mit Hilfe von SDS-PAGE Untersuchungen konnten jedoch keine Hinweise auf eine mögliche Degradation des Proteins gefunden werden. Es wurde daher geschlussfolgert, dass eine Surfactant-induzierte Konformationsänderung die Ursache der Peakveränderung sein könnte. Dies wurde bereits in Studien von Jones (Jones 1992) und Otzen (Otzen 2011) gezeigt. Eine weiterführende Charakterisierung der Api m 1-Peaks (Peak-ID-Studien), beispielsweise durch eine Kopplung von Flüssigkeitschromatographie mit Massenspektrometrie (LC-MS), könnte dies weiter untersuchen und eine weiterführende Methodenoptimierung unterstützen.

Zusammenfassend konnte auf Basis der in dieser Arbeit durchgeführten Analytik, Entwicklungs- und Charakterisierungsarbeit eine stabile Mikroemulsion entwickelt werden, welche die Penetration von Api m 1 in die Haut ermöglicht. Im Rahmen eines kooperativen Projektes konnten Schuppe et al. (Schuppe et al. 2018) deren klinische Wirksamkeit durch einen Anstieg der Anzahl an Api m 1-spezifischen IgG AK in einem Api m 1-allergischen Mausmodell darstellen. Damit konnte diese Arbeit entscheidend zu einem Proof-of-Concept für eine dermale Immuntherapie mit Bienenallergenen beitragen.

5 Zusammenfassung

Sowohl Atopiker als auch nicht-Atopiker sind von IgE-vermittelten, allergischen Reaktionen auf Insektenstiche in etwa gleichem Maße betroffen. Die klinische Manifestation einer solchen Reaktion kann von lokalen Hautreizungen und Schwellungen bis hin zu schweren, systemischen Anaphylaxien mit Herz-Rhythmus-Störungen und Dyspnoe führen. In seltenen Fällen kann eine erfolgte Giftexposition sogar zum Herz-Kreislauf-Stillstand führen. Lediglich die Allergen-spezifische Immuntherapie (AIT) bekämpft die Ursache einer Insektenstichallergie. Für die Behandlung der Bienengiftallergie gibt es bisher jedoch nur die subkutane Anwendungsform. Aufgrund der Invasivität dieser Applikationsart und den damit einhergehenden Nachteilen (Risiko für Nebenwirkungen, z.B. generalisierte Hautausschläge und Atembeschwerden), sowie dem strikten Therapieregime (regelmäßiger Arztbesuch, ärztliche Nachüberwachung etc.), leidet die Patientencompliance. Im Gegensatz zur subkutanen AIT ermöglicht die dermale AIT ein direktes Addressieren der dermalen Zielzellen (z.B. epidermale Langerhans-Zellen), minimiert somit das Nebenwirkungsrisiko und erhöht damit die Patientencompliance. In dieser Arbeit wurden daher Trägersysteme zur dermalen Applikation von Api m 1, dem Majorallergen der europäischen Honigbiene, entwickelt und charakterisiert. Dazu zählten Mikroemulsionen, Mikroemulsion-basierte Organogele (MBO) und Hydrogele. Durch physikochemische Charakterisierungsmethoden (u.a. dynamische Lichtstreuung und Oszillationsrheologie) konnten stabile Formulierungen identifiziert und ausgewählt werden. Basierend auf den Charakterisierungsexperimenten wurden eine Mikroemulsion, ein MBO und ein hyaluronsäuremodifiziertes Hydrogel mit Alexa Fluor™ 647 markiertem Api m 1 beladen und die Penetrationsförderung dieser Formulierungen in einem *ex-vivo* Schweineohrmodell und konfokaler-Laser-Scanning-Mikroskopie untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Mikroemulsion, sowie das MBO die Penetration von Api m 1 in die Haut ermöglichten.

Besonders die Mikroemulsion förderte die Penetration in einem Ausmaß, dass die epidermalen Zielzellen einer AIT aller Voraussicht erreicht werden können. Schuppe et al. (Schuppe et al. 2018) bestätigten dieses Ergebnis durch den Einsatz der entwickelten Mikroemulsion in einem Bienengift-allergischen Mausmodell. Darüber hinaus konnte in dieser Arbeit eine für Api m 1 optimierte Aufarbeitung aus der Mikroemulsion und RP-HPLC Analytik entwickelt werden.

6 Abstract

IgE-mediated allergic reactions to stinging-insects affect atopic and non-atopic equally. The clinic symptoms of such reactions can lead to local skin-reactions and swelling, but also heavy systemic reactions such as cardiovascular disorders or dyspnoea. In rare cases, the exposition to insect-venom can lead to cardiac arrest. Only the allergen-specific immunotherapy (AIT) challenges the cause of a stinging-insect allergy – the treatment of bee-venom allergy is only even possible with subcutaneous applicable therapeutics. Due to the invasiveness of subcutaneous drug administration, its associated risk of side effects (e.g. generalised rashes and respiratory problems) and its very strict therapeutic regime (e.g. doctor's appointment, administration of the therapeutic in a hospital with follow up medical supervision etc.), patient's compliance is a crucial problem. Contrary to a subcutaneous application, a more direct targeting of the dermal dendritic cells (e.g. epidermal Langerhans cells) is possible with dermal AIT. That minimises the risk of unwanted side effects and rises patients' compliance. Therefore, drug delivery systems for the dermal application of Api m 1, bee venom's major allergen, were developed and characterised. This included microemulsions, microemulsion-based organogels and hydrogels. Based on physicochemical characterising methods (e.g. dynamic light scattering and oscillatory rheology), stable formulations were identified and selected. On the account of the characterising-experiments, a microemulsion as well as a microemulsion-based organogel and a hyaluronic acid modified poloxamer-hydrogell were subsequently loaded with Alexa Fluor™ 647-labelled Api m 1 and their penetration enhancement was studied using an *ex-vivo* pig ear model and confocal laser-scanning microscopy. It could be shown that both the microemulsion, as well as the microemulsion-based organogel, enhanced the penetration of Api m 1 into the skin. In particular, the microemulsion enhanced the penetration of Api m 1 to such an extent, that it is likely be able to reach the epidermal target cells of dermal allergen-specific immunotherapy. Schuppe et al. (Schuppe et al. 2018) confirmed this result by using the developed microemulsion in a bee-venom allergic mouse model. Furthermore an analytical workup and a RP-HPLC method for Api m 1 in microemulsion was developed and evaluated.

7 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
A	Ampere
AIT	allergenspezifische Immuntherapie
AK	Antikörper
ANOVA	einfaktorielle Varianzanalyse
APC	Antigenpräsentierende Zelle
API	aktiver pharmazeutischer Inhaltsstoff
Api m 1	Bienen Phospholipase A ₂ , Majorallergen der europäischen Honigbiene
AUC	Fläche unter der Kurve; "Area under the Curve"
ca	circa
CLSM	konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie
cm ²	Quadratcentimeter
DAD	Dioden-Array-Detektor
DMTA	dynamisch-mechanische thermische Analyse
DSL	dynamische Lichtstreuung
EAACI	europäische Gesellschaft für Allergie und Klinische Immunologie
EPIT	epikutane Immuntherapie
etc.	et cetera
Fab	antigenbindendes Fragment
Fc	konstantes Fragment
g	Gramm
G	Gewichtskraft
Gew.-%	Gewichtsprozent
HG	Hydrogel
HMW-HA	hochmolekulare Hyaluronsäure
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
Hy	Hyaluronsäuregel
ICH	International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use
IgE	Immunglobulin E
IgM	Immunglobulin M
IL-13	Interleukin-13
IL-3	Interleukin-3
IL-4	Interleukin-4
IL-5	Interleukin-5
ILIT	intralymphatische Immuntherapie
KBE	koloniebildende Einheiten
KBT	Keimbelastungstest/Konservierungsbelastungstest
kDa	Kilodalton
LMW-HA	niedermolekulare Hyaluronsäure
LOD	Nachweisgrenze, "Limit of Detection"
LOQ	Bestimmungsgrenze, "Limit of Quantification"

LVEB	linear visko-elastischer Bereich
mAU	Milliabsorptionseinheiten
ME	Mikroemulsion
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mPa·s	Millipascalsekunde
MW	Mittelwert
MWCO	molekulare Ausschlussgröße, "molecular weight cut-off"
n.b.	nicht bestimmbar
nm	Nanometer
OD ₆₀₀	optische Dichte bei 600 nm
ÖP	Ölphase
P188	Poloxamer 188
Pa	Pascal
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PDMPD	Phase Diagram by Micro Plate Dilution
PEO	Polyethylenoxid
Po	Poloxamerhydrogel
PPO	Polypropylenoxid
rad/s	Winkelgeschwindigkeit
rH	relative Luftfeuchtigkeit
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SCIT	subkutane Immuntherapie
ScoS	Surfactant-Co-Surfactant(phase)
SD	Standardabweichung
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SLIT	sublinguale Immuntherapie
SMW-HA	standardmolekulare Hyaluronsäure
SP	Surfactant(phase)
TFA	Trifluoressigsäure
TGF- β	transformierender Wachstumsfaktor- β
Treg	regulatorische T-Zellen
T _{SG}	Sol-Gel Übergangstemperatur
V	Volt
VLMW-HA	kleinst-niedermolekulare Hyaluronsäure
Vol.-%	Volumenprozent
WP	Wasserphase

8 Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1:** Therapieformen der AIT; subkutane Injektion von Allergen (SCIT), epidermale Applikation (EPIT), sublinguales Darreichen von Tropfen oder Schmelztabletten (SLIT), intralymphatische Injektion (ILIT); DZ = dendritische Zelle, BZ = B-Lymphozyten, Treg = T-regulatorische-Lymphozyten, IgG = Immunglobulin G, IgE = Immunglobulin - 15 -
- Abbildung 2:** Schematische Darstellung des Hautaufbau und der Hautanhangsgebilde; mit freundlicher Genehmigung von (Spornitz 2002) - 18 -
- Abbildung 3:** Darstellung der Schichten der Epidermis, mit freundlicher Genehmigung von Fritsch (Fritsch 2004)..... - 21 -
- Abbildung 4:** Übersicht über die verschiedenen Zellkontakte, mit freundlicher Genehmigung von Tsukita et al. (Tsukita et al. 2001) - 23 -
- Abbildung 5:** Beispiel eines pseudoternären Diagramms eines Systems aus Wasserphase, Ölphase und Surfactant - 31 -
- Abbildung 6:** Pseudoternäre Diagramme basierend auf Mischungen von Wasserphase (WP; Butylenglykol, Glycerol, PBS 14:3:83 Gew.-%), Ölphase (ÖP; Tegosoft liquid®, Isopropylpalmitat 7: 1 Gew.-%) und Surfactant-/Cosurfactantphase (SCoS; Labrasol®, Plurol oleique®) 10:8 Gew.-% (1a), 11:7 Gew.-% (1b), 11:8 Gew.-% (1c); Raumtemperatur; Mikroemulsionsbereiche dargestellt als gestrichelte Linie, Makroemulsionen/Bereiche mit Phasenseparation dargestellt als durchgezogene Linie - 65 -
- Abbildung 7:** Gegenüberstellung der Ansätze A, B und C aus dem pseudoternären Diagramm 1c (Abbildung 6) und der zugehörigen OD₆₀₀-Werte (Kiselman et al. 2018) - 65 -
- Abbildung 8:** Amplitudensweep des Mikroemulsions-basierten Organogels (MBO) 16 an Tag 1 der Lagerungsstabilität, 72 Stunden nach Herstellung, Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (MW ± SD; n = 3), MBO 16 = 1,0 Gew.-% Aerosil®, 3,75 Gew.-% Natriumalginat, Kreisfrequenz = 10 rad/s; Messtemperatur = 25 °C, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt = 500 µm - 82 -
- Abbildung 9:** Amplitudensweep des Mikroemulsions-basierten Organogels (MBO) 18 an Tag 1 der Lagerungsstabilität, 72 Stunden nach Herstellung, Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (MW ± SD; n = 3), MBO 18 = 1,0 Gew.-% Alginat®, 3,0 Gew.-% Natriumalginat, 1,0 Gew.-% Dehydroxanthan, Kreisfrequenz = 10 rad/s; Messtemperatur = 25 °C, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt = 500 µm..... - 82 -
- Abbildung 10:** Frequenzsweep des Mikroemulsions-basierten Organogels (MBO) 16 an Tag 1 der Lagerungsstabilität, 72 Stunden nach Herstellung, Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (MW ± SD; n = 3), MBO 16 = 1,0 Gew.-% Aerosil®, 3,75 Gew.-% Natriumalginat, Scherdeformation = 0,25 %, Messtemperatur = 25 °C, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt = 500 µm - 88 -

Abbildung 11: Frequenzsweep des Mikroemulsions-basierten Organogels (MBO) 18 an Tag 1 der Lagerungsstabilität, 72 Stunden nach Herstellung, Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (MW \pm SD; n = 3), MBO 18 = 1,0 Gew.-% Alginate®, 3,0 Gew.-% Natriumalginat, 1,0 Gew.-% Dehydroxanthan, Scherdeformation = 0,25 %, Messtemperatur = 25 °C, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt = 500 μ m - 88 -

Abbildung 12: Temperatursweep des Mikroemulsions-basierten Organogels (MBO) 16 an Tag 1 der Lagerungsstabilität, 72 Stunden nach Herstellung, Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (MW \pm SD; n = 3), MBO 16 = 1,0 Gew.-% Aerosil®, 3,75 Gew.-% Natriumalginat, Scherdeformation = 0,25 %, Kreisfrequenz = 10 rad/s, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt = 500 μ m - 92 -

Abbildung 13: Temperatursweep des Mikroemulsions-basierten Organogels (MBO) 18 an Tag 1 der Lagerungsstabilität, 72 Stunden nach Herstellung, Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (MW \pm SD; n = 3), MBO 18 = 1,0 Gew.-% Alginate®, 3,0 Gew.-% Natriumalginat, 1,0 Gew.-% Dehydroxanthan, Scherdeformation = 0,25 %, Kreisfrequenz = 10 rad/s, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt = 500 μ m - 92 -

Abbildung 14: Durchlichtmikroskopische Aufnahme (10x Objektiv) von MBO 16 am Tag der Herstellung (A) und nach einmonatiger Lagerung bei 25 °C, 60 %rH (B)..... - 96 -

Abbildung 15: Durchlichtmikroskopische Aufnahme (10x Objektiv) von MBO 18 am Tag der Herstellung (A) und nach einmonatiger Lagerung bei 25 °C, 60 %rH (B)..... - 96 -

Abbildung 16: Graphische Darstellung des Verlaufs des Speichermoduls G' bei Temperaturerhöhung, Scherdeformation = 0,5 %, Kreisfrequenz = 10 rad/s, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt = 500 μ m - 101 -

Abbildung 17: Gelstärke der hyaluronsäuremodifizierten Poloxamergele, Gelstärke als Speichermodul G' [Pa], alle Formulierungen beinhalten neben dem Hyaluronsäureanteil 18,0 Gew.-% Poloxamer 407 und 15,0 Gew.-% Poloxamer 188 - 105 -

Abbildung 18: Amplitudensweep des Hydrogels 1 an Tag 1 der Lagerungsstabilität, 24 Stunden nach der Herstellung, Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (MW \pm SD; n = 3), Hydrogel 1 = 1,0 % VLMW-HA, 18,0 % P407, 15,0 % P188, Kreisfrequenz = 10 rad/s, Messtemperatur = 25 °C, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt 500 μ m .. - 111 -

Abbildung 19: Amplitudensweep des Hydrogels 2 an Tag 1 der Lagerungsstabilität, 24 Stunden nach der Herstellung, Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (MW \pm SD; n = 3), Hydrogel 2 = 18,0 % P407, 15,0 % P188, 1,0 % LMW-HA, Kreisfrequenz = 10 rad/s, Messtemperatur = 25 °C, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt 500 μ m .. - 111 -

Abbildung 20: Frequenzsweep des Hydrogels 1 an Tag 1 der Lagerungsstabilität, 24 Stunden nach der Herstellung, Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (MW \pm SD; n = 3), Hydrogel 1 = 1,0 % VLMW-HA, 18,0 % P407, 15,0 % P188, Scherdeformation = 0,25 %, Messtemperatur = 25 °C, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt 500 μ m - 116 -

Abbildung 21: Frequenzsweep des Hydrogels 2 an Tag 1 der Lagerungsstabilität, 24 Stunden nach der Herstellung, Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (MW \pm SD; n = 3), Hydrogel 2 = 18,0 % P407, 15,0 % P188, 1,0 % LMW-HA, Scherdeformation = 0,25 %, Messtemperatur = 25 °C, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt 500 μ m - 116 -

Abbildung 22: Temperatursweep des Hydrogels 1 an Tag 1 der Lagerungsstabilität, 24 Stunden nach der Herstellung, Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (MW \pm SD; n = 3), Hydrogel 1 = 1,0 % VLMW-HA, 18,0 % P407, 15,0 % P188, Scherdeformation = 0,25 %, Kreisfrequenz = 10 rad/s, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt 500 μ m - 119 -

Abbildung 23: Temperatursweep des Hydrogels 2 an Tag 1 der Lagerungsstabilität, 24 Stunden nach der Herstellung, Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (MW \pm SD; n = 3), Hydrogel 2 = 18,0 % P407, 15,0 % P188, 1,0 % LMW-HA, Scherdeformation = 0,25 %, Kreisfrequenz = 10 rad/s, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt 500 μ m - 119 -

Abbildung 24: Amplitudensweep des Hydrogels 3 an Tag 1 der Lagerungsstabilität, 24 Stunden nach der Herstellung, Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (MW \pm SD; n = 3), Hydrogel 3 = 1,0 % VLMW-HA, 1,0 % HMW-HA, Kreisfrequenz = 10 rad/s, Messtemperatur = 25 °C, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt 500 μ m - 122 -

Abbildung 25: Amplitudensweep des Hydrogels 4 an Tag 1 der Lagerungsstabilität, 24 Stunden nach der Herstellung, Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (MW \pm SD; n = 3), Hydrogel 4 = 1,0 % LMW-HA, 1,5 % SMW-HA, Kreisfrequenz = 10 rad/s, Messtemperatur = 25 °C, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt 500 μ m - 122 -

Abbildung 26: Frequenzsweep des Hydrogels 3 an Tag 1 der Lagerungsstabilität, 24 Stunden nach der Herstellung, Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (MW \pm SD; n = 3), Hydrogel 3 = 1,0 % VLMW-HA, 1,0 % HMW-HA, Scherdeformation = 5,0 %, Messtemperatur = 25 °C, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt 500 μ m - 127 -

Abbildung 27: Frequenzsweep des Hydrogels 4 an Tag 1 der Lagerungsstabilität, 24 Stunden nach der Herstellung, Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (MW \pm SD; n = 3), Hydrogel 4 = 1,0 % LMW-HA, 1,5 % SMW-HA, Scherdeformation = 5,0 %, Messtemperatur = 25 °C, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt 500 μ m - 127 -

Abbildung 28: Temperatursweep des Hydrogels 3 an Tag 1 der Lagerungsstabilität, 24 Stunden nach der Herstellung, Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (MW \pm SD; n = 3), Hydrogel 3 = 1,0 % VLMW-HA, 1,0 % HMW-HA, Scherdeformation = 5,0 %, Kreisfrequenz = 10 rad/s, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt 500 μ m - 129 -

Abbildung 29: Temperatursweep des Hydrogels 4 an Tag 1 der Lagerungsstabilität, 24 Stunden nach der Herstellung, Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (MW \pm SD; n = 3), Hydrogel 4 = 1,0 % LMW-HA, 1,5% SMW-HA, Scherdeformation = 5,0 %, Messtemperatur = 25 °C, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt 500 μ m - 129 -

Abbildung 30: Überlagerte CLSM-Bilder aus Fluoreszenzsignal und Durchlichtbild der vertikalen Kryoschnitte der Schweineohr-Proben nach achtstündiger Applikationsdauer und deren statistische Auswertung; obere Reihe: Mikroemulsion mit Allergenen (ME (+)), Mikroemulsion-basiertes Organogel 16 mit Allergenen (MBO 16 (+)), untere Reihe: Hydrogel 1 mit Allergenen (HG 1 (+)) und PBS mit Allergenen (PBS (+)); Graph: Spektralauswertung der CLSM-Bilder präsentiert als MW \pm SD, n = 3 für ME (+), MBO 16 (+) und HG 1 (+); n = 2 für PBS (+), Auf Signifikanz (*) wurde mittels einseitigem ANOVA gefolgt von einem Tukey-Test getestet (p < 0,05). - 132 -

Abbildung 31: Überlagerte CLSM-Bilder aus Fluoreszenzsignal und Durchlichtbild der vertikalen Kryoschnitte der Schweineohr-Proben nach 24-stündiger Applikationsdauer und deren statistische Auswertung; oben: Mikroemulsion ohne Allergen (ME (-)), PBS mit Allergen (PBS (+)), Mikroemulsion mit Allergen (ME (+)); unten: Daten der Spektralauswertung der CLSM-Bilder präsentiert als MW ± SD (n = 4), auf Signifikanz (*) wurde mittels einseitigem ANOVA gefolgt von einem Tukey Test getestet (p < 0,05). (Kiselman et al. 2018)..... - 138 -

Abbildung 32: Chromatogramm von Api m 1 in PBS (c = 0,1 mg/ml), Säule: Phenomenex Jupiter® C18 (300 Å, 5 µm 100x4,6 mm), Temperatur = 25 °C, Absorption in Millivolt (mV), Detektionswellenlänge = 220 nm, Flussrate = 1,0 ml/min, Eluent A: Acetonitril + 0,1 % TFA, Eluent B: Gereinigtes Wasser + 0,1 % TFA, Gradient (min, %A): (0; 5), (5; 5) (20; 52), (25; 80), (30; 100), (35; 5), (40; 5); Peaks: 1 = Injektionspeak, 2 = Api m 1 Vorpeak, 3 = Api m 1 Hauptpeak - 142 -

Abbildung 33: Chromatogramm von Methodenverkürzung 1 von Api m 1 in PBS (c = 0,1 mg/ml), Säule: Phenomenex Jupiter® C18 (300 Å, 5 µm 100x4,6 mm), Säulenofentemperatur = 25 °C, Absorption in Millivolt (mV), Detektionswellenlänge = 220 nm, Flussrate = 0,75 ml/min, Eluent A: Acetonitril + 0,1 % TFA, Eluent B: Gereinigtes Wasser + 0,1 % TFA, Gradient (min, %A): (0; 5), (3; 5) (10,5; 52), (15,5; 80), (20; 100), (24; 5), (26; 5);, Peaks: 1 = Injektionspeak, 2 = Api m 1 Vorpeak, 3 = Api m 1 Hauptpeak - 146 -

Abbildung 34: Chromatogramm von Methodenverkürzung 2 von Api m 1 in PBS (c = 0,1 mg/ml), Säule: Phenomenex Jupiter® C18 (300 Å, 5µm 100x4,6 mm), Säulenofentemperatur = 25 °C, Absorption in Millivolt (mV), Detektionswellenlänge = 220 nm, Flussrate = 0,75 ml/min, Eluent A: Acetonitril + 0,1 % TFA, Eluent B: Gereinigtes Wasser + 0,1 % TFA, Gradient (min, %A): (0; 5), (3; 5) (10,5; 52), (12; 95), (17; 95), (20; 5), (26; 5); Peaks: 1 = Injektionspeak, 2 = Api m 1 Vorpeak, 3 = Api m 1 Hauptpeak - 148 -

Abbildung 35: Chromatogramm von Methodenverkürzung 3 von Api m 1 in PBS (c = 0,1 mg/ml), Säule: Phenomenex Jupiter® C18 (300 Å, 5µm 100x4,6 mm), Säulenofentemperatur = 25 °C, Absorption in Millivolt (mV), Detektionswellenlänge = 220 nm, Flussrate = 0,75 ml/min, Eluent A: Acetonitril + 0,1 % TFA, Eluent B: Gereinigtes Wasser + 0,1 % TFA, Gradient (min, %A): (0; 5), (3; 5) (10,5; 52), (12; 95), (18; 95), (21; 5), (27; 5); Peaks: 1 = Injektionspeak, 2 = Api m 1 Vorpeak, 3 = Api m 1 Hauptpeak - 150 -

Abbildung 36: Chromatogramm von Methodenverkürzung 4 von Api m 1 in PBS (c = 0,1 mg/ml), Säule: Phenomenex Jupiter® C18 (300 Å, 5µm 100x4,6 mm), Säulenofentemperatur = 25 °C, Absorption in Millivolt (mV), Detektionswellenlänge = 220 nm, Flussrate = 0,75 ml/min, Eluent A: Acetonitril + 0,1 % TFA, Eluent B: Gereinigtes Wasser + 0,1 % TFA, Gradient (min, %A): (0; 5), (3; 5) (10,5; 52), (12; 95), (19; 95), (22; 5), (28; 5); Peaks: 1 = Injektionspeak, 2 = Api m 1 Vorpeak, 3 = Api m 1 Hauptpeak - 150 -

Abbildung 37: Chromatogramme von wässriger Api m 1 Stammlösung (0,01 mg/ml) nach einer Filtration durch einen Rotationsfilter mit einem molekularen Cut-Off von 3 kD; Analyse des Filtrats (a), Analyse des wiederaufgeschwämmten Filtrerrückstandes (b) - 153 -

Abbildung 38: Chromatogramme von wässriger Api m 1 Stammlösung (0,01 mg/ml) nach einer Filtration durch einen Rotationsfilter mit einem molekularen Cut-Off von 10 kD; Analyse des Filtrats (a), Analyse des wiederaufgeschwämmten Filtrerrückstandes (b) - 155 -

Abbildung 39: Chromatogramme von Api m 1 in Mikroemulsion (0,01 mg/ml) nach einer Filtration durch einen Rotationsfilter mit einem molekularen Cut-Off von 10 kD; Analyse des Filtrats (a), Analyse des wiederaufgeschwämmten Filtrerrückstandes (b) - 156 -

Abbildung 40: Vergleich der Ausbeuten der HPLC-Analyse von Api m 1 in Mikroemulsion [1 mg/ml] nach vorheriger Extraktion, Acetonextraktion (Ac); Acetonextraktion + 50 µl Ameisensäure (Ac+AS); Methanol-Chloroform-Extraktion (M+C); MW ± SD (n = 3); Area under the curve (AUC); Detektionswellenlänge = 220 nm - 158 -

Abbildung 41: HPLC-Chromatogramme von: Api m 1 in PBS [1 mg/ml] (a), aufgearbeiteter Api m 1-haltiger Mikroemulsion [1 mg/ml] (b) und aufgearbeiteter Placebo-Mikroemulsion (c), Detektionswellenlänge = 220 nm, Flussrate = 0,75 ml/min, Eluent A: Acetonitril + 0,1 % TFA, Eluent B: Gereinigtes Wasser + 0,1 % TFA, Gradient (min, %A): (0; 5), (5; 5) (20; 52), (25; 80), (30; 100), (35; 5), (40; 5); Absorption in Milliabsorptionseinheiten (mAU) - 166 -

Abbildung 42: HPLC-Chromatogramme von Api m 1 in Mikroemulsion [1 mg/ml] nach vorheriger Probenaufarbeitung mittels Acetonfällung zum Start der Stabilitätsuntersuchungen (a), nach eintägiger (b) und nach dreitägiger Lagerung bei Raumtemperatur (c), Detektionswellenlänge = 220 nm, Flussrate = 0,75 ml/min, Eluent A: Acetonitril + 0,1 % TFA, Eluent B: Gereinigtes Wasser + 0,1 % TFA, Gradient (min, %A): (0; 5), (5; 5) (20; 52), (25; 80), (30; 100), (35; 5), (40; 5); Absorption in Milliabsorptionseinheiten (mAU) - 173 -

Abbildung 43: Viskositätsmessung der Mikroemulsion an Tag 1 der Lagerungsstabilitätsuntersuchung; Scherrate in logarhythmischer Rampe (500-1000 1/s), Messtemperatur = 25 °C, Kegel-Platte Messapparatur (Durchmesser 40 mm, Kegelwinkel 1°, Messspalt 80 µm), Viskosität in mPa·s als MW ± SD (n = 3) - 212 -

Abbildung 44: Viskositätsmessung der Mikroemulsion an Monat 3 der Lagerungsstabilitätsuntersuchung, Scherrate in logarhythmischer Rampe (500-1000 1/s), Messtemperatur = 25 °C, Kegel-Platte Messapparatur (Durchmesser 40 mm, Kegelwinkel 1°, Messspalt 80 µm), Viskosität in mPa·s als MW ± SD (n = 3) - 212 -

Abbildung 45: Amplitudensweep des Mikroemulsion-basierten Organogels 1 (MBO 1), 24 Stunden nach Herstellung. Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (Einfachbestimmung), Zusammensetzung = 2,5 Gew.-% Aerosil®, 3,75 Gew.-% Natriumalginat, 5,0 Gew.-% Dehydroxanthan; Kreisfrequenz = 10 rad/s; Messtemperatur = 25 °C, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt = 500 µm - 218 -

Abbildung 46: Amplitudensweep des Mikroemulsion-basierten Organogels 2 (MBO 2), 24 Stunden nach Herstellung. Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (Einfachbestimmung), Zusammensetzung = 7,50 Gew.-% Natriumalginat, 5,0 Gew.-% Dehydroxanthan; Kreisfrequenz = 10 rad/s; Messtemperatur = 25 °C, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt = 500 μm - 218 -

Abbildung 47: Amplitudensweep des Mikroemulsion-basierten Organogels 11 (MBO 11), 24 Stunden nach Herstellung. Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (Einfachbestimmung), Zusammensetzung = 3,75 Gew.-% Natriumalginat, 10,0 Gew.-% Dehydroxanthan; Kreisfrequenz = 10 rad/s; Messtemperatur = 25 °C, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt = 500 μm - 219 -

Abbildung 48: Amplitudensweep des Mikroemulsion-basierten Organogels 15 (MBO 15), 24 Stunden nach Herstellung. Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (Einfachbestimmung), Zusammensetzung = 3,75 Gew.-% Natriumalginat, 2,5 Gew.-% Dehydroxanthan; Kreisfrequenz = 10 rad/s; Messtemperatur = 25 °C, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt = 500 μm - 219 -

Abbildung 49: Amplitudensweep des Mikroemulsion-basierten Organogels 16 (MBO 16), 24 Stunden nach Herstellung. Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (Einfachbestimmung), Zusammensetzung = 1,0 Gew.-% Aerosil®, 3,75 Gew.-% Natriumalginat; Kreisfrequenz = 10 rad/s; Messtemperatur = 25 °C, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt = 500 μm - 220 -

Abbildung 50: Amplitudensweep des Mikroemulsion-basierten Organogels 17 (MBO 17), 24 Stunden nach Herstellung. Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (Einfachbestimmung), Zusammensetzung = 1,0 Gew.-% Aerosil®, 3,5 Gew.-% Natriumalginat, 2,5 Gew.-% Dehydroxanthan; Kreisfrequenz = 10 rad/s; Messtemperatur = 25 °C, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt = 500 μm - 220 -

Abbildung 51: Amplitudensweep des Mikroemulsion-basierten Organogels 18 (MBO 18), 24 Stunden nach Herstellung. Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (Einfachbestimmung), Zusammensetzung = 1,0 Gew.-% Aerosil®, 3,0 Gew.-% Natriumalginat, 1,0 Gew.-% Dehydroxanthan; Kreisfrequenz = 10 rad/s; Messtemperatur = 25 °C, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt = 500 μm - 221 -

Abbildung 52: Amplitudensweep des Mikroemulsion-basierten Organogels 19 (MBO 19), 24 Stunden nach Herstellung. Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (Einfachbestimmung), Zusammensetzung = 1,0 Gew.-% Aerosil®, 3,5 Gew.-% Natriumalginat, 1,0 Gew.-% Dehydroxanthan; Kreisfrequenz = 10 rad/s; Messtemperatur = 25 °C, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt = 500 μm - 221 -

Abbildung 53: Amplitudensweep des Mikroemulsion-basierten Organogels 20 (MBO 20), 24 Stunden nach Herstellung. Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (Einfachbestimmung), Zusammensetzung = 1,0 Gew.-% Aerosil®, 4,0 Gew.-% Natriumalginat, 1,5 Gew.-% Dehydroxanthan; Kreisfrequenz = 10 rad/s; Messtemperatur = 25 °C, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt = 500 μm - 222 -

Abbildung 54: Amplitudensweep des Mikroemulsion-basierten Organogels 21 (MBO 21), 24 Stunden nach Herstellung. Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (Einfachbestimmung), Zusammensetzung = 1,5 Gew.-% Aerosil®, 3,5 Gew.-% Natriumalginat, 1,5 Gew.-% Dehydroxanthan; Kreisfrequenz = 10 rad/s; Messtemperatur = 25 °C, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt = 500 μm - 222 -

Abbildung 55: Amplitudensweep des Mikroemulsion-basierten Organogels 22 (MBO 22), 24 Stunden nach Herstellung. Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (Einfachbestimmung), Zusammensetzung = 1,75 Gew.-% Aerosil®, 3,5 Gew.-% Natriumalginat, 1,5 Gew.-% Dehydroxanthan; Kreisfrequenz = 10 rad/s; Messtemperatur = 25 °C, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt = 500 μm - 223 -

Abbildung 56: Amplitudensweep des Mikroemulsion-basierten Organogels 23 (MBO 23), 24 Stunden nach Herstellung. Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (Einfachbestimmung), Zusammensetzung = 2,0 Gew.-% Aerosil®, 3,5 Gew.-% Natriumalginat, 1,5 Gew.-% Dehydroxanthan; Kreisfrequenz = 10 rad/s; Messtemperatur = 25 °C, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt = 500 μm - 223 -

Abbildung 57: Amplitudensweep des Mikroemulsion-basierten Organogels 16 (MBO 16) an Tag 1 der Lagerungsstabilitäts-Untersuchung. Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (MW \pm SD; n = 3), Zusammensetzung = 1,0 Gew.-% Aerosil®, 3,75 Gew.-% Natriumalginat; Kreisfrequenz = 10 rad/s; Messtemperatur = 25 °C, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt = 500 μm - 224 -

Abbildung 58: Amplitudensweep des Mikroemulsion-basierten Organogels 16 (MBO 16) nach einmonatiger Lagerung bei 25 °C, 60 %rH (relative Luftfeuchtigkeit). Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (MW \pm SD; n = 3), Zusammensetzung = 1,0 Gew.-% Aerosil®, 3,75 Gew.-% Natriumalginat; Kreisfrequenz = 10 rad/s; Messtemperatur = 25 °C, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt = 500 μm - 224 -

Abbildung 59: Amplitudensweep des Mikroemulsion-basierten Organogels 16 (MBO 16) nach einmonatiger Lagerung bei 40 °C, 75 %rH (relative Luftfeuchtigkeit). Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (MW \pm SD; n = 3), Zusammensetzung = 1,0 Gew.-% Aerosil®, 3,75 Gew.-% Natriumalginat; Kreisfrequenz = 10 rad/s; Messtemperatur = 25 °C, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt = 500 μm - 225 -

Abbildung 60: Amplitudensweep des Mikroemulsion-basierten Organogels 18 (MBO 18) an Tag 1 der Lagerungsstabilitäts-Untersuchung. Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (MW \pm SD; n = 3), Zusammensetzung = 1,0 Gew.-% Aerosil®, 3,0 Gew.-% Natriumalginat, 1,0 Gew.-% Dehydroxanthan; Kreisfrequenz = 10 rad/s; Messtemperatur = 25 °C, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt = 500 μm - 225 -

Abbildung 61: Amplitudensweep des Mikroemulsion-basierten Organogels 18 (MBO 18) nach einmonatiger Lagerung bei 25 °C, 60 %rH (relative Luftfeuchtigkeit). Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (MW \pm SD; n = 3), Zusammensetzung = 1,0 Gew.-% Aerosil®, 3,0 Gew.-% Natriumalginat, 1,0 Gew.-% Dehydroxanthan; Kreisfrequenz = 10 rad/s; Messtemperatur = 25 °C, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt = 500 μm
..... - 226 -

Abbildung 62: Frequenzsweep des Mikroemulsion-basierten Organogels 16 (MBO 16) an Tag 1 der Lagerungsstabilitäts-Untersuchung. Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (MW \pm SD; n = 3), Zusammensetzung = 1,0 Gew.-% Aerosil®, 3,75 Gew.-% Natriumalginat; Scherdeformation = 0,25 %; Messtemperatur = 25 °C, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt = 500 μ m - 226 -

Abbildung 63: Frequenzsweep des Mikroemulsion-basierten Organogels 16 (MBO 16) nach einmonatiger Lagerung bei 25 °C, 60 %rH (relative Luftfeuchtigkeit). Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (MW \pm SD; n = 3), Zusammensetzung = 1,0 Gew.-% Aerosil®, 3,75 Gew.-% Natriumalginat; Scherdeformation = 0,25 %; Messtemperatur = 25 °C, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt = 500 μ m - 227 -

Abbildung 64: Frequenzsweep des Mikroemulsion-basierten Organogels 16 (MBO 16) nach einmonatiger Lagerung bei 40 °C, 75 %rH (relative Luftfeuchtigkeit). Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (MW \pm SD; n = 3), Zusammensetzung = 1,0 Gew.-% Aerosil®, 3,75 Gew.-% Natriumalginat; Scherdeformation = 0,25 %; Messtemperatur = 25 °C, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt = 500 μ m - 227 -

Abbildung 65: Frequenzsweep des Mikroemulsion-basierten Organogels 18 (MBO 18) an Tag 1 der Lagerungsstabilitäts-Untersuchung. Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (MW \pm SD; n = 3), Zusammensetzung = 1,0 Gew.-% Aerosil®, 3,0 Gew.-% Natriumalginat, 1,0 Gew.-% Dehydroxanthan; Scherdeformation = 0,25 %; Messtemperatur = 25 °C, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt = 500 μ m - 228 -

Abbildung 66: Frequenzsweep des Mikroemulsion-basierten Organogels 18 (MBO 18) nach einmonatiger Lagerung bei 25 °C, 60 %rH (relative Luftfeuchtigkeit). Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (MW \pm SD; n = 3), Zusammensetzung = 1,0 Gew.-% Aerosil®, 3,0 Gew.-% Natriumalginat, 1,0 Gew.-% Dehydroxanthan; Scherdeformation = 0,25 %; Messtemperatur = 25 °C, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt = 500 μ m - 228 -

Abbildung 67: Temperatursweep des Mikroemulsion-basierten Organogels 16 (MBO 16) an Tag 1 der Lagerungsstabilitäts-Untersuchung. Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (MW \pm SD; n = 3), Zusammensetzung = 1,0 Gew.-% Aerosil®, 3,75 Gew.-% Natriumalginat; Scherdeformation = 0,25 %; Kreisfrequenz = 10 rad/s, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt = 500 μ m - 229 -

Abbildung 68: Temperatursweep des Mikroemulsion-basierten Organogels 16 (MBO 16) nach einmonatiger Lagerung bei 25 °C, 60 %rH (relative Luftfeuchtigkeit). Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (MW \pm SD; n = 3), Zusammensetzung = 1,0 Gew.-% Aerosil®, 3,75 Gew.-% Natriumalginat; Scherdeformation = 0,25 %; Kreisfrequenz = 10 rad/s, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt = 500 μ m - 229 -

Abbildung 69: Temperatursweep des Mikroemulsion-basierten Organogels 16 (MBO 16) nach einmonatiger Lagerung bei 40 °C, 75 %rH (relative Luftfeuchtigkeit). Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (MW \pm SD; n = 3), Zusammensetzung = 1,0 Gew.-% Aerosil®, 3,75 Gew.-% Natriumalginat; Scherdeformation = 0,25 %; Kreisfrequenz = 10 rad/s, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt = 500 μ m - 230 -

Abbildung 70: Temperatursweep des Mikroemulsion-basierten Organogels 18 (MBO 18) an Tag 1 der Lagerungsstabilitäts-Untersuchung. Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (MW \pm SD; n = 3), Zusammensetzung = 1,0 Gew.-% Aerosil®, 3,0 Gew.-% Natriumalginat, 1,0 Gew.-% Dehydroxanthan; Scherdeformation = 0,25 %; Kreisfrequenz = 10 rad/s, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt = 500 μ m - 230 -

Abbildung 71: Temperatursweep des Mikroemulsion-basierten Organogels 18 (MBO 18) nach einmonatiger Lagerung bei 25 °C, 60 %rH (relative Luftfeuchtigkeit). Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (MW \pm SD; n = 3), Zusammensetzung = 1,0 Gew.-% Aerosil®, 3,0 Gew.-% Natriumalginat, 1,0 Gew.-% Dehydroxanthan; Scherdeformation = 0,25 %; Kreisfrequenz = 10 rad/s, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt = 500 μ m..... - 231 -

Abbildung 72: Amplitudensweep des Poloxamer-Hydrogels 3 (Po 3), 24 Stunden nach Herstellung. Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (Einfachbestimmung), Zusammensetzung = 16,0 Gew.-% Poloxamer 407; Kreisfrequenz = 10 rad/s, Messtemperatur = 32 °C, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt = 500 μ m - 232 -

Abbildung 73: Temperatursweep des Poloxamer-Hydrogels 3 (Po 3), 24 Stunden nach Herstellung. Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (Einfachbestimmung), Zusammensetzung = 16,0 Gew.-% Poloxamer 407; Scherdeformation = 0,5 %, Kreisfrequenz = 10 rad/s, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt = 500 μ m - 232 -

Abbildung 74: Amplitudensweep des Poloxamer-Hydrogels 4 (Po 4), 24 Stunden nach Herstellung. Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (Einfachbestimmung), Zusammensetzung = 16,0 Gew.-% Poloxamer 407, 15,0 Gew.-% Poloxamer 188; Kreisfrequenz = 10 rad/s, Messtemperatur = 32 °C, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt = 500 μ m - 233 -

Abbildung 75: Temperatursweep des Poloxamer-Hydrogels 4 (Po 4), 24 Stunden nach Herstellung. Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (Einfachbestimmung), Zusammensetzung = 16,0 Gew.-% Poloxamer 407, 15,0 Gew.-% Poloxamer 188; Scherdeformation = 0,5 %, Kreisfrequenz = 10 rad/s, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt = 500 μ m - 233 -

Abbildung 76: Amplitudensweep des Poloxamer-Hydrogels 5 (Po 5), 24 Stunden nach Herstellung. Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (Einfachbestimmung), Zusammensetzung = 16,0 Gew.-% Poloxamer 407, 10,0 Gew.-% Poloxamer 188; Kreisfrequenz = 10 rad/s, Messtemperatur = 32 °C, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt = 500 μ m - 234 -

Abbildung 77: Temperatursweep des Poloxamer-Hydrogels 5 (Po 5), 24 Stunden nach Herstellung. Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (Einfachbestimmung), Zusammensetzung = 16,0 Gew.-% Poloxamer 407, 10,0 Gew.-% Poloxamer 188; Scherdeformation = 0,5 %, Kreisfrequenz = 10 rad/s, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt = 500 μ m - 234 -

Abbildung 78: Amplitudensweep des Poloxamer-Hydrogels 6 (Po 6), 24 Stunden nach Herstellung. Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (Einfachbestimmung), Zusammensetzung = 16,0 Gew.-% Poloxamer 407, 5,0 Gew.-% Poloxamer 188; Kreisfrequenz = 10 rad/s, Messtemperatur = 32 °C, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt = 500 μ m - 235 -

Abbildung 79: Temperatursweep des Poloxamer-Hydrogels 6 (Po 6), 24 Stunden nach Herstellung. Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (Einfachbestimmung), Zusammensetzung = 16,0 Gew.-% Poloxamer 407, 5,0 Gew.-% Poloxamer 188; Scherdeformation = 0,5 %, Kreisfrequenz = 10 rad/s, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt = 500 μm - 235 -

Abbildung 80: Amplitudensweep des Poloxamer-Hydrogels 7 (Po 7), 24 Stunden nach Herstellung. Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (Einfachbestimmung), Zusammensetzung = 18,0 Gew.-% Poloxamer 407, 15,0 Gew.-% Poloxamer 188; Kreisfrequenz = 10 rad/s, Messtemperatur = 32 °C, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt = 500 μm - 236 -

Abbildung 81: Temperatursweep des Poloxamer-Hydrogels 7 (Po 7), 24 Stunden nach Herstellung. Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (Einfachbestimmung), Zusammensetzung = 18,0 Gew.-% Poloxamer 407, 15,0 Gew.-% Poloxamer 188; Scherdeformation = 0,5 %, Kreisfrequenz = 10 rad/s, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt = 500 μm - 236 -

Abbildung 82: Amplitudensweep des Hyaluronsäure-Hydrogels 2 (Hy 2), 24 Stunden nach Herstellung. Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (Einfachbestimmung), Zusammensetzung = 1,0 Gew.-% VLMW-HA, 1,0 Gew.-% HMW-HA; Kreisfrequenz = 10 rad/s, Messtemperatur = 32 °C, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt = 500 μm
..... - 237 -

Abbildung 83: Amplitudensweep des Hyaluronsäure-Hydrogels 3 (Hy 3), 24 Stunden nach Herstellung. Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (Einfachbestimmung), Zusammensetzung = 1,0 Gew.-% VLMW-HA, 1,0 Gew.-% SMW-HA; Kreisfrequenz = 10 rad/s, Messtemperatur = 32 °C, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt = 500 μm
..... - 237 -

Abbildung 84: Amplitudensweep des Hyaluronsäure-Hydrogels 4 (Hy 4), 24 Stunden nach Herstellung. Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (Einfachbestimmung), Zusammensetzung = 1,0 Gew.-% VLMW-HA, 1,0 Gew.-% SMW-HA, 1,0 Gew.-% HMW-HA; Kreisfrequenz = 10 rad/s, Messtemperatur = 32 °C, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt = 500 μm - 238 -

Abbildung 85: Amplitudensweep des Hyaluronsäure-Hydrogels 7 (Hy 7), 24 Stunden nach Herstellung. Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (Einfachbestimmung), Zusammensetzung = 1,0 Gew.-% LMW-HA, 1,0 Gew.-% HMW-HA; Kreisfrequenz = 10 rad/s, Messtemperatur = 32 °C, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt = 500 μm
..... - 238 -

Abbildung 86: Amplitudensweep des Hyaluronsäure-Hydrogels 9 (Hy 9), 24 Stunden nach Herstellung. Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (Einfachbestimmung), Zusammensetzung = 1,0 Gew.-% HMW-HA; Kreisfrequenz = 10 rad/s, Messtemperatur = 32 °C, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt = 500 μm - 239 -

Abbildung 87: Amplitudensweep des Hyaluronsäure-Hydrogels 10 (Hy 10), 24 Stunden nach Herstellung. Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (Einfachbestimmung), Zusammensetzung = 2,0 Gew.-% SMW-HA; Kreisfrequenz = 10 rad/s, Messtemperatur = 32 °C, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt = 500 μm - 239 -

Abbildung 88: Amplitudensweep des Hyaluronsäure-modifizierten Poloxamergels 1 (HyPo 1), 72 Stunden nach Herstellung. Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (Einfachbestimmung), Zusammensetzung = 18,0 Gew.-% P407, 15,0 Gew.-% P188, 0,5 Gew.-% VLMW-HA; Kreisfrequenz = 10 rad/s, Messtemperatur = 32 °C, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt = 500 μm - 240 -

Abbildung 89: Temperatursweep des Hyaluronsäure-modifizierten Poloxamergels 1 (HyPo 1), 120 Stunden nach Herstellung. Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (Einfachbestimmung), Zusammensetzung = 18,0 Gew.-% P407, 15,0 Gew.-% P188, 0,5 Gew.-% VLMW-HA; Scherdeformation = 0,5 %, Kreisfrequenz = 10 rad/s, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt = 500 μm - 240 -

Abbildung 90: Amplitudensweep des Hyaluronsäure-modifizierten Poloxamergels 2 (HyPo 2), 72 Stunden nach Herstellung. Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (Einfachbestimmung), Zusammensetzung = 18,0 Gew.-% P407, 15,0 Gew.-% P188, 1,0 Gew.-% VLMW-HA; Kreisfrequenz = 10 rad/s, Messtemperatur = 32 °C, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt = 500 μm - 241 -

Abbildung 91: Temperatursweep des Hyaluronsäure-modifizierten Poloxamergels 2 (HyPo 2), 120 Stunden nach Herstellung. Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (Einfachbestimmung), Zusammensetzung = 18,0 Gew.-% P407, 15,0 Gew.-% P188, 1,0 Gew.-% VLMW-HA; Scherdeformation = 0,5 %, Kreisfrequenz = 10 rad/s, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt = 500 μm - 241 -

Abbildung 92: Amplitudensweep des Hyaluronsäure-modifizierten Poloxamergels 3 (HyPo 3), 72 Stunden nach Herstellung. Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (Einfachbestimmung), Zusammensetzung = 18,0 Gew.-% P407, 15,0 Gew.-% P188, 0,5 Gew.-% LMW-HA; Kreisfrequenz = 10 rad/s, Messtemperatur = 32 °C, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt = 500 μm - 242 -

Abbildung 93: Temperatursweep des Hyaluronsäure-modifizierten Poloxamergels 3 (HyPo 3), 120 Stunden nach Herstellung. Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (Einfachbestimmung), Zusammensetzung = 18,0 Gew.-% P407, 15,0 Gew.-% P188, 0,5 Gew.-% LMW-HA; Scherdeformation = 0,5 %, Kreisfrequenz = 10 rad/s, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt = 500 μm - 242 -

Abbildung 94: Amplitudensweep des Hyaluronsäure-modifizierten Poloxamergels 4 (HyPo 4), 72 Stunden nach Herstellung. Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (Einfachbestimmung), Zusammensetzung = 18,0 Gew.-% P407, 15,0 Gew.-% P188, 1,0 Gew.-% LMW-HA; Kreisfrequenz = 10 rad/s, Messtemperatur = 32 °C, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt = 500 μm - 243 -

Abbildung 95: Temperatursweep des Hyaluronsäure-modifizierten Poloxamergels 4 (HyPo 4), 120 Stunden nach Herstellung. Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (Einfachbestimmung), Zusammensetzung = 18,0 Gew.-% P407, 15,0 Gew.-% P188, 1,0 Gew.-% VLMW-HA; Scherdeformation = 0,5 %, Kreisfrequenz = 10 rad/s, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt = 500 μm - 243 -

Abbildung 96: Amplitudensweep des Hydrogels 1 an Tag 1 der Lagerungsstabilität, 24 Stunden nach der Herstellung, Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (MW \pm SD; n = 3), Hydrogel 1 = 1,0 % VLMW-HA, 18,0 % P407, 15,0 % P188, Kreisfrequenz = 10 rad/s, Messtemperatur = 25 °C, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt 500 μm .. - 244 -

Abbildung 97: Amplitudensweep des Hydrogels 1 nach einmonatiger Lagerung bei 5 °C, Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (MW \pm SD; n = 3), Hydrogel 1 = 1,0 % VLMW-HA, 18,0 % P407, 15,0 % P188, Kreisfrequenz = 10 rad/s, Messtemperatur = 25 °C, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt 500 μ m - 244 -

Abbildung 98: Amplitudensweep des Hydrogels 1 nach einmonatiger Lagerung bei 25 °C, 60 %rH, Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (MW \pm SD; n = 3), Hydrogel 1 = 1,0 % VLMW-HA, 18,0 % P407, 15,0 % P188, Kreisfrequenz = 10 rad/s, Messtemperatur = 25 °C, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt 500 μ m - 245 -

Abbildung 99: Amplitudensweep des Hydrogels 1 nach einmonatiger Lagerung bei 40 °C, 75 %rH, Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (MW \pm SD; n = 3), Hydrogel 1 = 1,0 % VLMW-HA, 18,0 % P407, 15,0 % P188, Kreisfrequenz = 10 rad/s, Messtemperatur = 25 °C, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt 500 μ m - 245 -

Abbildung 100: Frequenzsweep des Hydrogels 1 an Tag 1 der Lagerungsstabilität, 24 Stunden nach der Herstellung, Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (MW \pm SD; n = 3), Hydrogel 1 = 1,0 % VLMW-HA, 18,0 % P407, 15,0 % P188, Scherdeformation = 0,25 %, Messtemperatur = 25 °C, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt 500 μ m - 246 -

Abbildung 101: Frequenzsweep des Hydrogels 1 nach einmonatiger Lagerung bei 5 °C, Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (MW \pm SD; n = 3), Hydrogel 1 = 1,0 % VLMW-HA, 18,0 % P407, 15,0 % P188, Scherdeformation = 0,25 %, Messtemperatur = 25 °C, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt 500 μ m - 246 -

Abbildung 102: Frequenzsweep des Hydrogels 1 nach einmonatiger Lagerung bei 25 °C, 60 %rH, Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (MW \pm SD; n = 3), Hydrogel 1 = 1,0 % VLMW-HA, 18,0 % P407, 15,0 % P188, Scherdeformation = 0,25 %, Messtemperatur = 25 °C, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt 500 μ m - 247 -

Abbildung 103: Frequenzsweep des Hydrogels 1 nach einmonatiger Lagerung bei 40 °C, 75 %rH, Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (MW \pm SD; n = 3), Hydrogel 1 = 1,0 % VLMW-HA, 18,0 % P407, 15,0 % P188, Scherdeformation = 0,25 %, Messtemperatur = 25 °C, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt 500 μ m - 247 -

Abbildung 104: Temperatursweep des Hydrogels 1 an Tag 1 der Lagerungsstabilität, 24 Stunden nach der Herstellung, Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (MW \pm SD; n = 3), Hydrogel 1 = 1,0 % VLMW-HA, 18,0 % P407, 15,0 % P188, Scherdeformation = 0,25 %, Kreisfrequenz = 10 rad/s, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt 500 μ m - 248 -

Abbildung 105: Temperatursweep des Hydrogels 1 nach einmonatiger Lagerung bei 5 °C, Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (MW \pm SD; n = 3), Hydrogel 1 = 1,0 % VLMW-HA, 18,0 % P407, 15,0 % P188, Scherdeformation = 0,25 %, Kreisfrequenz = 10 rad/s, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt 500 μ m - 248 -

Abbildung 106: Temperatursweep des Hydrogels 1 nach einmonatiger Lagerung bei 25 °C, 60 %rH, Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (MW \pm SD; n = 3), Hydrogel 1 = 1,0 % VLMW-HA, 18,0 % P407, 15,0 % P188, Scherdeformation = 0,25 %, Kreisfrequenz = 10 rad/s, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt 500 μ m - 249 -

Abbildung 107: Temperatursweep des Hydrogels 1 nach einmonatiger Lagerung bei 40 °C, 75 %rH, Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (MW ± SD; n = 3), Hydrogel 1 = 1,0 % VLMW-HA, 18,0 % P407, 15,0 % P188, Scherdeformation = 0,25 %, Kreisfrequenz = 10 rad/s, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt 500 µm - 249 -

Abbildung 108: Amplitudensweep des Hydrogels 2 an Tag 1 der Lagerungsstabilität, 24 Stunden nach der Herstellung, Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (MW ± SD; n = 3), Hydrogel 2 = 18,0 % P407, 15,0 % P188, 1,0 % LMW-HA, Kreisfrequenz = 10 rad/s, Messtemperatur = 25 °C, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt 500 µm .. - 250 -

Abbildung 109: Amplitudensweep des Hydrogels 2 nach einmonatiger Lagerung bei 5 °C, Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (MW ± SD; n = 3), Hydrogel 2 = 18,0 % P407, 15,0 % P188, 1,0 % LMW-HA, Kreisfrequenz = 10 rad/s, Messtemperatur = 25 °C, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt 500 µm - 250 -

Abbildung 110: Amplitudensweep des Hydrogels 2 nach einmonatiger Lagerung bei 25 °C, 60 %rH, Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (MW ± SD; n = 3), Hydrogel 2 = 18,0 % P407, 15,0 % P188, 1,0 % LMW-HA, Kreisfrequenz = 10 rad/s, Messtemperatur = 25 °C, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt 500 µm - 251 -

Abbildung 111: Amplitudensweep des Hydrogels 2 nach einmonatiger Lagerung bei 40 °C, 75 %rH, Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (MW ± SD; n = 3), Hydrogel 2 = 18,0 % P407, 15,0 % P188, 1,0 % LMW-HA, Kreisfrequenz = 10 rad/s, Messtemperatur = 25 °C, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt 500 µm - 251 -

Abbildung 112: Frequenzsweep des Hydrogels 2 an Tag 1 der Lagerungsstabilität, 24 Stunden nach der Herstellung, Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (MW ± SD; n = 3), Hydrogel 2 = 18,0 % P407, 15,0 % P188, 1,0 % LMW-HA, Scherdeformation = 0,25 %, Messtemperatur = 25 °C, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt 500 µm - 252 -

Abbildung 113: Frequenzsweep des Hydrogels 2 nach einmonatiger Lagerung bei 5 °C, Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (MW ± SD; n = 3), Hydrogel 2 = 18,0 % P407, 15,0 % P188, 1,0 % LMW-HA, Scherdeformation = 0,25 %, Messtemperatur = 25 °C, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt 500 µm - 252 -

Abbildung 114: Frequenzsweep des Hydrogels 2 nach einmonatiger Lagerung bei 25 °C, 60 %rH, Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (MW ± SD; n = 3), Hydrogel 2 = 18,0 % P407, 15,0 % P188, 1,0 % LMW-HA, Scherdeformation = 0,25 %, Messtemperatur = 25 °C, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt 500 µm - 253 -

Abbildung 115: Frequenzsweep des Hydrogels 2 nach einmonatiger Lagerung bei 40 °C, 75 %rH, Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (MW ± SD; n = 3), Hydrogel 2 = 18,0 % P407, 15,0 % P188, 1,0 % LMW-HA, Scherdeformation = 0,25 %, Messtemperatur = 25 °C, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt 500 µm - 253 -

Abbildung 116: Temperatursweep des Hydrogels 2 an Tag 1 der Lagerungsstabilität, 24 Stunden nach der Herstellung, Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (MW ± SD; n = 3), Hydrogel 2 = 18,0 % P407, 15,0 % P188, 1,0 % LMW-HA, Scherdeformation = 0,25 %, Kreisfrequenz = 10 rad/s, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt 500 µm - 254 -

Abbildung 117: Temperatursweep des Hydrogels 2 nach einmonatiger Lagerung bei 5 °C, Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (MW \pm SD; n = 3), Hydrogel 2 = 18,0 % P407, 15,0 % P188, 1,0 % LMW-HA, Scherdeformation = 0,25 %, Kreisfrequenz = 10 rad/s, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt 500 μ m - 254 -

Abbildung 118: Temperatursweep des Hydrogels 2 nach einmonatiger Lagerung bei 25 °C, 60 %rH, Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (MW \pm SD; n = 3), Hydrogel 2 = 18,0 % P407, 15,0 % P188, 1,0 % LMW-HA, Scherdeformation = 0,25 %, Kreisfrequenz = 10 rad/s, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt 500 μ m - 255 -

Abbildung 119: Temperatursweep des Hydrogels 2 nach einmonatiger Lagerung bei 40 °C, 75 %rH, Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (MW \pm SD; n = 3), Hydrogel 2 = 18,0 % P407, 15,0 % P188, 1,0 % LMW-HA, Scherdeformation = 0,25 %, Kreisfrequenz = 10 rad/s, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt 500 μ m - 255 -

Abbildung 120: Amplitudensweep des Hydrogels 3 an Tag 1 der Lagerungsstabilität, 24 Stunden nach der Herstellung, Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (MW \pm SD; n = 3), Hydrogel 3 = 1,0 % VLMW-HA, 1,0 % HMW-HA, Kreisfrequenz = 10 rad/s, Messtemperatur = 25 °C, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt 500 μ m - 256 -

Abbildung 121: Amplitudensweep des Hydrogels 3 nach einmonatiger Lagerung bei 5 °C, Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (MW \pm SD; n = 3), Hydrogel 3 = 1,0 % VLMW-HA, 1,0 % HMW-HA, Kreisfrequenz = 10 rad/s, Messtemperatur = 25 °C, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt 500 μ m - 257 -

Abbildung 122: Amplitudensweep des Hydrogels 3 nach einmonatiger Lagerung bei 25 °C, 60 %rH, Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (MW \pm SD; n = 3), Hydrogel 3 = 1,0 % VLMW-HA, 1,0 % HMW-HA, Kreisfrequenz = 10 rad/s, Messtemperatur = 25 °C, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt 500 μ m - 257 -

Abbildung 123: Amplitudensweep des Hydrogels 3 nach einmonatiger Lagerung bei 40 °C, 75 %rH, Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (MW \pm SD; n = 3), Hydrogel 3 = 1,0 % VLMW-HA, 1,0 % HMW-HA, Kreisfrequenz = 10 rad/s, Messtemperatur = 25 °C, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt 500 μ m - 258 -

Abbildung 124: Frequenzsweep des Hydrogels 3 an Tag 1 der Lagerungsstabilität, 24 Stunden nach der Herstellung, Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (MW \pm SD; n = 3), Hydrogel 3 = 1,0 % VLMW-HA, 1,0 % HMW-HA, Scherdeformation = 5,0 %, Messtemperatur = 25 °C, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt 500 μ m - 258 -

Abbildung 125: Frequenzsweep des Hydrogels 3 nach einmonatiger Lagerung bei 5 °C, Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (MW \pm SD; n = 3), Hydrogel 3 = 1,0 % VLMW-HA, 1,0 % HMW-HA, Scherdeformation = 5,0 %, Messtemperatur = 25 °C, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt 500 μ m - 259 -

Abbildung 126: Frequenzsweep des Hydrogels 3 nach einmonatiger Lagerung bei 25 °C, 60 %rH, Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (MW \pm SD; n = 3), Hydrogel 3 = 1,0 % VLMW-HA, 1,0 % HMW-HA, Scherdeformation = 5,0 %, Messtemperatur = 25 °C, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt 500 μ m - 259 -

Abbildung 127: Frequenzsweep des Hydrogels 3 nach einmonatiger Lagerung bei 40 °C, 75 %rH, Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (MW \pm SD; n = 3), Hydrogel 3 = 1,0 % VLMW-HA, 1,0 % HMW-HA, Scherdeformation = 5,0 %, Messtemperatur = 25 °C, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt 500 μ m - 260 -

Abbildung 128: Temperatursweep des Hydrogels 3 an Tag 1 der Lagerungsstabilität, 24 Stunden nach der Herstellung, Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (MW \pm SD; n = 3), Hydrogel 3 = 1,0 % VLMW-HA, 1,0 % HMW-HA, Scherdeformation = 5,0 %, Kreisfrequenz = 10 rad/s, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt 500 μ m - 260 -

Abbildung 129: Temperatursweep des Hydrogels 3 nach einmonatiger Lagerung bei 5 °C, Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (MW \pm SD; n = 3), Hydrogel 3 = 1,0 % VLMW-HA, 1,0 % HMW-HA, Scherdeformation = 5,0 %, Kreisfrequenz = 10 rad/s, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt 500 μ m - 261 -

Abbildung 130: Temperatursweep des Hydrogels 3 nach einmonatiger Lagerung bei 25 °C, 60 %rH, Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (MW \pm SD; n = 3), Hydrogel 3 = 1,0 % VLMW-HA, 1,0 % HMW-HA, Scherdeformation = 5,0 %, Kreisfrequenz = 10 rad/s, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt 500 μ m - 261 -

Abbildung 131: Temperatursweep des Hydrogels 3 nach einmonatiger Lagerung bei 40 °C, 75 %rH, Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (MW \pm SD; n = 3), Hydrogel 3 = 1,0 % VLMW-HA, 1,0 % HMW-HA, Scherdeformation = 5,0 %, Kreisfrequenz = 10 rad/s, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt 500 μ m - 262 -

Abbildung 132: Amplitudensweep des Hydrogels 4 an Tag 1 der Lagerungsstabilität, 24 Stunden nach der Herstellung, Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (MW \pm SD; n = 3), Hydrogel 4 = 1,0 % LMW-HA, 1,5 % SMW-HA, Kreisfrequenz = 10 rad/s, Messtemperatur = 25 °C, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt 500 μ m - 263 -

Abbildung 133: Amplitudensweep des Hydrogels 4 nach einmonatiger Lagerung bei 5 °C, Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (MW \pm SD; n = 3), Hydrogel 4 = 1,0 % LMW-HA, 1,5 % SMW-HA, Kreisfrequenz = 10 rad/s, Messtemperatur = 25 °C, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt 500 μ m - 264 -

Abbildung 134: Amplitudensweep des Hydrogels 4 nach einmonatiger Lagerung bei 25 °C, 60 %rH, Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (MW \pm SD; n = 3), Hydrogel 4 = 1,0 % LMW-HA, 1,5 % SMW-HA, Kreisfrequenz = 10 rad/s, Messtemperatur = 25 °C, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt 500 μ m - 264 -

Abbildung 135: Amplitudensweep des Hydrogels 4 nach einmonatiger Lagerung bei 40 °C, 75 %rH, Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (MW \pm SD; n = 3), Hydrogel 4 = 1,0 % LMW-HA, 1,5 % SMW-HA, Kreisfrequenz = 10 rad/s, Messtemperatur = 25 °C, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt 500 μ m - 265 -

Abbildung 136: Frequenzsweep des Hydrogels 4 an Tag 1 der Lagerungsstabilität, 24 Stunden nach der Herstellung, Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (MW \pm SD; n = 3), Hydrogel 4 = 1,0 % LMW-HA, 1,5 % SMW-HA, Scherdeformation = 5,0 %, Messtemperatur = 25 °C, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt 500 μ m - 265 -

Abbildung 137: Frequenzsweep des Hydrogels 4 nach einmonatiger Lagerung bei 5 °C, Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (MW \pm SD; n = 3), Hydrogel 4 = 1,0 % LMW-HA, 1,5 % SMW-HA, Scherdeformation = 5,0 %, Messtemperatur = 25 °C, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt 500 μ m - 266 -

Abbildung 138: Frequenzsweep des Hydrogels 4 nach einmonatiger Lagerung bei 25 °C, 60 %rH, Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (MW \pm SD; n = 3), Hydrogel 4 = 1,0 % LMW-HA, 1,5 % SMW-HA, Scherdeformation = 5,0 %, Messtemperatur = 25 °C, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt 500 μ m - 266 -

Abbildung 139: Frequenzsweep des Hydrogels 4 nach einmonatiger Lagerung bei 40 °C, 75 %rH, Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (MW ± SD; n = 3), Hydrogel 4 = 1,0 % LMW-HA, 1,5 % SMW-HA, Scherdeformation = 5,0 %, Messtemperatur = 25 °C, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt 500 µm - 267 -

Abbildung 140: Temperatursweep des Hydrogels 4 an Tag 1 der Lagerungsstabilität, 24 Stunden nach der Herstellung, Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (MW ± SD; n = 3), Hydrogel 4 = 1,0 % LMW-HA, 1,5% SMW-HA, Scherdeformation = 5,0 %, Messtemperatur = 25 °C, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt 500 µm - 267 -

Abbildung 141: Temperatursweep des Hydrogels 4 nach einmonatiger Lagerung bei 5 °C, Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (MW ± SD; n = 3), Hydrogel 4 = 1,0 % LMW-HA, 1,5% SMW-HA, Scherdeformation = 5,0 %, Messtemperatur = 25 °C, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt 500 µm - 268 -

Abbildung 142: Temperatursweep des Hydrogels 4 nach einmonatiger Lagerung bei 25 °C, 60 %rH, Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (MW ± SD; n = 3), Hydrogel 4 = 1,0 % LMW-HA, 1,5% SMW-HA, Scherdeformation = 5,0 %, Messtemperatur = 25 °C, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt 500 µm - 268 -

Abbildung 143: Temperatursweep des Hydrogels 4 nach einmonatiger Lagerung bei 40 °C, 75 %rH, Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (MW ± SD; n = 3), Hydrogel 4 = 1,0 % LMW-HA, 1,5% SMW-HA, Scherdeformation = 5,0 %, Messtemperatur = 25 °C, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt 500 µm - 269 -

Abbildung 144: Chromatogramm einer Api m 1-haltigen PBS-Lösung (0,1 mg/ml), Wellenlänge = 200 nm, Säule: Phenomenex Jupiter® C18 (300 Å, 5 µm 100x4,6 mm), Temperatur = 25 °C, Absorption in Millivolt (mV), Flussrate = 1,0 ml/min, Eluent A: Acetonitril + 0,1 % TFA, Eluent B: Gereinigtes Wasser + 0,1 % TFA, Gradient (min, %A): (0; 5), (5; 5) (20; 52), (25; 80), (30; 100), (35; 5), (40; 5) - 270 -

Abbildung 145: Chromatogramm einer Api m 1-haltigen PBS-Lösung (0,1 mg/ml), Wellenlänge = 210 nm, Säule: Phenomenex Jupiter® C18 (300 Å, 5 µm 100x4,6 mm), Temperatur = 25 °C, Absorption in Millivolt (mV), Flussrate = 1,0 ml/min, Eluent A: Acetonitril + 0,1 % TFA, Eluent B: Gereinigtes Wasser + 0,1 % TFA, Gradient (min, %A): (0; 5), (5; 5) (20; 52), (25; 80), (30; 100), (35; 5), (40; 5) - 270 -

Abbildung 146: Chromatogramm einer Api m 1-haltigen PBS-Lösung (0,1 mg/ml), Wellenlänge 220 nm, Säule: Phenomenex Jupiter® C18 (300 Å, 5 µm 100x4,6 mm), Temperatur = 25 °C, Absorption in Millivolt (mV), Flussrate = 1,0 ml/min, Eluent A: Acetonitril + 0,1 % TFA, Eluent B: Gereinigtes Wasser + 0,1 % TFA, Gradient (min, %A): (0; 5), (5; 5) (20; 52), (25; 80), (30; 100), (35; 5), (40; 5) - 271 -

Abbildung 147: Chromatogramm einer Api m 1-haltigen PBS-Lösung (0,1 mg/ml), Wellenlänge = 230 nm, Säule: Phenomenex Jupiter® C18 (300 Å, 5 µm 100x4,6 mm), Temperatur = 25 °C, Absorption in Millivolt (mV), Flussrate = 1,0 ml/min, Eluent A: Acetonitril + 0,1 % TFA, Eluent B: Gereinigtes Wasser + 0,1 % TFA, Gradient (min, %A): (0; 5), (5; 5) (20; 52), (25; 80), (30; 100), (35; 5), (40; 5) - 271 -

Abbildung 148: Chromatogramm einer Api m 1-haltigen PBS-Lösung (0,1 mg/ml), Wellenlänge = 240 nm, Säule: Phenomenex Jupiter® C18 (300 Å, 5 µm 100x4,6 mm), Temperatur = 25 °C, Absorption in Millivolt (mV), Flussrate = 1,0 ml/min, Eluent A: Acetonitril + 0,1 % TFA, Eluent B: Gereinigtes Wasser + 0,1 % TFA, Gradient (min, %A): (0; 5), (5; 5) (20; 52), (25; 80), (30; 100), (35; 5), (40; 5) - 272 -

Abbildung 149: Chromatogramm einer Api m 1-haltigen PBS-Lösung (0,1 mg/ml), Wellenlänge = 250 nm, Säule: Phenomenex Jupiter® C18 (300 Å, 5 µm 100x4,6 mm), Temperatur = 25 °C, Absorption in Millivolt (mV), Flussrate = 1,0 ml/min, Eluent A: Acetonitril + 0,1 % TFA, Eluent B: Gereinigtes Wasser + 0,1 % TFA, Gradient (min, %A): (0; 5), (5; 5) (20; 52), (25; 80), (30; 100), (35; 5), (40; 5) - 272 -

Abbildung 150: Chromatogramm einer Api m 1-haltigen PBS-Lösung (0,1 mg/ml), Wellenlänge = 260 nm, Säule: Phenomenex Jupiter® C18 (300 Å, 5 µm 100x4,6 mm), Temperatur = 25 °C, Absorption in Millivolt (mV), Flussrate = 1,0 ml/min, Eluent A: Acetonitril + 0,1 % TFA, Eluent B: Gereinigtes Wasser + 0,1 % TFA, Gradient (min, %A): (0; 5), (5; 5) (20; 52), (25; 80), (30; 100), (35; 5), (40; 5) - 273 -

Abbildung 151: Chromatogramm einer Api m 1-haltigen PBS-Lösung (0,1 mg/ml), Wellenlänge = 270 nm, Säule: Phenomenex Jupiter® C18 (300 Å, 5 µm 100x4,6 mm), Temperatur = 25 °C, Absorption in Millivolt (mV), Flussrate = 1,0 ml/min, Eluent A: Acetonitril + 0,1 % TFA, Eluent B: Gereinigtes Wasser + 0,1 % TFA, Gradient (min, %A): (0; 5), (5; 5) (20; 52), (25; 80), (30; 100), (35; 5), (40; 5) - 273 -

Abbildung 152: Chromatogramm einer Api m 1-haltigen PBS-Lösung (0,1 mg/ml), Wellenlänge = 280 nm, Säule: Phenomenex Jupiter® C18 (300 Å, 5 µm 100x4,6 mm), Temperatur = 25 °C, Absorption in Millivolt (mV), Flussrate = 1,0 ml/min, Eluent A: Acetonitril + 0,1 % TFA, Eluent B: Gereinigtes Wasser + 0,1 % TFA, Gradient (min, %A): (0; 5), (5; 5) (20; 52), (25; 80), (30; 100), (35; 5), (40; 5) - 274 -

Abbildung 153: Chromatogramme von Api m 1 in PBS, Säule: Phenomenex Jupiter® C18 (300 Å, 5 µm 100x4,6 mm), Temperatur = 25 °C, Absorption in Millivolt (mV), Eluent A: Acetonitril + 0,1 % TFA, Eluent B: Gereinigtes Wasser + 0,1 % TFA, Gradient (min, %A): (0; 5), (5; 5) (20; 52), (25; 80), (30; 100), (35; 5), (40; 5); Flussrate = 0,75 ml/min (a), 1,0 ml/min (b), 2,0 ml/min (c) - 275 -

Abbildung 154: Chromatogramm einer Api m 1-haltigen PBS-Lösung (0,1 mg/ml), Wellenlänge = 200 nm, Säule: Phenomenex Jupiter® C18 (300 Å, 5 µm 100x4,6 mm), Temperatur = 25 °C, Absorption in Millivolt (mV), Flussrate = 0,75 ml/min, Eluent A: Acetonitril + 0,1 % TFA, Eluent B: Gereinigtes Wasser + 0,1 % TFA, Gradient (min, %A): (0; 5), (3; 5) (10,5; 52), (15,5; 80), (20; 100), (24; 5), (26; 5) - 276 -

Abbildung 155: Chromatogramm einer Api m 1-haltigen PBS-Lösung (0,1 mg/ml), Wellenlänge = 210 nm, Säule: Phenomenex Jupiter® C18 (300 Å, 5 µm 100x4,6 mm), Temperatur = 25 °C, Absorption in Millivolt (mV), Flussrate = 0,75 ml/min, Eluent A: Acetonitril + 0,1 % TFA, Eluent B: Gereinigtes Wasser + 0,1 % TFA, Gradient (min, %A): (0; 5), (3; 5) (10,5; 52), (15,5; 80), (20; 100), (24; 5), (26; 5) - 277 -

Abbildung 156: Chromatogramm einer Api m 1-haltigen PBS-Lösung (0,1 mg/ml), Wellenlänge = 220 nm, Säule: Phenomenex Jupiter® C18 (300 Å, 5 µm 100x4,6 mm), Temperatur = 25 °C, Absorption in Millivolt (mV), Flussrate = 0,75 ml/min, Eluent A: Acetonitril + 0,1 % TFA, Eluent B: Gereinigtes Wasser + 0,1 % TFA, Gradient (min, %A): (0; 5), (3; 5) (10,5; 52), (15,5; 80), (20; 100), (24; 5), (26; 5) - 277 -

Abbildung 157: Chromatogramm einer Api m 1-haltigen PBS-Lösung (0,1 mg/ml), Wellenlänge = 230 nm, Säule: Phenomenex Jupiter® C18 (300 Å, 5 µm 100x4,6 mm), Temperatur = 25 °C, Absorption in Millivolt (mV), Flussrate = 0,75 ml/min, Eluent A: Acetonitril + 0,1 % TFA, Eluent B: Gereinigtes Wasser + 0,1 % TFA, Gradient (min, %A): (0; 5), (3; 5) (10,5; 52), (15,5; 80), (20; 100), (24; 5), (26; 5) - 278 -

Abbildung 158: Chromatogramm einer Api m 1-haltigen PBS-Lösung (0,1 mg/ml), Wellenlänge = 240 nm, Säule: Phenomenex Jupiter® C18 (300 Å, 5 µm 100x4,6 mm), Temperatur = 25 °C, Absorption in Millivolt (mV), Flussrate = 0,75 ml/min, Eluent A: Acetonitril + 0,1 % TFA, Eluent B: Gereinigtes Wasser + 0,1 % TFA, Gradient (min, %A): (0; 5), (3; 5) (10,5; 52), (15,5; 80), (20; 100), (24; 5), (26; 5) - 278 -

Abbildung 159: Chromatogramm einer Api m 1-haltigen PBS-Lösung (0,1 mg/ml), Wellenlänge = 250 nm, Säule: Phenomenex Jupiter® C18 (300 Å, 5 µm 100x4,6 mm), Temperatur = 25 °C, Absorption in Millivolt (mV), Flussrate = 0,75 ml/min, Eluent A: Acetonitril + 0,1 % TFA, Eluent B: Gereinigtes Wasser + 0,1 % TFA, Gradient (min, %A): (0; 5), (3; 5) (10,5; 52), (15,5; 80), (20; 100), (24; 5), (26; 5) - 279 -

Abbildung 160: Chromatogramm einer Api m 1-haltigen PBS-Lösung (0,1 mg/ml), Wellenlänge = 260 nm, Säule: Phenomenex Jupiter® C18 (300 Å, 5 µm 100x4,6 mm), Temperatur = 25 °C, Absorption in Millivolt (mV), Flussrate = 0,75 ml/min, Eluent A: Acetonitril + 0,1 % TFA, Eluent B: Gereinigtes Wasser + 0,1 % TFA, Gradient (min, %A): (0; 5), (3; 5) (10,5; 52), (15,5; 80), (20; 100), (24; 5), (26; 5) - 279 -

Abbildung 161: Chromatogramm einer Api m 1-haltigen PBS-Lösung (0,1 mg/ml), Wellenlänge = 270 nm, Säule: Phenomenex Jupiter® C18 (300 Å, 5 µm 100x4,6 mm), Temperatur = 25 °C, Absorption in Millivolt (mV), Flussrate = 0,75 ml/min, Eluent A: Acetonitril + 0,1 % TFA, Eluent B: Gereinigtes Wasser + 0,1 % TFA, Gradient (min, %A): (0; 5), (3; 5) (10,5; 52), (15,5; 80), (20; 100), (24; 5), (26; 5) - 280 -

Abbildung 162: Chromatogramm einer Api m 1-haltigen PBS-Lösung (0,1 mg/ml), Wellenlänge = 280 nm, Säule: Phenomenex Jupiter® C18 (300 Å, 5 µm 100x4,6 mm), Temperatur = 25 °C, Absorption in Millivolt (mV), Flussrate = 0,75 ml/min, Eluent A: Acetonitril + 0,1 % TFA, Eluent B: Gereinigtes Wasser + 0,1 % TFA, Gradient (min, %A): (0; 5), (3; 5) (10,5; 52), (15,5; 80), (20; 100), (24; 5), (26; 5) - 280 -

Abbildung 163: Kalibriergerade von Api m 1 in PBS (MW±SD, n=3); Analysiert mittels HPLC, Säule: Phenomenex Jupiter® C18 (300 Å, 5 µm 100x4,6 mm), Detektionswellenlänge = 220 nm, Temperatur = 25 °C, Absorption in Millivolt (mV), Flussrate = 0,75 ml/min, Eluent A: Acetonitril + 0,1 % TFA, Eluent B: Gereinigtes Wasser + 0,1 % TFA, Gradient (min, %A): (0; 5), (3; 5) (10,5; 52), (15,5; 80), (20; 100), (24; 5), (26; 5), Kalibriergleichung: Absorption = 64771*Konzentration-11741; Bestimmtheitsmaß: R² = 0,9991 - 284 -

Abbildung 164: SDS-PAGE Analyse von Api m 1 in Mikroemulsion über einen Zeitraum von sechs Tagen (144h), Standards von Api m 1 in PBS (Konzentration 0,06, 0,04 und 0,02 mg/ml)..... - 285 -

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht der verwendeten Chemikalien, Proteine und Reagenzien.....	- 35 -
Tabelle 2: Übersicht der verwendeten Verbrauchsmaterialien.....	- 38 -
Tabelle 3: Übersicht über die verwendeten Geräte.....	- 40 -
Tabelle 4: Generische Zusammensetzung der Hydrogele auf Poloxamerbasis.....	- 46 -
Tabelle 5: Generische Zusammensetzung der Hydrogele auf Hyaluronsäurebasis..	- 47 -
Tabelle 6: Generische Zusammensetzung der Hyaluronsäure-modifizierten Poloxamergele.....	- 48 -
Tabelle 7: Übersicht über die hergestellten Hydrogele der Lagerungsstabilitätsuntersuchung, Poloxamer 407 (P407) Poloxamer 188 (P188), Hyaluronsäure mit sehr kleinem Molekulargewicht (VLMW HA), Hyaluronsäure mit kleinem Molekulargewicht (LMW HA), Hyaluronsäure mit Standardmolekulargewicht (SMW HA), Hyaluronsäure mit hohem Molekulargewicht (HMW HA), Wasserphase (WP).....	- 49 -
Tabelle 8: Gradientenelutions-HPLC-Methode zur Bestimmung von Api m 1, Acetonitril + 0,1 % TFA (Eluent A), Gereinigtes Wasser + 0,1 % TFA (Eluent B), Säulenofentemperatur = 25 °C, Detektionswellenlänge = 220 nm, Flussrate = 0,75 ml/min, Injektionsvolumen = 30 µl (Kiselman et al. 2018).....	- 54 -
Tabelle 9: Verdünnungen für die Aufarbeitung von Api m 1 durch Ultrafiltration.....	- 55 -
Tabelle 10: Aufarbeitung von Api m 1 aus Mikroemulsion durch Acetonpräzipitation, Raumtemperatur (RT).....	- 56 -
Tabelle 11: Zusammensetzung der Mikroemulsion (A) aus Diagramm 1c (Kiselman et al. 2018).....	- 64 -
Tabelle 12: Einfluss der Konservierungsmittel auf die physikochemische- und mikrobiologische Stabilität der Mikroemulsion (ME): (+) einphasig, optisch klar; (-) Eintrübung, Phasenseparation; (o) nicht untersucht. Optische Dichte bei 600 nm = OD ₆₀₀ (n = 3, MW ± SD), Konservierungsmittel-Belastungstest = KBT; angegebene Konzentrationen sind die finalen Konzentrationen in der Formulierung [Gew.-%].....	- 68 -
Tabelle 13: Physikochemische Eigenschaften der Mikroemulsion während der dreimonatigen Lagerung unter verschiedenen Bedingungen; z-Average (d.nm) und Polydispersitätsindex (PDI) ermittelt durch DLS-Messungen (MW ± SD; n = 9); optische Dichte (OD ₆₀₀) (MW ± SD; n = 9); (Kiselman et al. 2018).....	- 73 -
Tabelle 14: Übersicht über die entwickelten Mikroemulsion-basierten Organogege (MBO) basierend auf einem einzelnen Gelbildner; Xanthan (Cosphaderm [®] X34, Cos), Dehydroxanthan (Amaze [®] XT, Ama), Alginate (Alg), Aerosil [®] (Aer).....	- 77 -

Tabelle 15: Übersicht über die Gelstärke einiger MBO bei Raumtemperatur, 24 h nach ihrer Herstellung, Gelstärke = Mittelwert des Speichermodul G' im linear-viskoelastischen Bereich (LVEB) [Pa]; Einfachbestimmung - 78 -

Tabelle 16: Ergebnisse des Amplitudensweeps von MBO 16 (1,0 Gew.-% Aerosil®, 3,75 Gew.-% Natriumalginat) zu Beginn und nach einmonatiger Lagerung; Ergebnisse dargestellt als Mittelwert \pm Standardabweichung ($n = 3$); Gelstärke = Mittelwert Speichermodul G' [Pa] im LVEB; Fließübergangsindex = Fließgrenze [Pa]/Nachgebegrenze [Pa], Messtemperatur = 25 °C..... - 81 -

Tabelle 17: Ergebnisse des Amplitudensweeps von MBO 18 (1,0 Gew.-% Aerosil®, 3,0 Gew.-% Natriumalginat, 11, zu Beginn und nach einmonatiger Lagerung; Ergebnisse dargestellt als Mittelwert \pm Standardabweichung ($n = 3$); Gelstärke = Mittelwert Speichermodul G' [Pa] im LVEB; Fließübergangsindex = Fließgrenze [Pa]/Nachgebegrenze [Pa], Messtemperatur = 25 °C..... - 81 -

Tabelle 18: Darstellung des Verlustfaktor $\tan \delta$ von MBO 16 und 18 über einen Lagerungszeitraum von einem Monat bei verschiedenen Lagerungsbedingungen, Mittelwert aus Frequenzbereich < 10 rad/s \pm Standardabweichung ($n = 3$)..... - 90 -

Tabelle 19: Gelstärke der MBO 16 und 18 (32 °C bis 34 °C); Gelstärke als G' (MW \pm SD; $n = 3$) - 94 -

Tabelle 20: Übersicht über die Gelierungstemperatur der Poloxamergele und der Gelstärke bei Hauttemperatur (32 °C), Gelstärke = Mittelwert des Speichermoduls G' im linear-viskoelastischen Bereich (LVEB) [Pa](Einfachbestimmung) (Ausnahme Po 5; dort wurde der Mittelwert der 3 Messwerte vor dem Erreichen der Nachgebegrenze Maß der Gelstärke verwendet), nicht bestimmbar = n.b. - 101 -

Tabelle 21: Einteilung der Hyaluronsäurearten nach Molekulargewicht und Eigenschaften (basierend auf Herstellerangaben) - 102 -

Tabelle 22: Übersicht über die hergestellten Hyaluronsäureformulierungen und deren Gelstärke bei Hauttemperatur (32 °C), Gelstärke = Mittelwert des Speichermodul G' im LVEB [Pa], nicht bestimmbar = n.b..... - 103 -

Tabelle 23: Übersicht über die Zusammensetzung der Formulierungen und deren Sol-Gel-Übergangstemperatur (T_{SG}), sowie Gelstärke bei Hauttemperatur (32 °C bis 34 °C), Gelstärke = Mittelwert des Speichermodul G' im LVEB [Pa], Hyaluronsäure mit sehr niedrigem Molekulargewicht (VLMW) und niedrigem Molekulargewicht (LMW) - 105 -

Tabelle 24: Übersicht über die im Rahmen einer Lagerungsstabilität untersuchten Hydrogele - 108 -

Tabelle 25: Ergebniss des Amplitudensweeps von Hydrogel 1 (18,0 Gew.-% P407, 15,0 Gew.-% P188, 1,0 Gew.-% VLMW-HA) zu Beginn und nach einmonatiger Lagerung; Ergebnisse dargestellt als Mittelwert \pm Standardabweichung ($n = 3$); Gelstärke = Mittelwert Speichermodul G' [Pa] i m linear-viskoelastischen Bereich (LVEB); Fließübergangsindex = Fließgrenze [Pa]/Nachgebegrenze [Pa]..... - 110 -

Tabelle 26: Ergebniss des Amplitudensweeps von Hydrogel 2 (18,0 Gew.-% P407, 15,0 Gew.-% P188, 1,0 Gew.-% LMW-HA) zu Beginn und nach einmonatiger Lagerung; Ergebnisse dargestellt als Mittelwert \pm Standardabweichung (n = 3); Gelstärke = Mittelwert Speichermodul G' [Pa] im linear-viskoelastischen Bereich (LVEB); Fließübergangsindex = Fließgrenze [Pa]/Nachgebegrenze [Pa] - 110 -

Tabelle 27: Darstellung des Verlustfaktors $\tan \delta$ von Hydrogel 1 und 2 über einen Lagerungszeitraum von einem Monat bei verschiedenen Lagerungsbedingungen, Frequenzbereich < 10 rad/s, Mittelwert \pm Standardabweichung (n = 3)..... - 117 -

Tabelle 28: Gelstärke bei Hauttemperatur und Gelierungstemperatur der Hydrogele 1 und 2 ermittelt im Temperaturbereich von 32 °C bis 34 °C, Mittelwert \pm Standardabweichung (n = 3)..... - 118 -

Tabelle 29: Ergebniss des Amplitudensweeps von Hydrogel 3 (1,0 Gew.-% VLMW-HA, 1,0 Gew.-% HMW-HA) zu Beginn und nach einmonatiger Lagerung; Ergebnisse dargestellt als Mittelwert \pm Standardabweichung (n = 3); Gelstärke = Mittelwert Speichermodul G' [Pa] im linear-viskoelastischen Bereich (LVEB); Fließübergangsindex = Fließgrenze [Pa]/Nachgebegrenze [Pa]..... - 121 -

Tabelle 30: Ergebniss des Amplitudensweeps von Hydrogel 4 (1,0 Gew.-% LMW-HA, 1,5 Gew.-% SMW-HA) zu Beginn und nach einmonatiger Lagerung; Ergebnisse dargestellt als Mittelwert \pm Standardabweichung (n = 3); Gelstärke = Mittelwert Speichermodul G' [Pa] im linear-viskoelastischen Bereich (LVEB); Fließübergangsindex = Fließgrenze [Pa]/Nachgebegrenze [Pa]..... - 121 -

Tabelle 31: Verlauf der dynamischen Viskosität von Hydrogel 3 und 4 $|\eta^*|$ [Pa \cdot s] zu Beginn der Stabilitätsstudie und nach einmonatiger Lagerung bei verschiedenen Temperaturen; Frequenz = 0,1 rad/s; alle Daten als Mittelwert \pm Standardabweichung (n = 3) - 126 -

Tabelle 32: Gelstärke bei Hauttemperatur der Hydrogele 3 und 4, ermittelt mittels Temperatursweep im Temperaturbereich von 32 bis 34 °C, Mittelwert \pm Standardabweichung (n = 3) - 128 -

Tabelle 33: Modifizierte Gradientenelutionsmethode nach Haghi et al. (Haghi et al. 2013) zur Bestimmung von Api m 1 aus PBS, Acetonitril + 0,1 % TFA (Eluent A), Gereinigtes Wasser + 0,1 % TFA (Eluent B), Flow = 1 ml/min, Säulenofentemperatur = 25 °C, Detektionswellenlänge = 220 nm..... - 141 -

Tabelle 34: Einfluss unterschiedlicher Flussraten auf die Retentionszeiten der Api m 1 Peaks und der chromatographischen Auflösung (R_s)..... - 144 -

Tabelle 35: Übersicht der Methodenverkürzungen 1 bis 4 auf die Totzeit, Retentionszeiten von Vor- und Hauptpeak (t_{Vorpeak} , $t_{\text{Hauptpeak}}$) und die chromatographische Auflösung (R_s)..... - 145 -

Tabelle 36: Gradientenverlauf von Methodenverkürzung 1, Acetonitril + 0,1 % TFA (Eluent A), Gereinigtes Wasser + 0,1 % TFA (Eluent B), Flow = 0,750 ml/min, Säulenofentemperatur = 25 °C, Detektionswellenlänge = 220 nm - 146 -

Tabelle 37: Gradientenverlauf von Methodenverkürzung 2, Acetonitril + 0,1 % TFA (Eluent A), Gereinigtes Wasser + 0,1 % TFA (Eluent B), Flow = 0,75 ml/min, Säulenofentemperatur = 25 °C, Detektionswellenlänge = 220 nm - 148 -

Tabelle 38: Gradientenverlauf der Methodenverkürzungen 3 und 4, Acetonitril + 0,1 % TFA (Eluent A), Gereinigtes Wasser + 0,1 % TFA (Eluent B), Flow = 0,750 ml/min, Säulenofentemperatur = 25 °C, Detektionswellenlänge = 220 nm - 149 -

Tabelle 39: Übersicht über die pH-Werte der Messproben und die erhaltene Ausbeute an Api m 1 nach Acetonfällung und anschließender Analyse mittels HPLC; Peaksumme = MW ± SD (n = 2); RSD = relative Standardabweichung in Prozent - 159 -

Tabelle 40: Übersicht über den Einfluss der Ausgangskonzentration einer Api m 1-haltigen Mikroemulsion auf die erhaltene Ausbeute nach Acetonfällung und anschließender Analyse mit Hilfe einer HPLC; Peaksumme = MW ± SD (n = 2); RSD = relative Standardabweichung in Prozent - 162 -

Tabelle 41: Übersicht über den Einfluss der Inkubationszeit, Zentrifugentemperatur und Zentrifugationsdauer auf die Ausbeute von Api m 1 nach Acetonfällung und anschließender HPLC-Analytik; Inkubationszeit (Ink.-zeit), Zentrifugentemperatur (Zent.-temperatur), Zentrifugationsdauer (Zent.-dauer), Peaksumme = MW ± SD (n = 2); RSD = relative Standardabweichung in Prozent - 162 -

Tabelle 42: Optimierte Aufarbeitung von Api m 1 aus Mikroemulsion mit Hilfe einer Acetonfällung, Raumtemperatur (RT) - 164 -

Tabelle 43: Ermittlung der Linearität, Bestimmungs- und Nachweisgrenze der Analysemethode, Konzentration Api m 1 in PBS (Konz.), relative Standardabweichung (RSD), Bestimmtheitsmaß der linearen Regression (R²), Bestimmungsgrenze (LOD, Limit of Detection) und Nachweisgrenze (LOQ, Limit of Quantification), n = 3 - 167 -

Tabelle 44: Vergleich der Wiederfindung mittels Acetonpräzipitation und anschließender HPLC-Analytik von Api m 1 aus PBS und aus Mikroemulsion (ME). Als Referenz diente natives Api m 1 in PBS. Milliabsorptionseinheiten (mAU), relative Standardabweichung (RSD), n = 2 (MW ± SD) - 168 -

Tabelle 45: Vergleich des Restgehalts von gefällttem Api m 1 aus PBS zu verschiedenen Zeitpunkten nach Lagerung bei Raumtemperatur (RT) und tiefgekühlt (TK, - 21 °C), n = 3 (MW ± SD) - 171 -

Tabelle 46: Ermittlung des Restgehalts von Api m 1 in Mikroemulsion [1 mg/ml] gelagert bei Raumtemperatur. Probenaufarbeitung mittels Acetonpräzipitation und anschließender HPLC-Analyse. Als Referenz diente tiefgekühlt gelagertes, gefälltes Api m 1 in PBS. Dreifachbestimmung (MW ± SD), Milliabsorptionseinheiten (mAU), relative Standardabweichung (RSD), Raumtemperatur (RT) - 172 -

Tabelle 47: Ergebnisse des Konservierungsbelastungstest der Mikroemulsion mit Butylenglykol nach Ph.Eur.; Tabelle erstellt anhand Originaldokument, koloniebildende Einheiten (KBE), Staphylococcus aureus (S. aureus), Escherichia coli (E. coli), Pseudomonas aeruginosa (P. aeruginosa), Candida albicans (C. albicans), Aspergillus brasiliensis (A. brasiliensis) - 209 -

Tabelle 48: Ergebnisse des Konservierungsbelastungstest der Mikroemulsion mit Butylenglykol und Ethylhexylglycerin nach Ph.Eur.; Tabelle erstellt anhand Originaldokument, koloniebildende Einheiten (KBE), Staphylococcus aureus (S. aureus), Escherichia coli (E. coli), Pseudomonas aeruginosa (P. aeruginosa), Candida albicans (C. albicans), Aspergillus brasiliensis (A. brasiliensis) - 210 -

Tabelle 49: Ergebnisse des Konservierungsbelastungstest der Mikroemulsion mit Butylenglykol und Phenoxyethanol nach Ph.Eur; Tabelle erstellt anhand Originaldokument, koloniebildende Einheiten (KBE), Staphylococcus aureus (S. aureus), Escherichia coli (E. coli), Pseudomonas aeruginosa (P. aeruginosa), Candida albicans (C. albicans), Aspergillus brasiliensis (A. brasiliensis).....	- 211 -
Tabelle 50: Messparameter des Amplitudensweep der Mikroemulsion-basierten Organogelee während der Formulierungsentwicklung	- 213 -
Tabelle 51: Messparameter des Amplitudensweep der Mikroemulsion-basierten Organogelee während der Stabilitätsuntersuchungen.....	- 213 -
Tabelle 52: Messparameter des Frequenzsweep der Mikroemulsion-basierten Organogelee während der Stabilitätsuntersuchungen.....	- 214 -
Tabelle 53: Messparameter des Temperatursweep der Mikroemulsion-basierten Organogelee während der Stabilitätsuntersuchungen.....	- 214 -
Tabelle 54: Messparameter des Amplitudensweep der Hydrogele während der Formulierungsentwicklung.....	- 215 -
Tabelle 55: Messparameter des Temperatursweep der Hydrogele während der Formulierungsentwicklung.....	- 215 -
Tabelle 56: Messparameter des Amplitudensweep der Hydrogele während der Stabilitätsuntersuchungen	- 216 -
Tabelle 57: Messparameter des Frequenzsweep der Hydrogele während der Stabilitätsuntersuchungen	- 216 -
Tabelle 58: Messparameter des Temperatursweep der Hydrogele während der Stabilitätsuntersuchungen	- 217 -
Tabelle 59: Aufarbeitung von Api m 1 aus Mikroemulsion mit Hilfe von Methanol-Chloroform.....	- 281 -
Tabelle 60: Aufarbeitung vom Api m 1 aus Mikroemulsion mit Hilfe von Aceton (Variante 1)	- 281 -
Tabelle 61: Aufarbeitung vom Api m 1 aus Mikroemulsion mit Hilfe von Aceton (Variante 2)	- 282 -
Tabelle 62: Aufarbeitung von Api m 1 aus Mikroemulsion mit Hilfe von Aceton (Untersuchung des pH-Einfluss).....	- 282 -
Tabelle 63: Aufarbeitung von Api m 1 aus Mikroemulsion mit Hilfe von Aceton (Untersuchung des Konzentrationseinfluss der Stammlösung mit 0,625 mg/ml).....	- 283 -
Tabelle 64: Aufarbeitung von Api m 1 aus Mikroemulsion mit Hilfe von Aceton (Untersuchung des Konzentrationseinfluss der Stammlösung mit 0,25 mg/ml).....	- 283 -

10 Formelverzeichnis

Formel 1: Berechnung der Proteinkonzentration	- 43 -
Formel 2: Berechnung der Farbstoffmenge pro Stoffmenge Protein	- 43 -
Formel 3: Gibbs'sche freie Bildungsenthalpie	- 69 -
Formel 4: Kalkulation des z-Average nach ISO 22412 2008	- 70 -
Formel 5: Berechnung des Diffusionskoeffizienten mittels Stokes-Einstein-Gleichung	- 71 -
Formel 6: 1. Fick'sches Diffusionsgesetz	- 134 -
Formel 7: Modifikation des 1. Fick'schen Diffusionsgesetzes	- 135 -
Formel 8: Modifikation der Stokes-Einstein-Gleichung zur Bestimmung des stoffspezifischen Diffusionskoeffizienten	- 135 -
Formel 9: Berechnung des pH-Wert abhängigen Ionisationsgrades.....	- 159 -

11 Anhang

I. Ergebnisse des Keimbelastungstests

Tabelle 47: Ergebnisse des Konservierungsbelastungstest der Mikroemulsion mit Butylenglykol nach Ph.Eur.; Tabelle erstellt anhand Originaldokument, koloniebildende Einheiten (KBE), *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Escherichia coli* (*E. coli*), *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*), *Candida albicans* (*C. albicans*), *Aspergillus brasiliensis* (*A. brasiliensis*)

Versuchsdauer		<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>	<i>A. brasiliensis</i>
Ausgangsbelastung	KBE/g Probe	2,8 x 10 ⁵	2,8 x 10 ⁵	7,6 x 10 ⁵	3,2 x 10 ⁵	8,0 x 10 ⁴
2 Tage	KBE/g Probe	1446	< 10	1191	< 10	< 10
	Reduktion [%]	94,84	> 99,99	97,75	> 99,99	> 99,99
1 Woche	KBE/g Probe	< 10	< 10	10	< 10	270
	Reduktion [%]	> 99,99	> 99,99	> 99,99	> 99,99	99,04
2 Wochen	KBE/g Probe	< 10	< 10	< 10	< 10	310
	Reduktion [%]	> 99,99	> 99,99	> 99,99	> 99,99	98,89

Tabelle 48: Ergebnisse des Konservierungsbelastungstest der Mikroemulsion mit Butylenglykol und Ethylhexylglycerin nach Ph.Eur; Tabelle erstellt anhand Originaldokument, koloniebildende Einheiten (KBE), *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Escherichia coli* (*E. coli*), *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*), *Candida albicans* (*C. albicans*), *Aspergillus brasiliensis* (*A. brasiliensis*)

Versuchsdauer		<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>	<i>A. brasiliensis</i>
Ausgangs- belastung	KBE/g Probe	2,8 x 10 ⁵	2,8 x 10 ⁵	7,6 x 10 ⁵	3,2 x 10 ⁵	8,0 x 10 ⁴
2 Tage	KBE/g Probe	37600	< 10	39200	< 10	4000
	Reduktion [%]	keine	> 99,99	48,42	> 99,99	50,00
1 Woche	KBE/g Probe	< 10	< 10	180	< 10	400
	Reduktion [%]	> 99,99	> 99,99	99,76	> 99,99	95,00

Tabelle 49: Ergebnisse des Konservierungsbelastungstest der Mikroemulsion mit Butylenglykol und Phenoxyethanol nach Ph.Eur; Tabelle erstellt anhand Originaldokument, koloniebildende Einheiten (KBE), *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Escherichia coli* (*E. coli*), *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*), *Candida albicans* (*C. albicans*), *Aspergillus brasiliensis* (*A. brasiliensis*)

Versuchsdauer		<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>	<i>A. brasiliensis</i>
Ausgangs- belastung	KBE/g Probe	2,8 x 10 ⁵	2,8 x 10 ⁵	7,6 x 10 ⁵	3,2 x 10 ⁵	8,0 x 10 ⁴
2 Tage	KBE/g Probe	< 10	< 10	< 10	< 10	2400
	Reduktion [%]	> 99,99	> 99,99	> 99,99	> 99,99	70,00
1 Woche	KBE/g Probe	< 10	< 10	10	< 10	300
	Reduktion [%]	> 99,99	> 99,99	> 99,99	> 99,99	96,25
2 Wochen	KBE/g Probe	< 10	10	< 10	< 10	20
	Reduktion [%]	> 99,99	> 99,99	> 99,99	> 99,99	99,75
4 Wochen	KBE/g Probe	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
	Reduktion [%]	> 99,99	> 99,99	> 99,99	> 99,99	> 99,99

II. Viskositätsbestimmung der Mikroemulsion

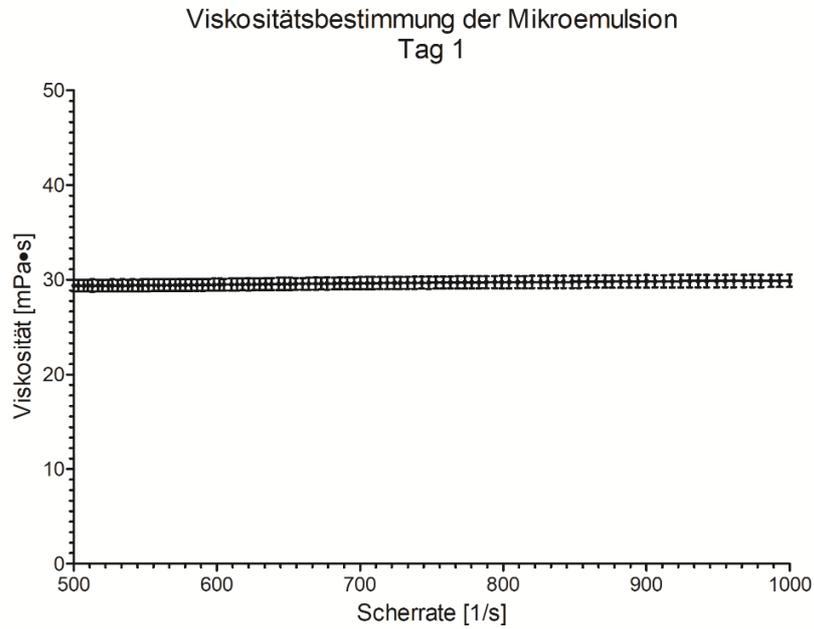


Abbildung 43: Viskositätsmessung der Mikroemulsion an Tag 1 der Lagerungsstabilitätsuntersuchung; Scherrate in logarhythmischer Rampe (500-1000 1/s), Messtemperatur = 25 °C, Kegel-Platte Messapparatur (Durchmesser 40 mm, Kegelwinkel 1°, Messspalt 80 µm), Viskosität in mPa·s als MW ± SD (n = 3)

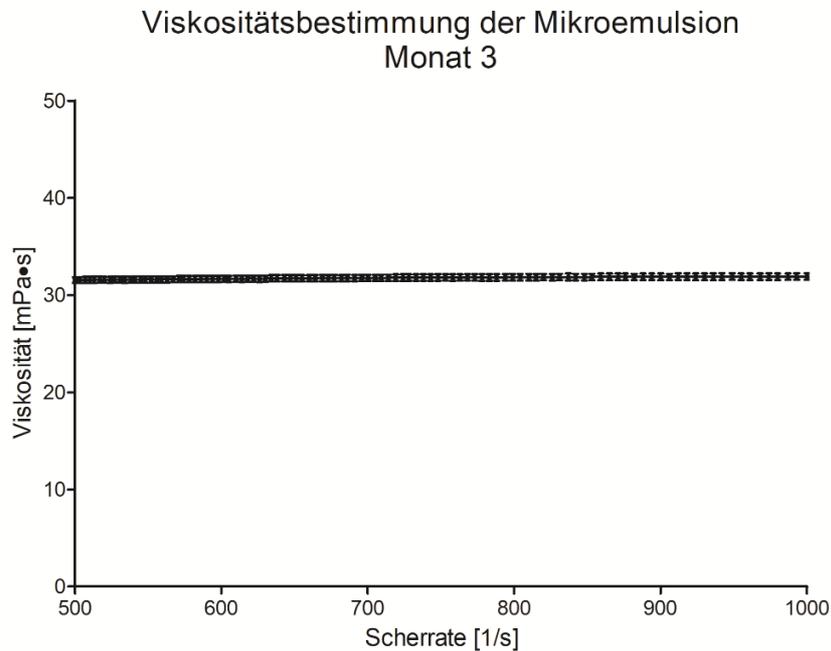


Abbildung 44: Viskositätsmessung der Mikroemulsion an Monat 3 der Lagerungsstabilitätsuntersuchung, Scherrate in logarhythmischer Rampe (500-1000 1/s), Messtemperatur = 25 °C, Kegel-Platte Messapparatur (Durchmesser 40 mm, Kegelwinkel 1°, Messspalt 80 µm), Viskosität in mPa·s als MW ± SD (n = 3)

III. Messparameter der Amplituden-, Frequenz- und Temperatursweeps

Tabelle 50: Messparameter des Amplitudensweep der Mikroemulsion-basierten Organogele während der Formulierungsentwicklung

Parameter	Wert
Equilibrierungszeit [s]	60
Spaltbreite [mm]	0,5
Temperatur [°C]	25
Kreisfrequenz [rad/s]	10
Datenpunkte	61 Punkte (Punkt-dauer automatisch, max. Einregeldauer 30 s)
Messvorgabe	Scherdeformation (oszillierend, logarithmische Rampe)
Scherdeformationsbereich [%]	0,01 - 100

Tabelle 51: Messparameter des Amplitudensweep der Mikroemulsion-basierten Organogele während der Stabilitätsuntersuchungen

Parameter	Wert
Equilibrierungszeit [min]	10
Spaltbreite [mm]	0,5
Temperatur [°C]	25
Kreisfrequenz [rad/s]	10
Datenpunkte	61 Punkte (Punkt-dauer automatisch, max. Einregeldauer 30 s)
Messvorgabe	Scherdeformation (oszillierend, logarithmische Rampe)
Scherdeformationsbereich [%]	0,01 - 100

Tabelle 52: Messparameter des Frequenzweeps der Mikroemulsion-basierten Organogele während der Stabilitätsuntersuchungen

Parameter	Wert
Equilibrierungszeit [min]	10
Spaltbreite [mm]	0,5
Temperatur [°C]	25
Datenpunkte	16 Punkte (Punkt-dauer automatisch, 5 Punkt/Dekade)
Messvorgabe	Scherdeformation (oszillierend, konstant), Kreisfrequenz (logarithmische Rampe)
Scherdeformation [%]	0,25
Frequenzbereich [rad/s]	100 – 0,1

Tabelle 53: Messparameter des Temperatursweeps der Mikroemulsion-basierten Organogele während der Stabilitätsuntersuchungen

Parameter	Wert
Equilibrierungszeit [min]	10
Kreisfrequenz [rad/s]	10
Spaltbreite [mm]	0,5
Datenpunkte	31 Punkte (Punkt-dauer 1 Minute) (1 Punkt/1°C)
Messvorgabe	Scherdeformation (oszillierend, konstant), Temperatur (lineare Rampe)
Scherdeformation [%]	0,25
Temperaturbereich [°C]	10 - 40

Tabelle 54: Messparameter des Amplitudensweep der Hydrogele während der Formulierungsentwicklung

Parameter	Poloxamergele	Hyaluronsäuregele
Spaltbreite [mm]		0,5
Temperatur [°C]		32
Kreisfrequenz [rad/s]		10
Datenpunkte	61 Punkte (Punktdauer automatisch, max. Einregeldauer 30 s)	
Messvorgabe	Scherdeformation (oszillierend, logarithmische Rampe)	
Scherdeformationsbereich [%]	0,01 – 100	0,5 - 500

Tabelle 55: Messparameter des Temperatursweep der Hydrogele während der Formulierungsentwicklung

Parameter	Poloxamergele
Kreisfrequenz [rad/s]	10
Spaltbreite [mm]	0,5
Datenpunkte	31 Punkte (Punktdauer 1 Minute) (1 Punkt/1°C)
Messvorgabe	Scherdeformation (oszillierend, konstant), Temperatur (lineare Rampe)
Scherdeformation [%]	0,5
Temperaturbereich [°C]	10 - 40

Tabelle 56: Messparameter des Amplitudensweep der Hydrogele während der Stabilitätsuntersuchungen

Parameter	Poloxamergele	Hyaluronsäuregele
Spaltbreite [mm]		0,5
Temperatur [°C]		25
Kreisfrequenz [rad/s]		10
Datenpunkte	61 Punkte (Punkt-dauer automatisch, max. Einregeldauer 30 s)	
Messvorgabe	Scherdeformation (oszillierend, logarithmische Rampe)	
Scherdeformationsbereich [%]	0,01 – 100	0,5 - 500

Tabelle 57: Messparameter des Frequenzsweep der Hydrogele während der Stabilitätsuntersuchungen

Parameter	Poloxamergele	Hyaluronsäuregele
Spaltbreite [mm]		0,5
Temperatur [°C]		25
Datenpunkte	16 Punkte (Punkt-dauer automatisch, 5 Punkt/Dekade)	
Messvorgabe	Scherdeformation (oszillierend, konstant), Kreisfrequenz (logarithmische Rampe)	
Scherdeformation [%]	1	5
Frequenzbereich [rad/s]	100 – 0,1	

Tabelle 58: Messparameter des Temperatursweep der Hydrogele während der Stabilitätsuntersuchungen

Parameter	Poloxamergele	Hyaluronsäuregele
Kreisfrequenz [rad/s]		10
Spaltbreite [mm]		0,5
Datenpunkte	31 Punkte (Punkt-dauer 1 Minute) (1 Punkt/1°C)	
Messvorgabe	Scherdeformation (oszillierend, konstant), Temperatur (lineare Rampe)	
Scherdeformation [%]	1	5
Temperaturbereich [°C]		10 - 40

IV. Rheogramme: Entwicklung eines MBO

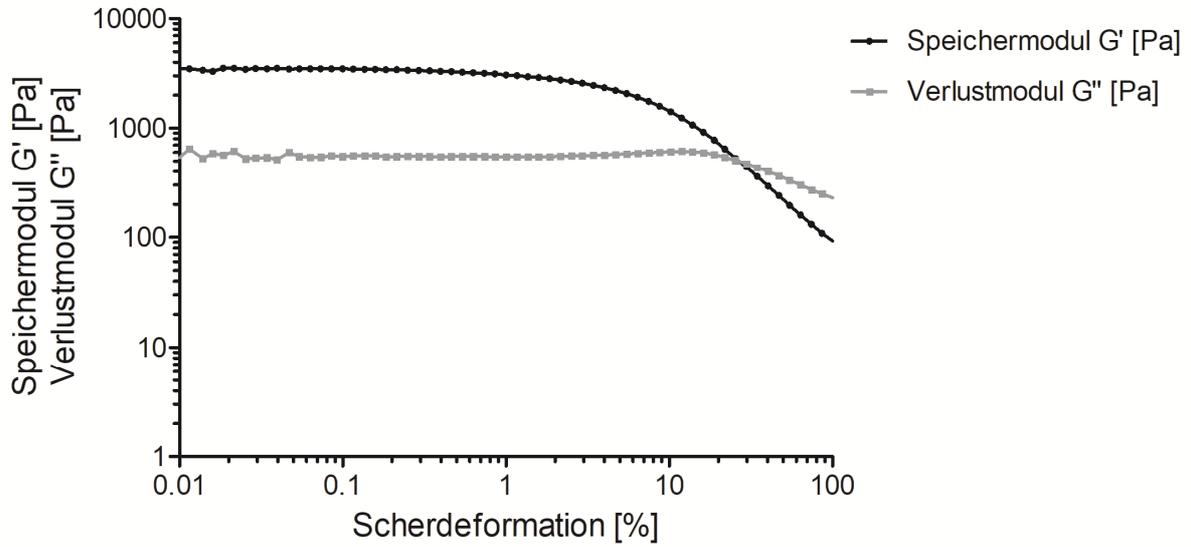


Abbildung 45: Amplitudensweep des Mikroemulsion-basierten Organogels 1 (MBO 1), 24 Stunden nach Herstellung. Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (Einfachbestimmung), Zusammensetzung = 2,5 Gew.-% Aerosil®, 3,75 Gew.-% Natriumalginat, 5,0 Gew.-% Dehydroxanthan; Kreisfrequenz = 10 rad/s; Messtemperatur = 25 °C, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt = 500 μm

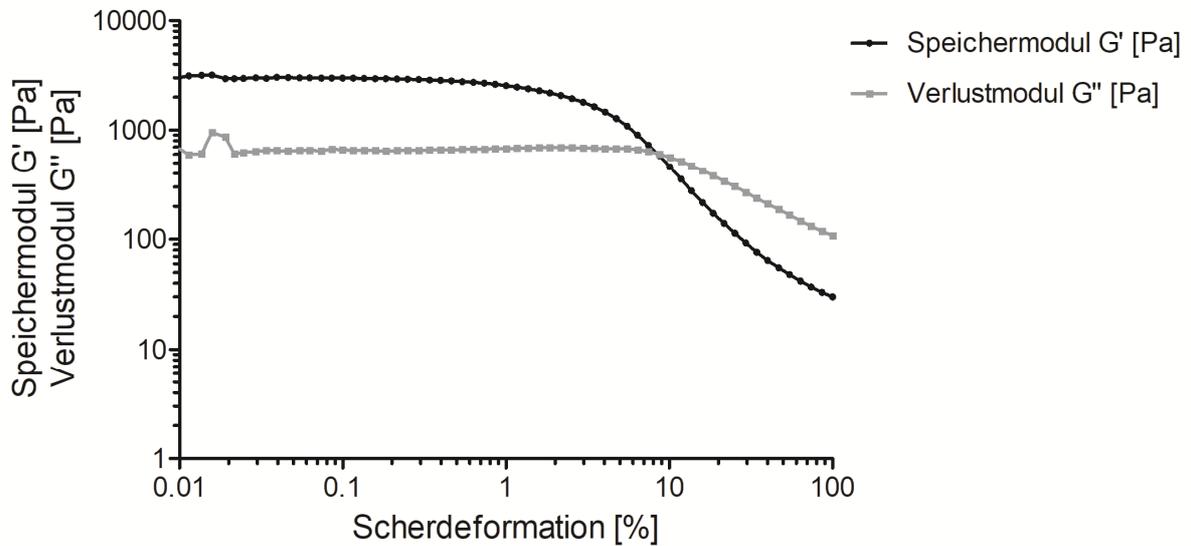


Abbildung 46: Amplitudensweep des Mikroemulsion-basierten Organogels 2 (MBO 2), 24 Stunden nach Herstellung. Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (Einfachbestimmung), Zusammensetzung = 7,50 Gew.-% Natriumalginat, 5,0 Gew.-% Dehydroxanthan; Kreisfrequenz = 10 rad/s; Messtemperatur = 25 °C, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt = 500 μm

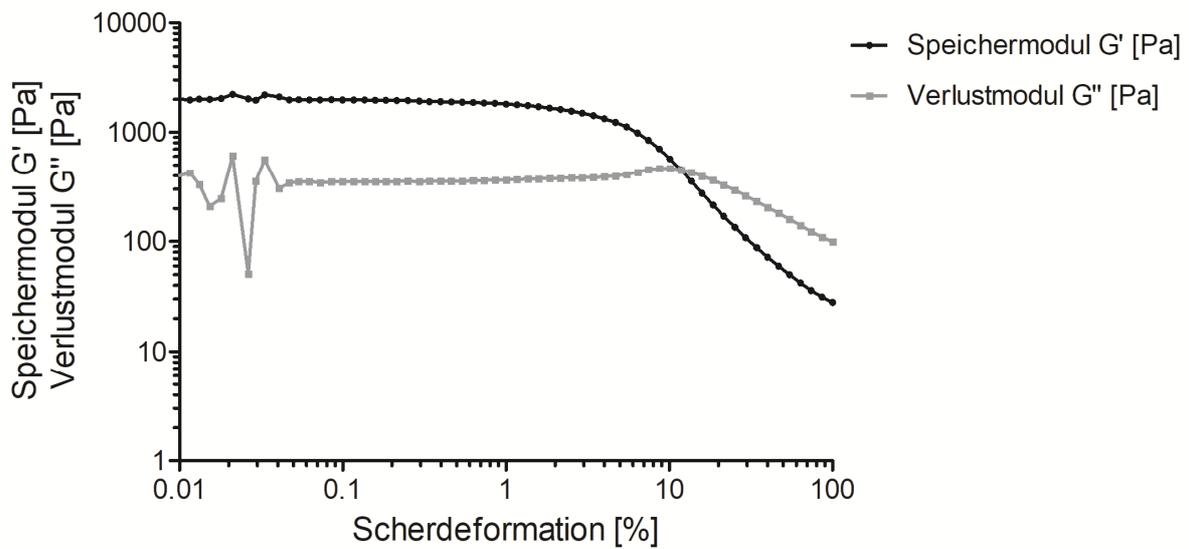


Abbildung 47: Amplitudensweep des Mikroemulsion-basierten Organogels 11 (MBO 11), 24 Stunden nach Herstellung. Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (Einfachbestimmung), Zusammensetzung = 3,75 Gew.-% Natriumalginat, 10,0 Gew.-% Dehydroxanthan; Kreisfrequenz = 10 rad/s; Messtemperatur = 25 °C, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt = 500 μm

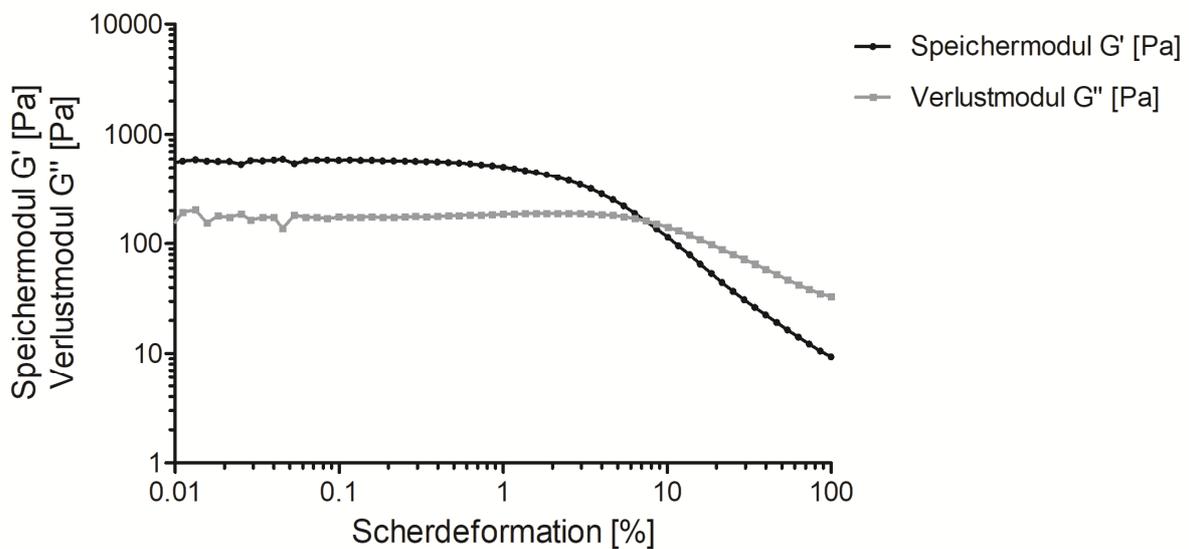


Abbildung 48: Amplitudensweep des Mikroemulsion-basierten Organogels 15 (MBO 15), 24 Stunden nach Herstellung. Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (Einfachbestimmung), Zusammensetzung = 3,75 Gew.-% Natriumalginat, 2,5 Gew.-% Dehydroxanthan; Kreisfrequenz = 10 rad/s; Messtemperatur = 25 °C, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt = 500 μm

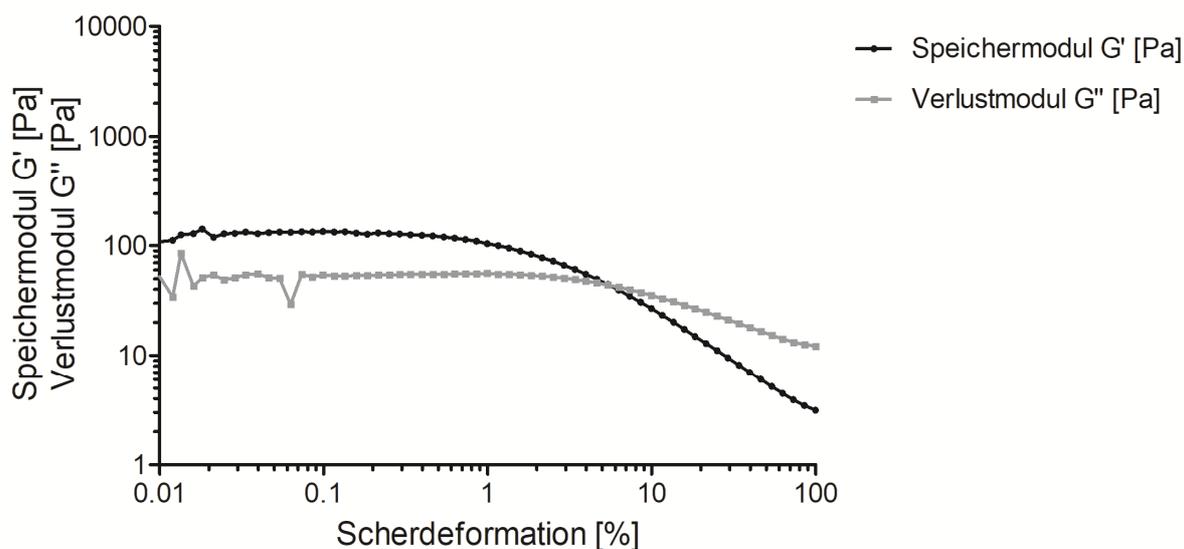


Abbildung 49: Amplitudensweep des Mikroemulsion-basierten Organogels 16 (MBO 16), 24 Stunden nach Herstellung. Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (Einfachbestimmung), Zusammensetzung = 1,0 Gew.-% Aerosil®, 3,75 Gew.-% Natriumalginat; Kreisfrequenz = 10 rad/s; Messtemperatur = 25 °C, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt = 500 μm

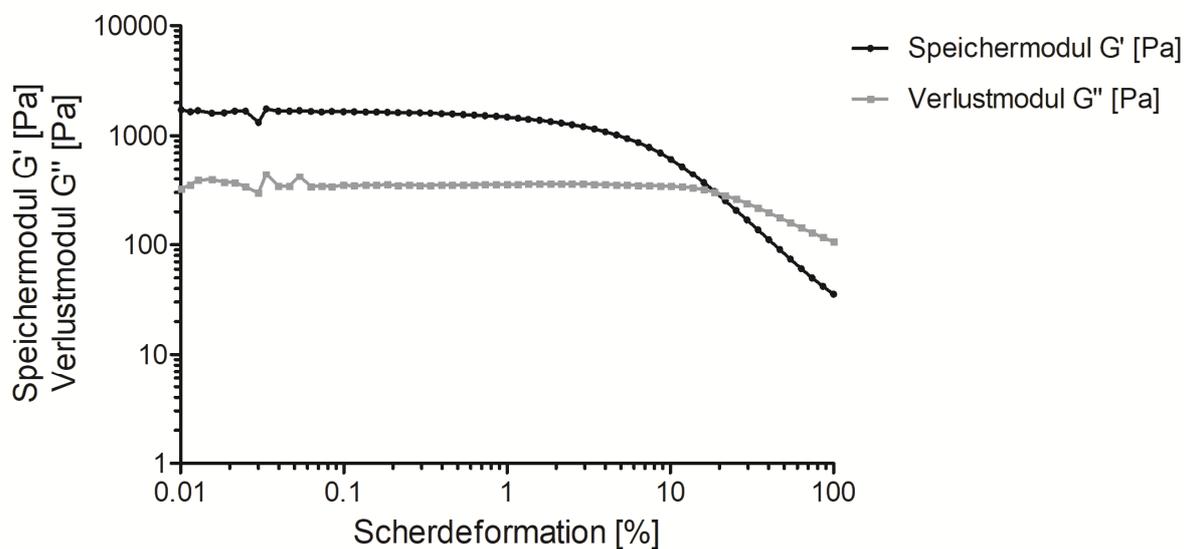


Abbildung 50: Amplitudensweep des Mikroemulsion-basierten Organogels 17 (MBO 17), 24 Stunden nach Herstellung. Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (Einfachbestimmung), Zusammensetzung = 1,0 Gew.-% Aerosil®, 3,5 Gew.-% Natriumalginat, 2,5 Gew.-% Dehydroxanthan; Kreisfrequenz = 10 rad/s; Messtemperatur = 25 °C, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt = 500 μm

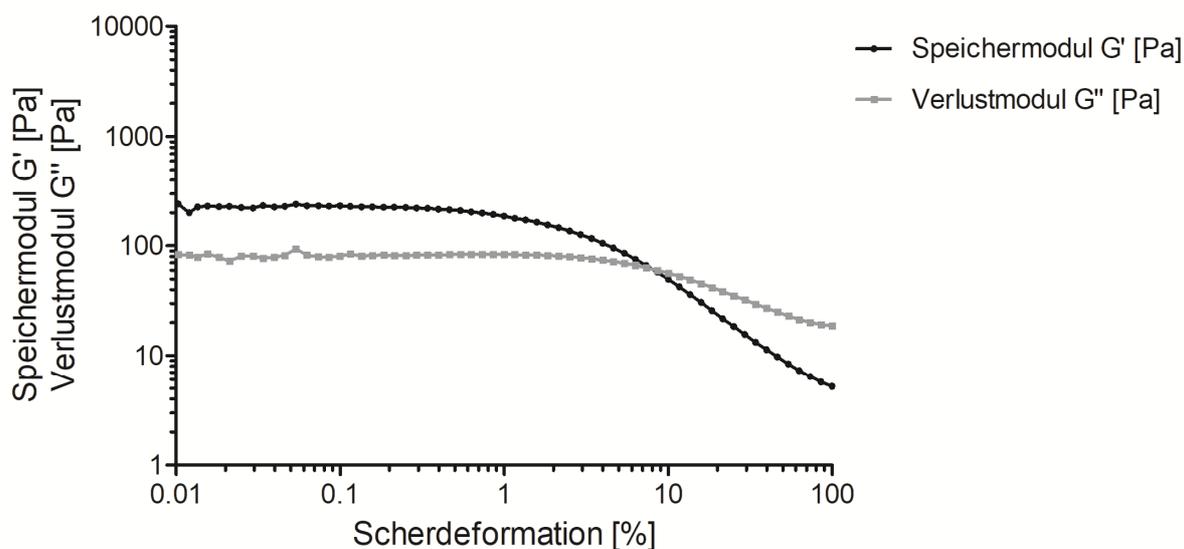


Abbildung 51: Amplitudensweep des Mikroemulsion-basierten Organogels 18 (MBO 18), 24 Stunden nach Herstellung. Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (Einfachbestimmung), Zusammensetzung = 1,0 Gew.-% Aerosil®, 3,0 Gew.-% Natriumalginat, 1,0 Gew.-% Dehydroxanthan; Kreisfrequenz = 10 rad/s; Messtemperatur = 25 °C, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt = 500 μm

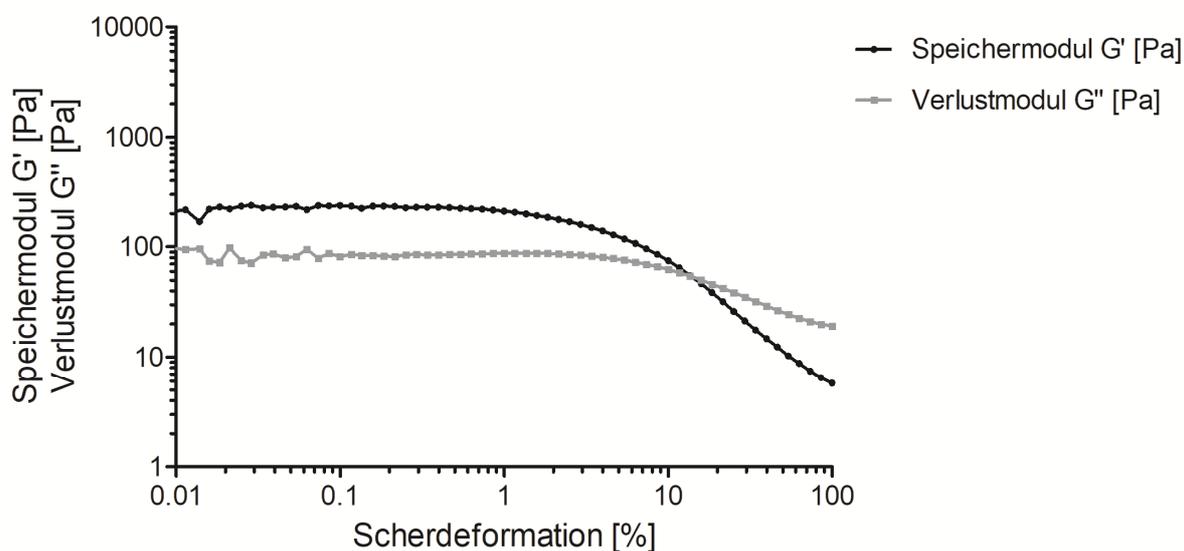


Abbildung 52: Amplitudensweep des Mikroemulsion-basierten Organogels 19 (MBO 19), 24 Stunden nach Herstellung. Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (Einfachbestimmung), Zusammensetzung = 1,0 Gew.-% Aerosil®, 3,5 Gew.-% Natriumalginat, 1,0 Gew.-% Dehydroxanthan; Kreisfrequenz = 10 rad/s; Messtemperatur = 25 °C, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt = 500 μm

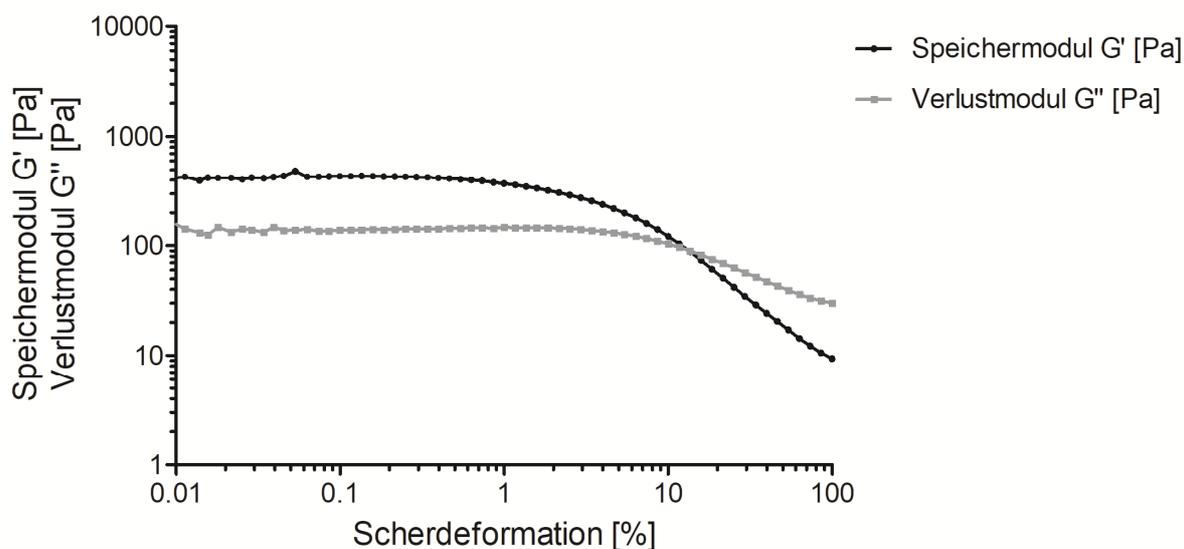


Abbildung 53: Amplitudensweep des Mikroemulsion-basierten Organogels 20 (MBO 20), 24 Stunden nach Herstellung. Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (Einfachbestimmung), Zusammensetzung = 1,0 Gew.-% Aerosil®, 4,0 Gew.-% Natriumalginat, 1,5 Gew.-% Dehydroxanthan; Kreisfrequenz = 10 rad/s; Messtemperatur = 25 °C, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt = 500 μm

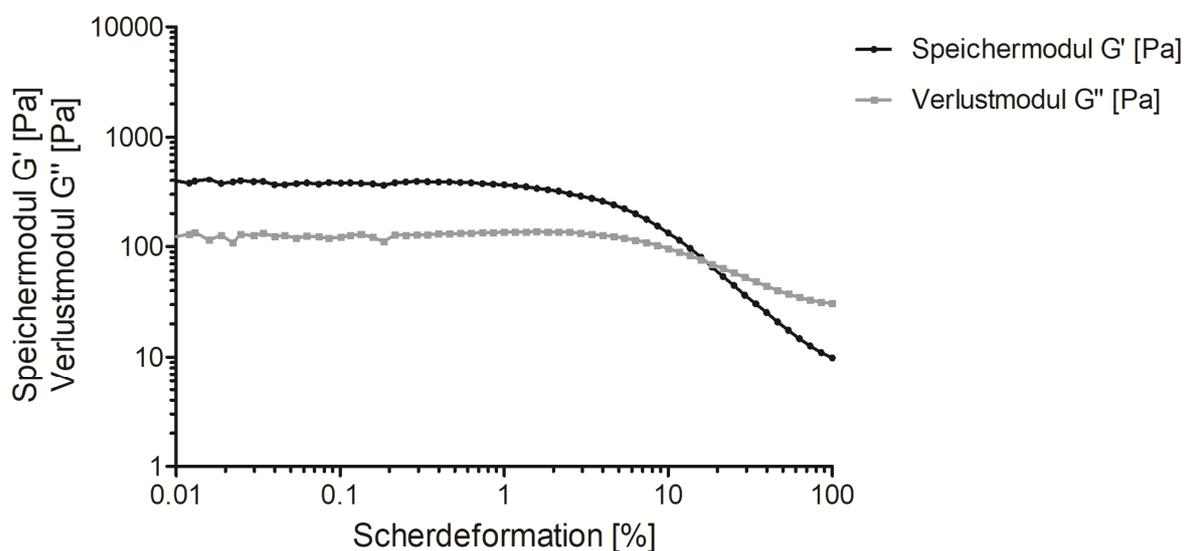


Abbildung 54: Amplitudensweep des Mikroemulsion-basierten Organogels 21 (MBO 21), 24 Stunden nach Herstellung. Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (Einfachbestimmung), Zusammensetzung = 1,5 Gew.-% Aerosil®, 3,5 Gew.-% Natriumalginat, 1,5 Gew.-% Dehydroxanthan; Kreisfrequenz = 10 rad/s; Messtemperatur = 25 °C, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt = 500 μm

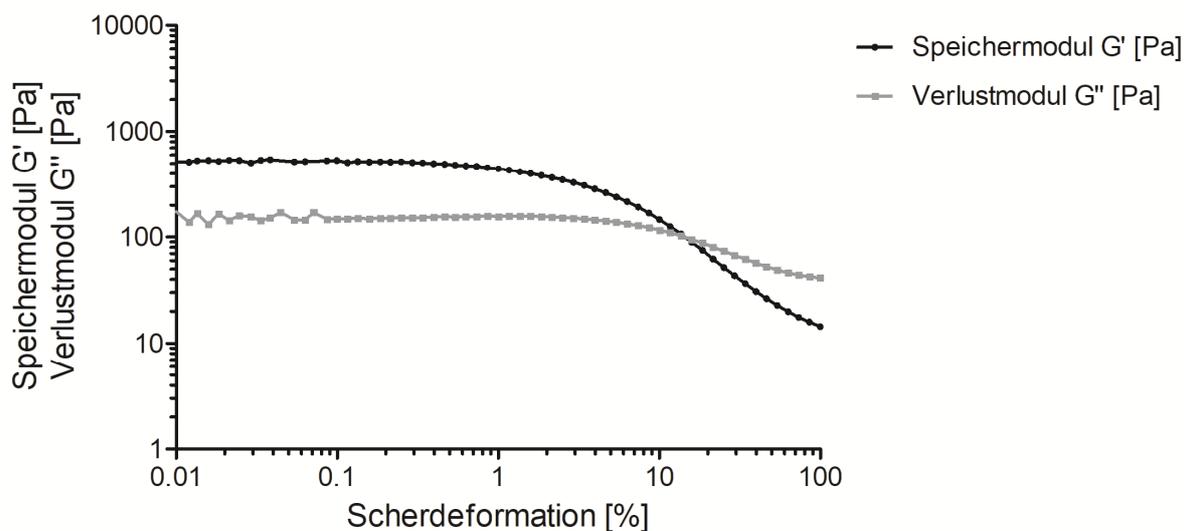


Abbildung 55: Amplitudensweep des Mikroemulsion-basierten Organogels 22 (MBO 22), 24 Stunden nach Herstellung. Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (Einfachbestimmung), Zusammensetzung = 1,75 Gew.-% Aerosil®, 3,5 Gew.-% Natriumalginat, 1,5 Gew.-% Dehydroxanthan; Kreisfrequenz = 10 rad/s; Messtemperatur = 25 °C, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt = 500 μm

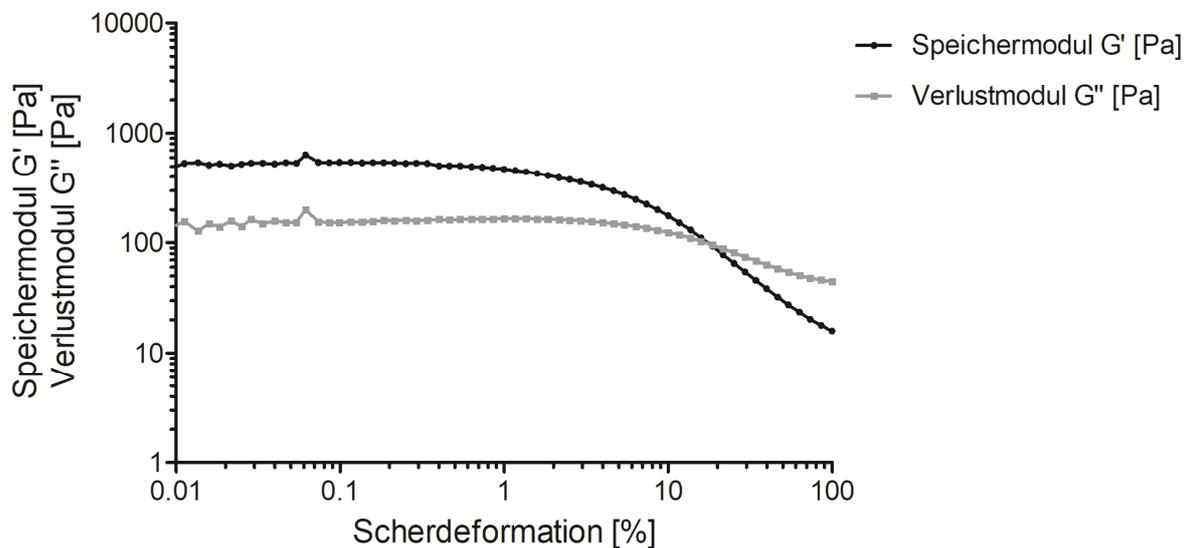


Abbildung 56: Amplitudensweep des Mikroemulsion-basierten Organogels 23 (MBO 23), 24 Stunden nach Herstellung. Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (Einfachbestimmung), Zusammensetzung = 2,0 Gew.-% Aerosil®, 3,5 Gew.-% Natriumalginat, 1,5 Gew.-% Dehydroxanthan; Kreisfrequenz = 10 rad/s; Messtemperatur = 25 °C, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt = 500 μm

V. Rheogramme: Lagerungsstabilitätsuntersuchung von MBO 16 und MBO 18

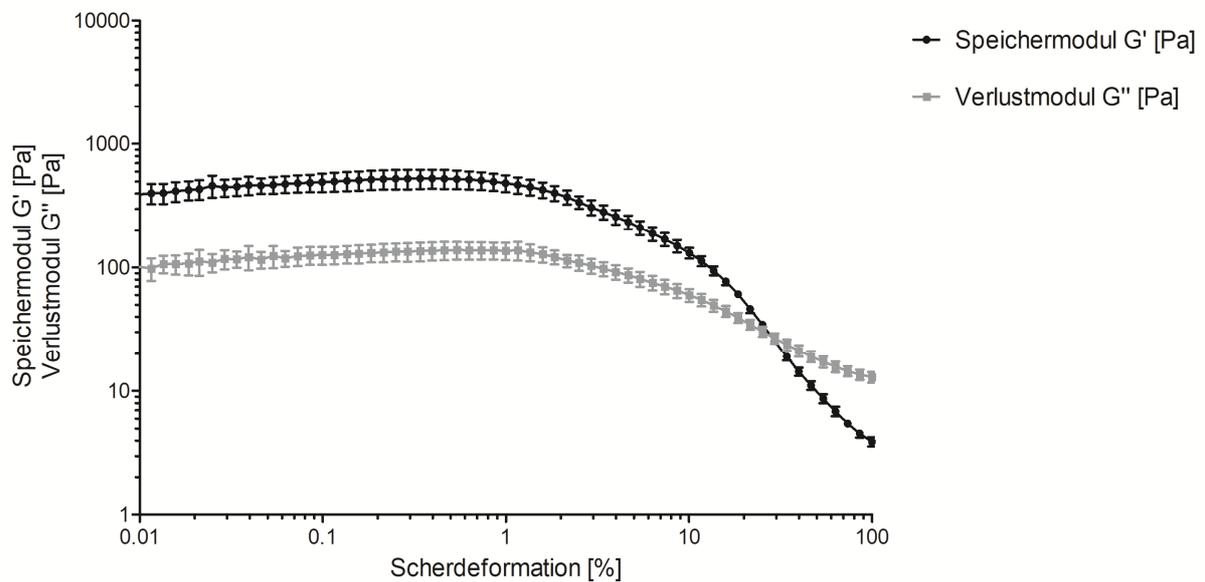


Abbildung 57: Amplitudensweep des Mikroemulsion-basierten Organogels 16 (MBO 16) an Tag 1 der Lagerungsstabilitäts-Untersuchung. Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (MW \pm SD; n = 3), Zusammensetzung = 1,0 Gew.-% Aerosil®, 3,75 Gew.-% Natriumalginat; Kreisfrequenz = 10 rad/s; Messtemperatur = 25 °C, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt = 500 μ m

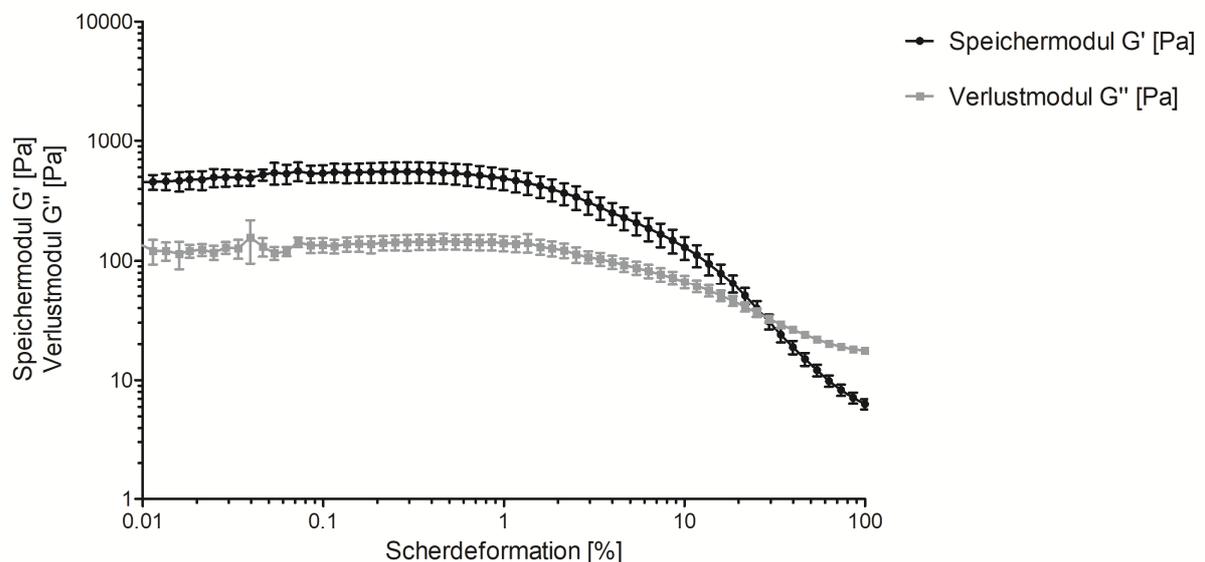


Abbildung 58: Amplitudensweep des Mikroemulsion-basierten Organogels 16 (MBO 16) nach einmonatiger Lagerung bei 25 °C, 60 %rH (relative Luftfeuchtigkeit). Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (MW \pm SD; n = 3), Zusammensetzung = 1,0 Gew.-% Aerosil®, 3,75 Gew.-% Natriumalginat; Kreisfrequenz = 10 rad/s; Messtemperatur = 25 °C, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt = 500 μ m

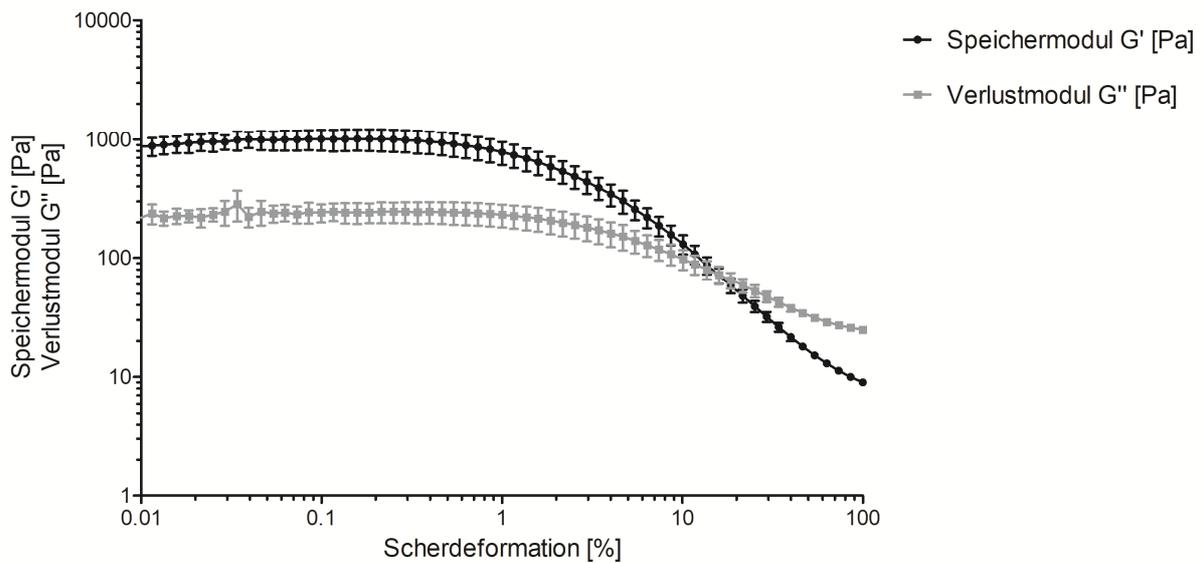


Abbildung 59: Amplitudensweep des Mikroemulsion-basierten Organogels 16 (MBO 16) nach einmonatiger Lagerung bei 40 °C, 75 %rH (relative Luftfeuchtigkeit). Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa ($MW \pm SD$; $n = 3$), Zusammensetzung = 1,0 Gew.-% Aerosil®, 3,75 Gew.-% Natriumalginat; Kreisfrequenz = 10 rad/s; Messtemperatur = 25 °C, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt = 500 μm

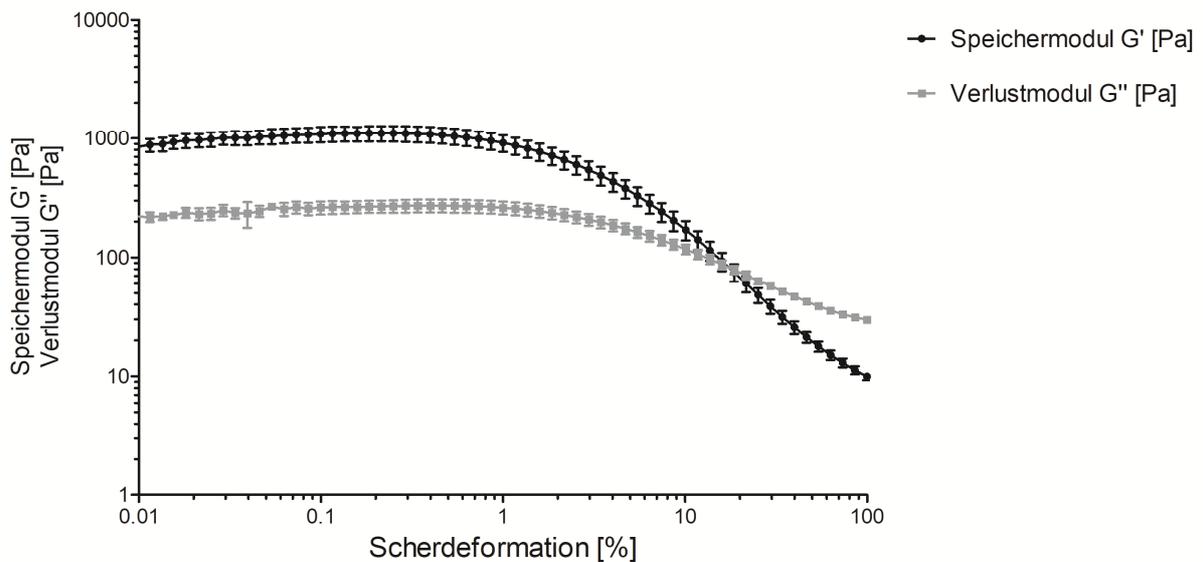


Abbildung 60: Amplitudensweep des Mikroemulsion-basierten Organogels 18 (MBO 18) an Tag 1 der Lagerungsstabilitäts-Untersuchung. Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa ($MW \pm SD$; $n = 3$), Zusammensetzung = 1,0 Gew.-% Aerosil®, 3,0 Gew.-% Natriumalginat, 1,0 Gew.-% Dehydroxanthan; Kreisfrequenz = 10 rad/s; Messtemperatur = 25 °C, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt = 500 μm

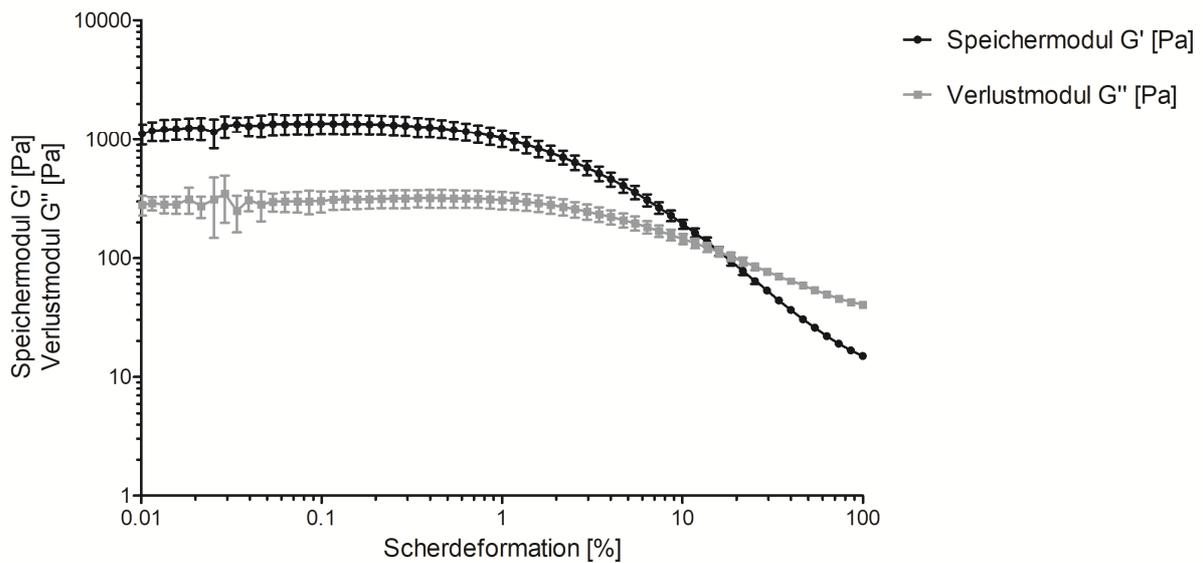


Abbildung 61: Amplitudensweep des Mikroemulsion-basierten Organogels 18 (MBO 18) nach einmonatiger Lagerung bei 25 °C, 60 %rH (relative Luftfeuchtigkeit). Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (MW \pm SD; n = 3), Zusammensetzung = 1,0 Gew.-% Aerosil®, 3,0 Gew.-% Natriumalginat, 1,0 Gew.-% Dehydroxanthan; Kreisfrequenz = 10 rad/s; Messtemperatur = 25 °C, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt = 500 μ m

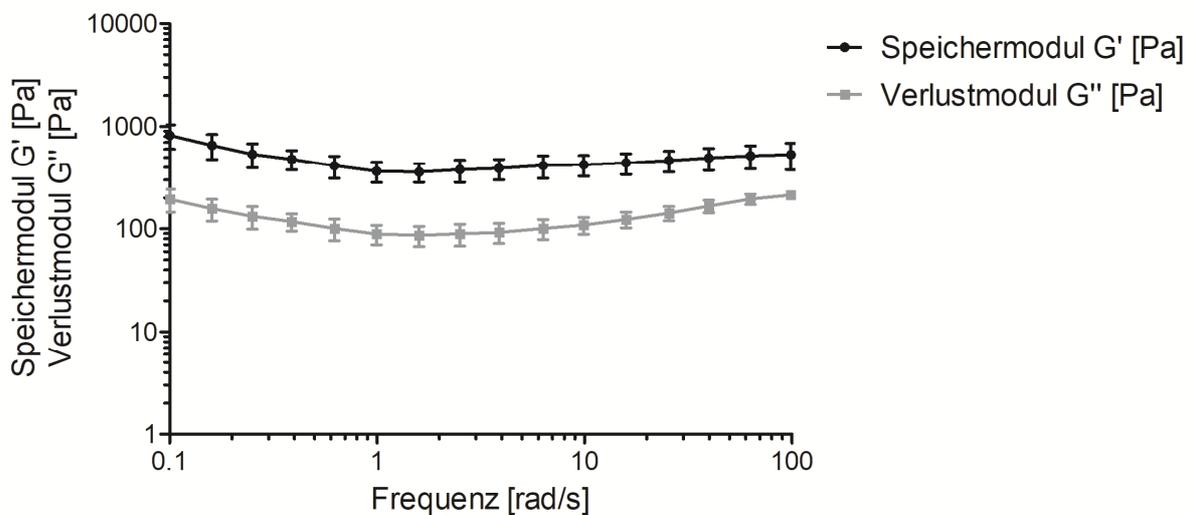


Abbildung 62: Frequenzsweep des Mikroemulsion-basierten Organogels 16 (MBO 16) an Tag 1 der Lagerungsstabilitäts-Untersuchung. Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (MW \pm SD; n = 3), Zusammensetzung = 1,0 Gew.-% Aerosil®, 3,75 Gew.-% Natriumalginat; Scherdeformation = 0,25 %; Messtemperatur = 25 °C, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt = 500 μ m

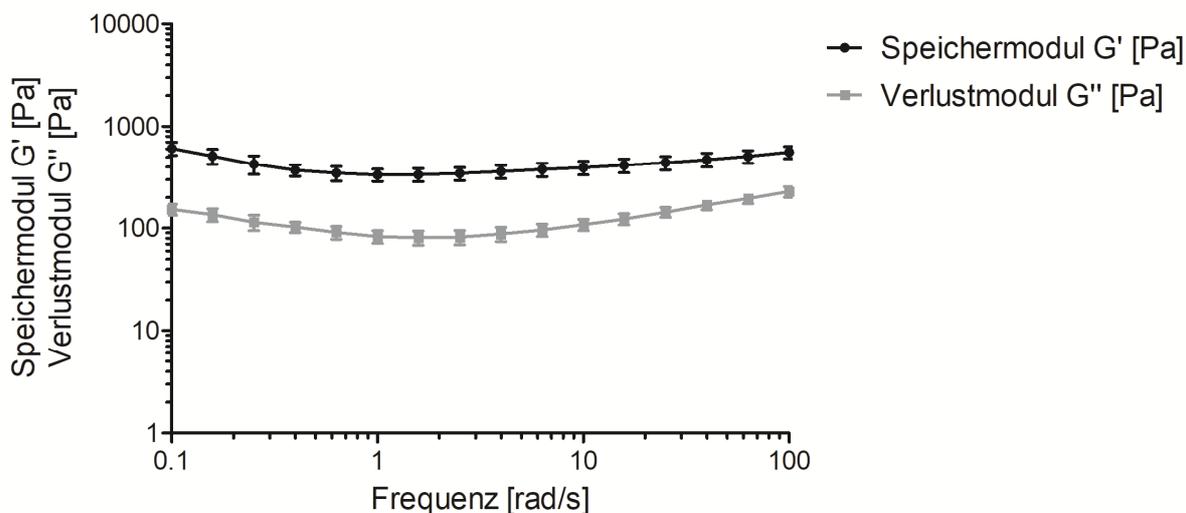


Abbildung 63: Frequenzsweep des Mikroemulsion-basierten Organogels 16 (MBO 16) nach einmonatiger Lagerung bei 25 °C, 60 %rH (relative Luftfeuchtigkeit). Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (MW ± SD; n = 3), Zusammensetzung = 1,0 Gew.-% Aerosil®, 3,75 Gew.-% Natriumalginat; Scherdeformation = 0,25 %; Messtemperatur = 25 °C, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt = 500 µm

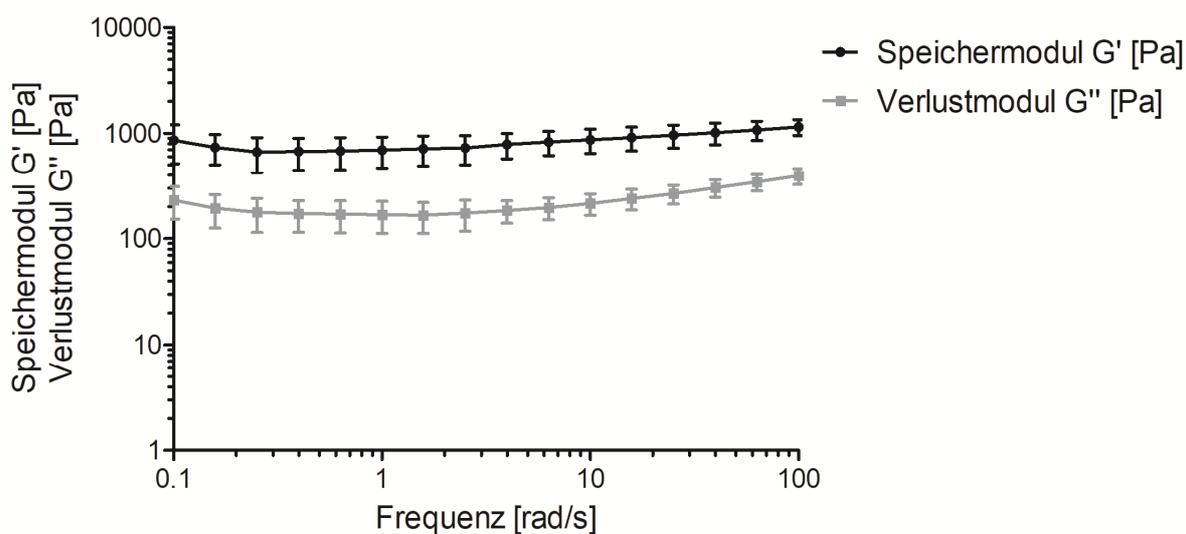


Abbildung 64: Frequenzsweep des Mikroemulsion-basierten Organogels 16 (MBO 16) nach einmonatiger Lagerung bei 40 °C, 75 %rH (relative Luftfeuchtigkeit). Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (MW ± SD; n = 3), Zusammensetzung = 1,0 Gew.-% Aerosil®, 3,75 Gew.-% Natriumalginat; Scherdeformation = 0,25 %; Messtemperatur = 25 °C, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt = 500 µm

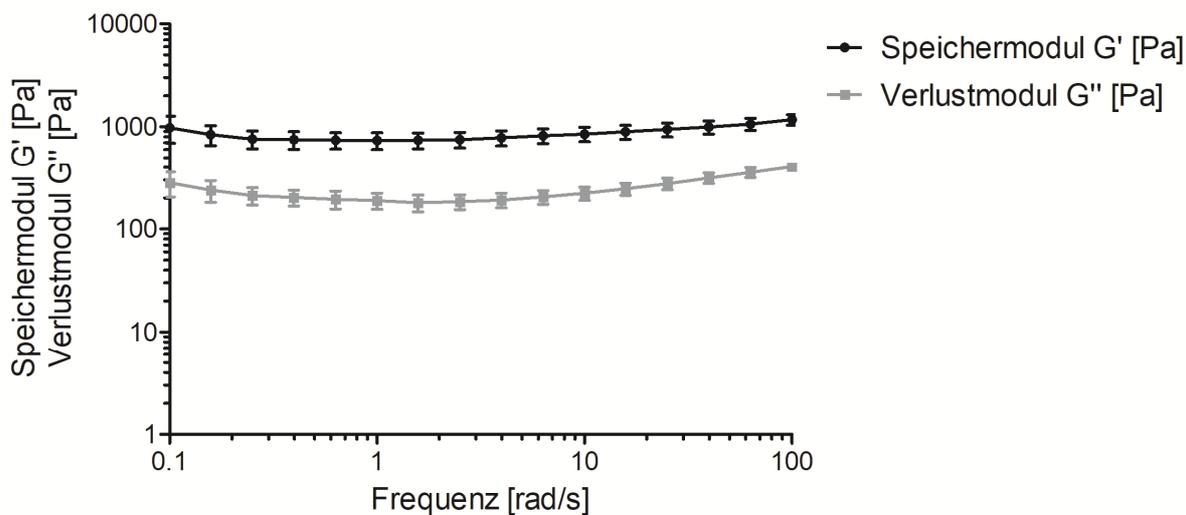


Abbildung 65: Frequenzsweep des Mikroemulsion-basierten Organogels 18 (MBO 18) an Tag 1 der Lagerungsstabilitäts-Untersuchung. Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa ($MW \pm SD$; $n = 3$), Zusammensetzung = 1,0 Gew.-% Aerosil®, 3,0 Gew.-% Natriumalginat, 1,0 Gew.-% Dehydroxanthan; Scherdeformation = 0,25 %; Messtemperatur = 25 °C, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt = 500 μm

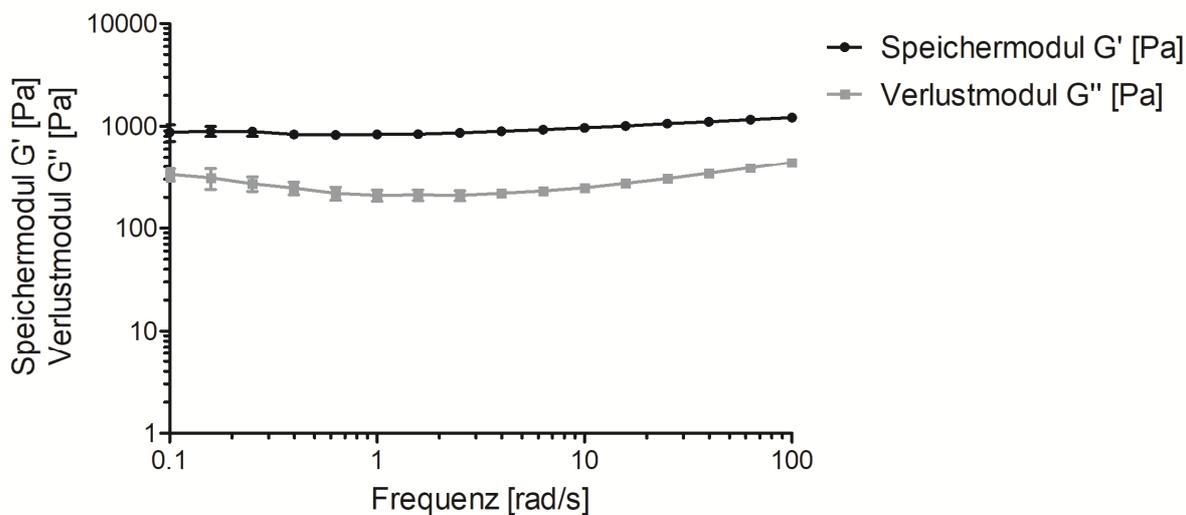


Abbildung 66: Frequenzsweep des Mikroemulsion-basierten Organogels 18 (MBO 18) nach einmonatiger Lagerung bei 25 °C, 60 %rH (relative Luftfeuchtigkeit). Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa ($MW \pm SD$; $n = 3$), Zusammensetzung = 1,0 Gew.-% Aerosil®, 3,0 Gew.-% Natriumalginat, 1,0 Gew.-% Dehydroxanthan; Scherdeformation = 0,25 %; Messtemperatur = 25 °C, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt = 500 μm

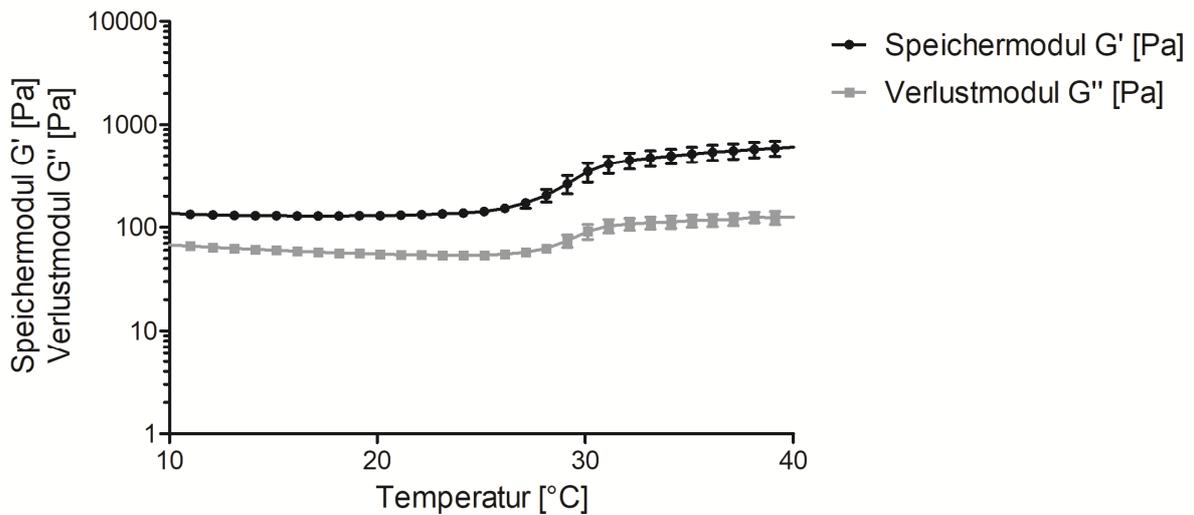


Abbildung 67: Temperatursweep des Mikroemulsion-basierten Organogels 16 (MBO 16) an Tag 1 der Lagerungsstabilitäts-Untersuchung. Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (MW \pm SD; n = 3), Zusammensetzung = 1,0 Gew.-% Aerosil®, 3,75 Gew.-% Natriumalginat; Scherdeformation = 0,25 %; Kreisfrequenz = 10 rad/s, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt = 500 μ m

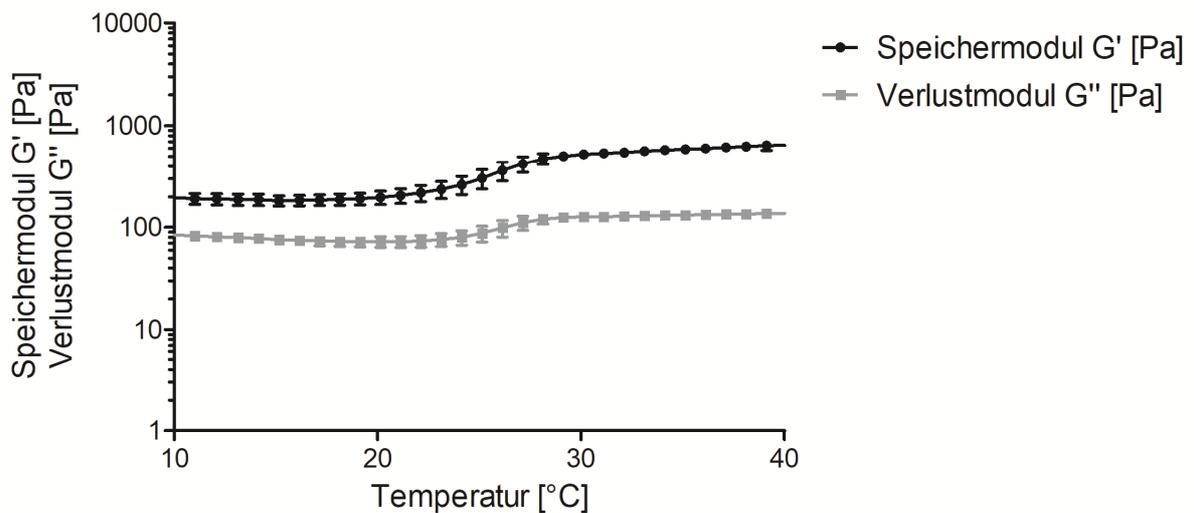


Abbildung 68: Temperatursweep des Mikroemulsion-basierten Organogels 16 (MBO 16) nach einmonatiger Lagerung bei 25 °C, 60 %rH (relative Luftfeuchtigkeit). Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (MW \pm SD; n = 3), Zusammensetzung = 1,0 Gew.-% Aerosil®, 3,75 Gew.-% Natriumalginat; Scherdeformation = 0,25 %; Kreisfrequenz = 10 rad/s, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt = 500 μ m

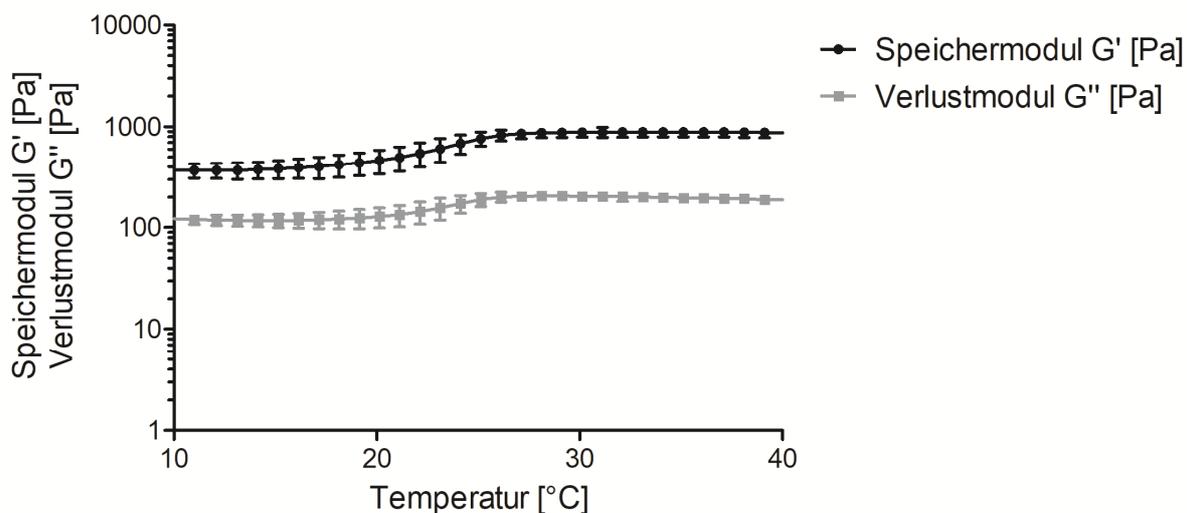


Abbildung 69: Temperatursweep des Mikroemulsion-basierten Organogels 16 (MBO 16) nach einmonatiger Lagerung bei 40 °C, 75 %rH (relative Luftfeuchtigkeit). Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (MW ± SD; n = 3), Zusammensetzung = 1,0 Gew.-% Aerosil®, 3,75 Gew.-% Natriumalginat; Scherdeformation = 0,25 %; Kreisfrequenz = 10 rad/s, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt = 500 µm

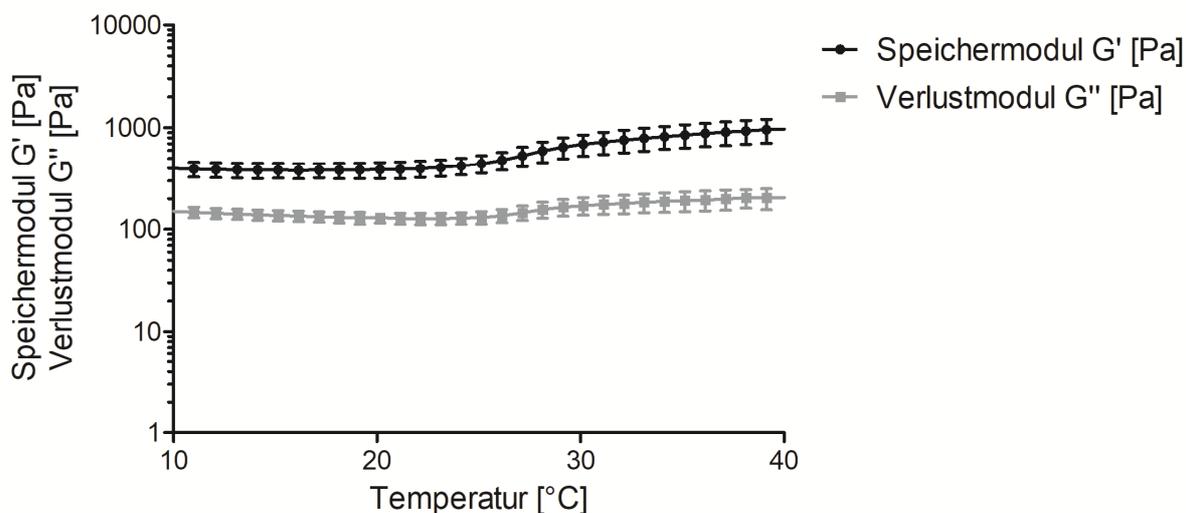


Abbildung 70: Temperatursweep des Mikroemulsion-basierten Organogels 18 (MBO 18) an Tag 1 der Lagerungsstabilitäts-Untersuchung. Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (MW ± SD; n = 3), Zusammensetzung = 1,0 Gew.-% Aerosil®, 3,0 Gew.-% Natriumalginat, 1,0 Gew.-% Dehydroxanthan; Scherdeformation = 0,25 %; Kreisfrequenz = 10 rad/s, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt = 500 µm

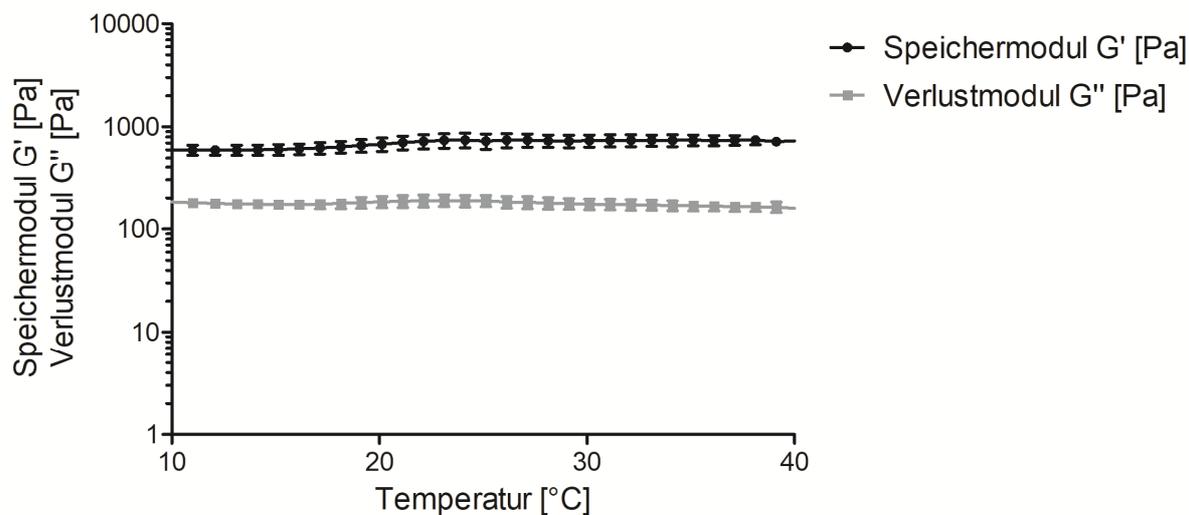


Abbildung 71: Temperatursweep des Mikroemulsion-basierten Organogels 18 (MBO 18) nach einmonatiger Lagerung bei 25 °C, 60 %rH (relative Luftfeuchtigkeit). Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (MW ± SD; n = 3), Zusammensetzung = 1,0 Gew.-% Aerosil®, 3,0 Gew.-% Natriumalginat, 1,0 Gew.-% Dehydroxanthan; Scherdeformation = 0,25 %; Kreisfrequenz = 10 rad/s, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt = 500 µm

VI. Rheogramme: Entwicklung eines Hydrogels auf Poloxamerbasis

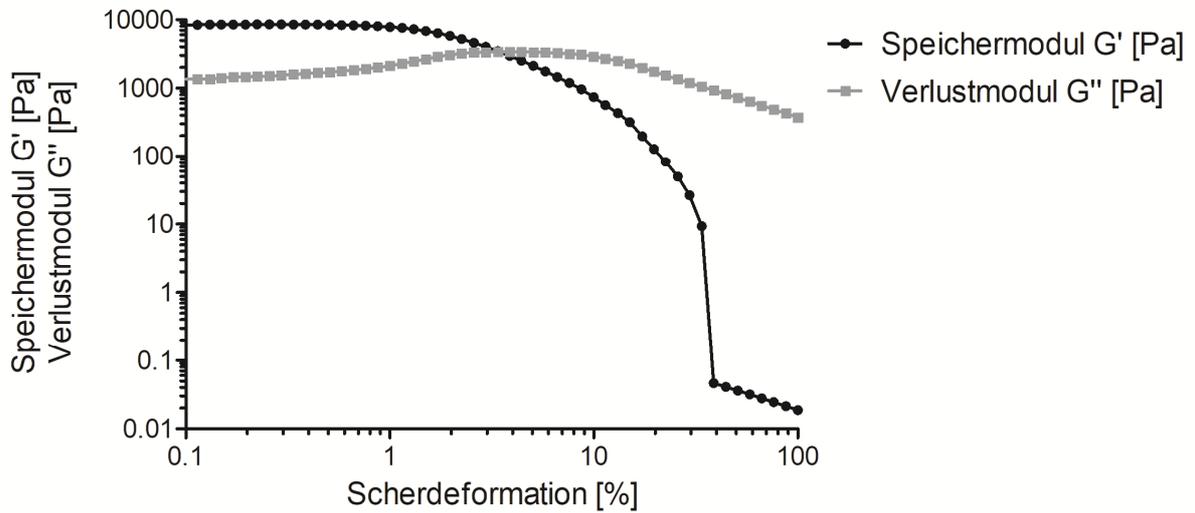


Abbildung 72: Amplitudensweep des Poloxamer-Hydrogels 3 (Po 3), 24 Stunden nach Herstellung. Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (Einfachbestimmung), Zusammensetzung = 16,0 Gew.-% Poloxamer 407; Kreisfrequenz = 10 rad/s, Messtemperatur = 32 °C, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt = 500 μm

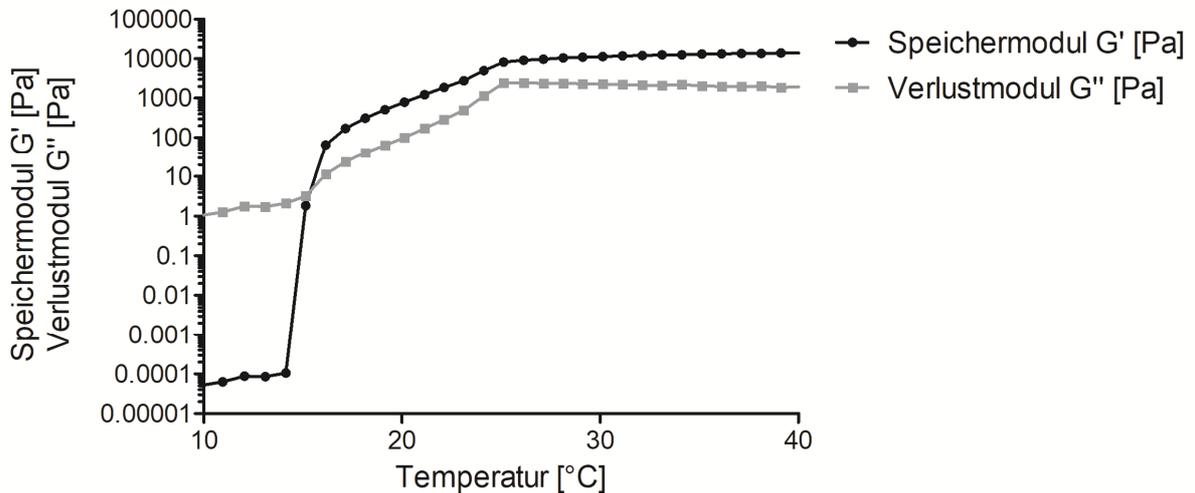


Abbildung 73: Temperatursweep des Poloxamer-Hydrogels 3 (Po 3), 24 Stunden nach Herstellung. Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (Einfachbestimmung), Zusammensetzung = 16,0 Gew.-% Poloxamer 407; Scherdeformation = 0,5 %, Kreisfrequenz = 10 rad/s, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt = 500 μm

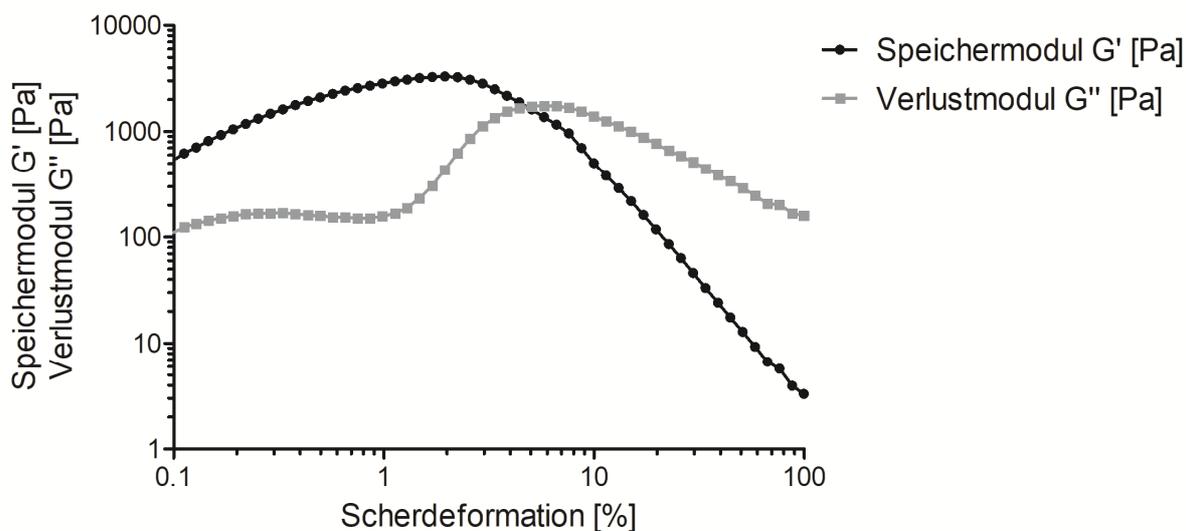


Abbildung 74: Amplitudensweep des Poloxamer-Hydrogels 4 (Po 4), 24 Stunden nach Herstellung. Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (Einfachbestimmung), Zusammensetzung = 16,0 Gew.-% Poloxamer 407, 15,0 Gew.-% Poloxamer 188; Kreisfrequenz = 10 rad/s, Messtemperatur = 32 °C, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt = 500 μm

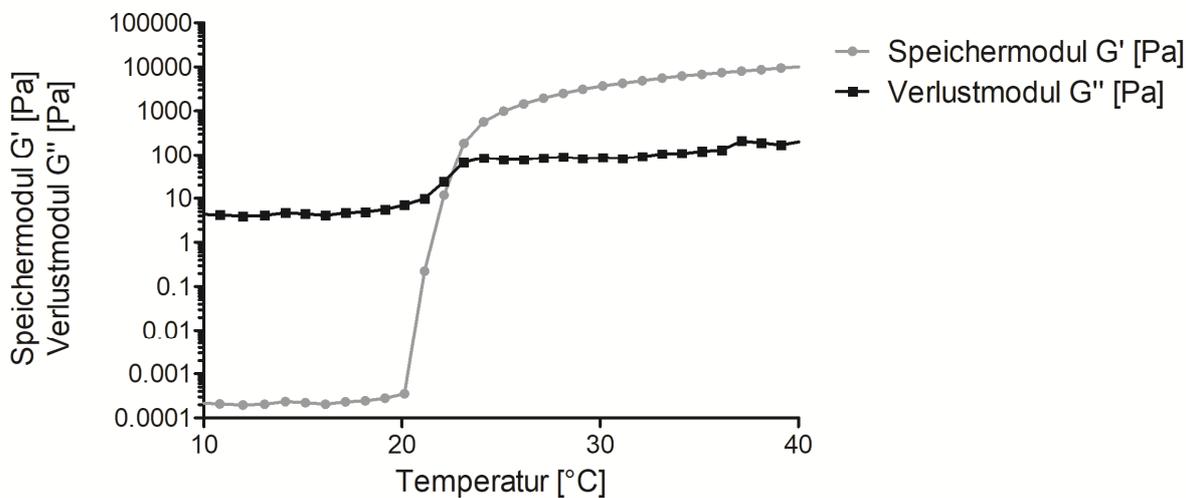


Abbildung 75: Temperaturesweep des Poloxamer-Hydrogels 4 (Po 4), 24 Stunden nach Herstellung. Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (Einfachbestimmung), Zusammensetzung = 16,0 Gew.-% Poloxamer 407, 15,0 Gew.-% Poloxamer 188; Scherdeformation = 0,5 %, Kreisfrequenz = 10 rad/s, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt = 500 μm

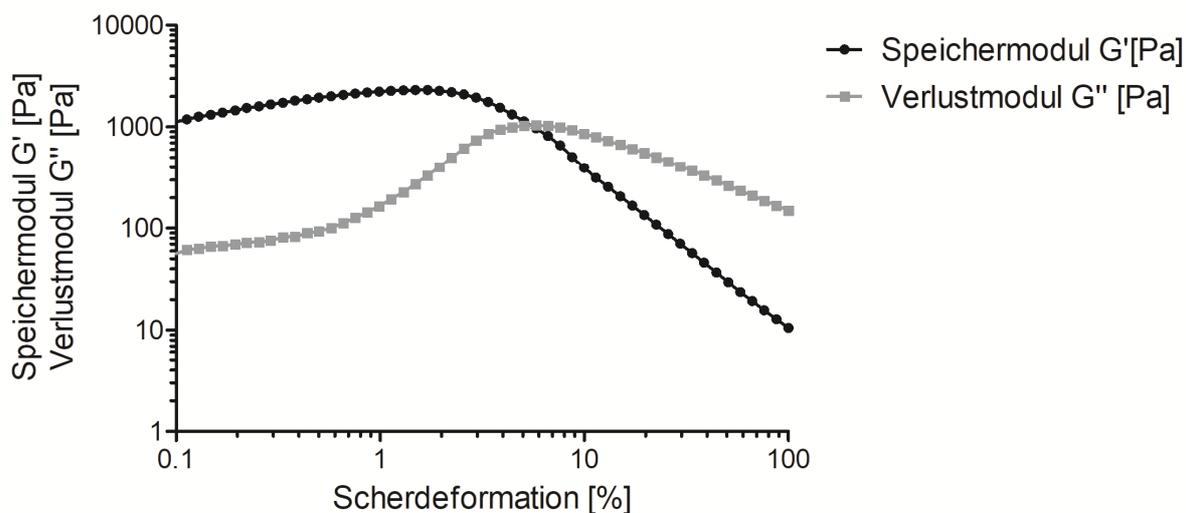


Abbildung 76: Amplitudensweep des Poloxamer-Hydrogels 5 (Po 5), 24 Stunden nach Herstellung. Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (Einfachbestimmung), Zusammensetzung = 16,0 Gew.-% Poloxamer 407, 10,0 Gew.-% Poloxamer 188; Kreisfrequenz = 10 rad/s, Messtemperatur = 32 °C, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt = 500 μ m

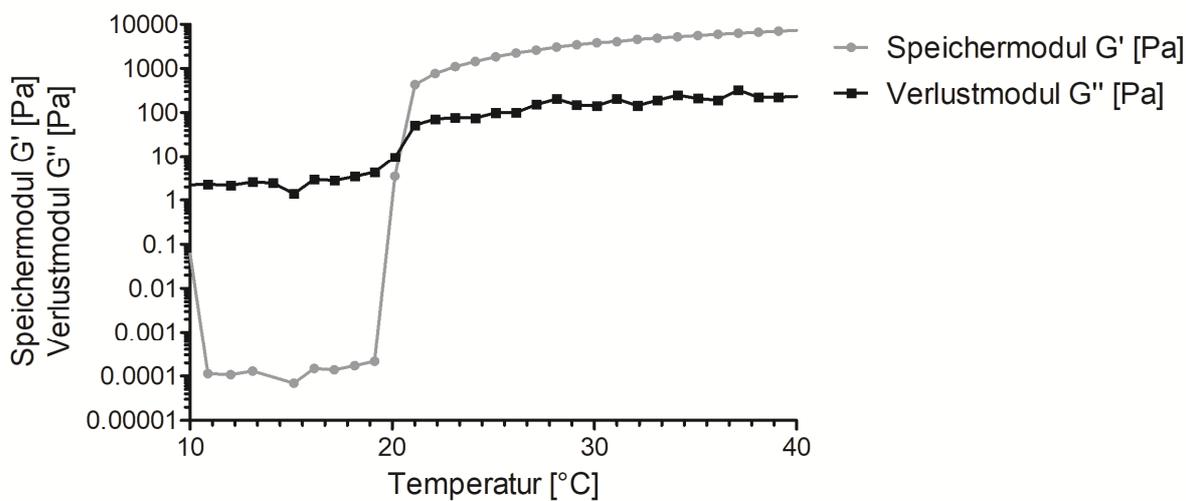


Abbildung 77: Temperaturesweep des Poloxamer-Hydrogels 5 (Po 5), 24 Stunden nach Herstellung. Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (Einfachbestimmung), Zusammensetzung = 16,0 Gew.-% Poloxamer 407, 10,0 Gew.-% Poloxamer 188; Scherdeformation = 0,5 %, Kreisfrequenz = 10 rad/s, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt = 500 μ m

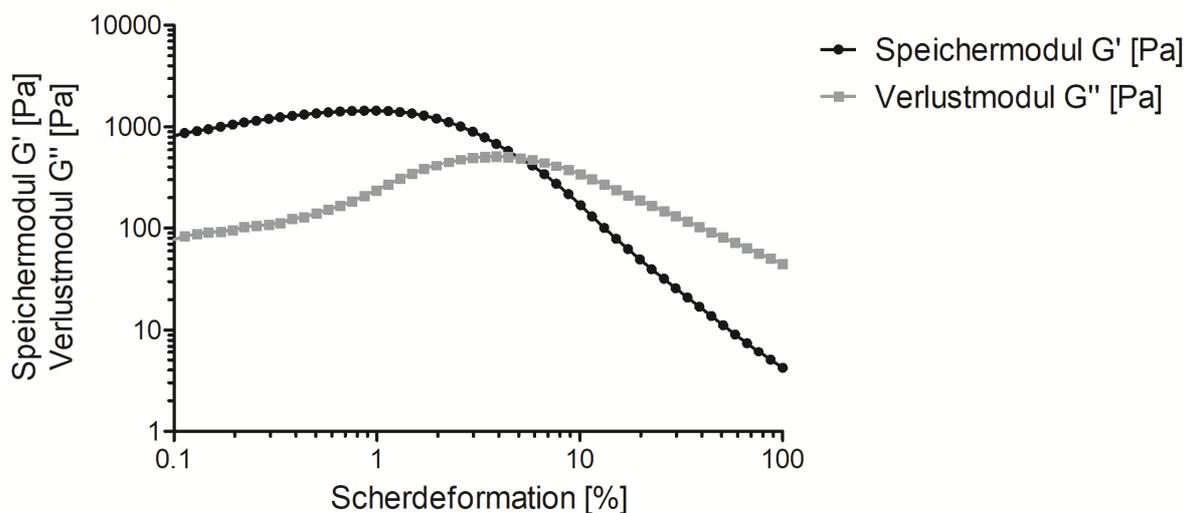


Abbildung 78: Amplitudensweep des Poloxamer-Hydrogels 6 (Po 6), 24 Stunden nach Herstellung. Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (Einfachbestimmung), Zusammensetzung = 16,0 Gew.-% Poloxamer 407, 5,0 Gew.-% Poloxamer 188; Kreisfrequenz = 10 rad/s, Messtemperatur = 32 °C, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt = 500 μ m

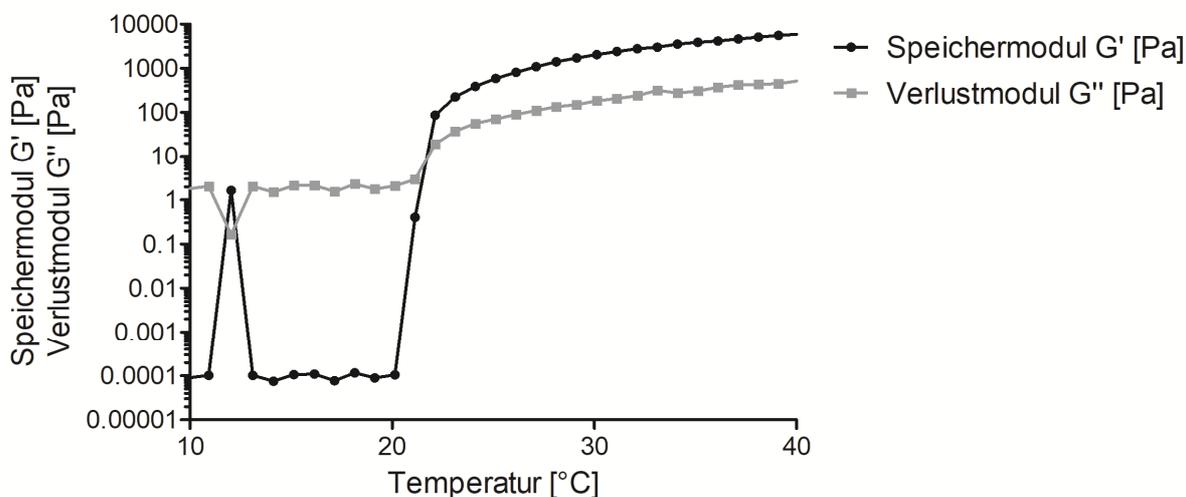


Abbildung 79: Temperatursweep des Poloxamer-Hydrogels 6 (Po 6), 24 Stunden nach Herstellung. Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (Einfachbestimmung), Zusammensetzung = 16,0 Gew.-% Poloxamer 407, 5,0 Gew.-% Poloxamer 188; Scherdeformation = 0,5 %, Kreisfrequenz = 10 rad/s, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt = 500 μ m

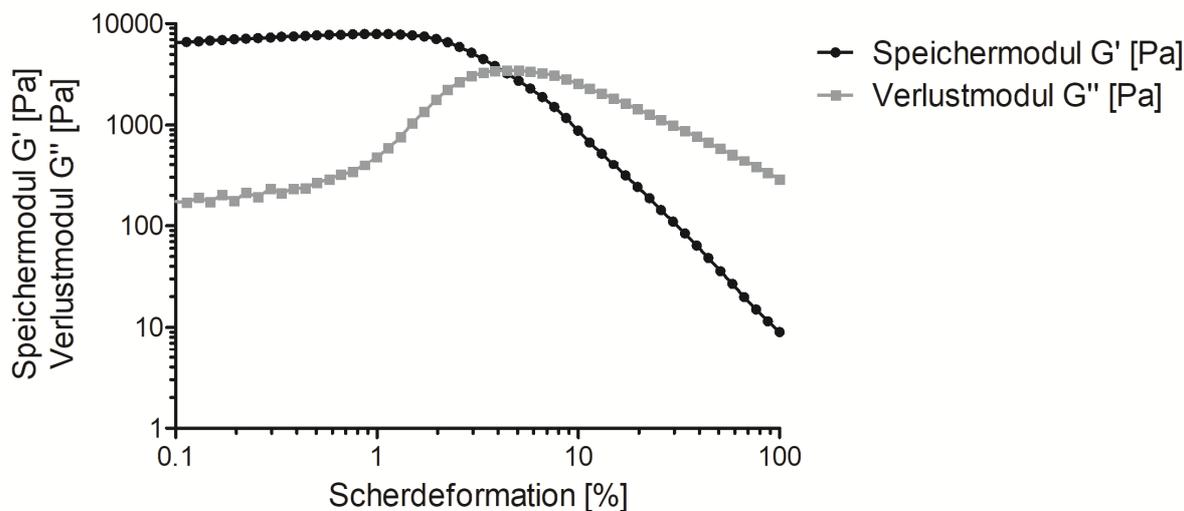


Abbildung 80: Amplitudensweep des Poloxamer-Hydrogels 7 (Po 7), 24 Stunden nach Herstellung. Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (Einfachbestimmung), Zusammensetzung = 18,0 Gew.-% Poloxamer 407, 15,0 Gew.-% Poloxamer 188; Kreisfrequenz = 10 rad/s, Messtemperatur = 32 °C, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt = 500 μm

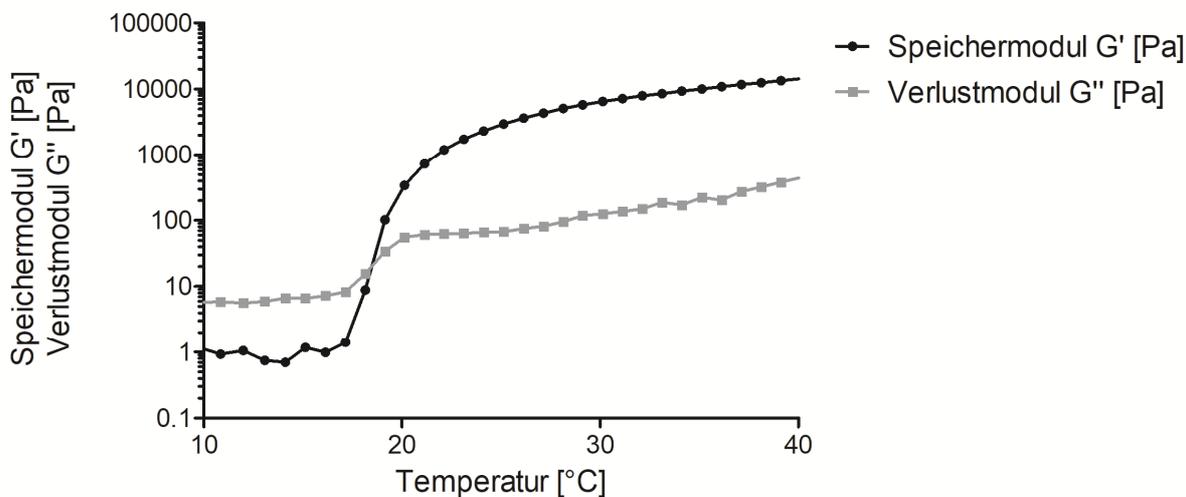


Abbildung 81: Temperaturesweep des Poloxamer-Hydrogels 7 (Po 7), 24 Stunden nach Herstellung. Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (Einfachbestimmung), Zusammensetzung = 18,0 Gew.-% Poloxamer 407, 15,0 Gew.-% Poloxamer 188; Scherdeformation = 0,5 %, Kreisfrequenz = 10 rad/s, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt = 500 μm

VII. Rheogramme: Entwicklung eines Hydrogels auf Hyaluronsäurebasis

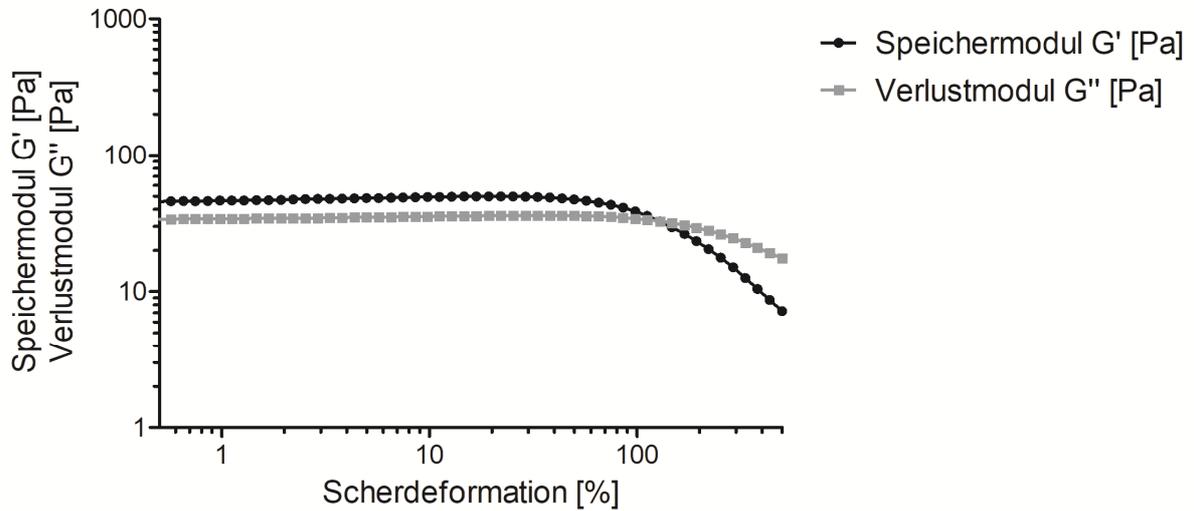


Abbildung 82: Amplitudensweep des Hyaluronsäure-Hydrogels 2 (Hy 2), 24 Stunden nach Herstellung. Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (Einfachbestimmung), Zusammensetzung = 1,0 Gew.-% VLMW-HA, 1,0 Gew.-% HMW-HA; Kreisfrequenz = 10 rad/s, Messtemperatur = 32 °C, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt = 500 μm

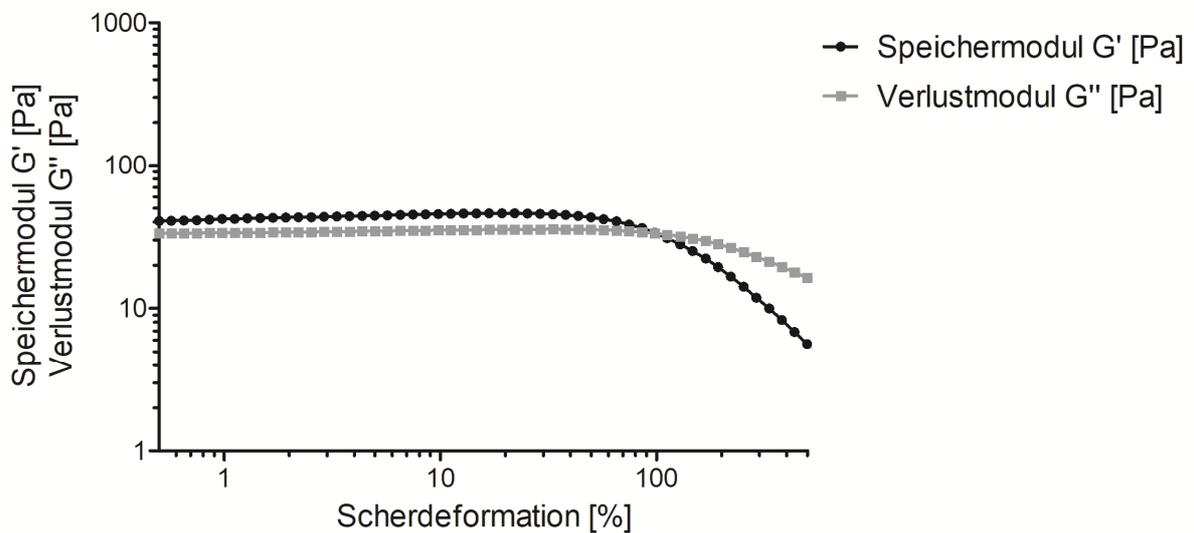


Abbildung 83: Amplitudensweep des Hyaluronsäure-Hydrogels 3 (Hy 3), 24 Stunden nach Herstellung. Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (Einfachbestimmung), Zusammensetzung = 1,0 Gew.-% VLMW-HA, 1,0 Gew.-% SMW-HA; Kreisfrequenz = 10 rad/s, Messtemperatur = 32 °C, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt = 500 μm

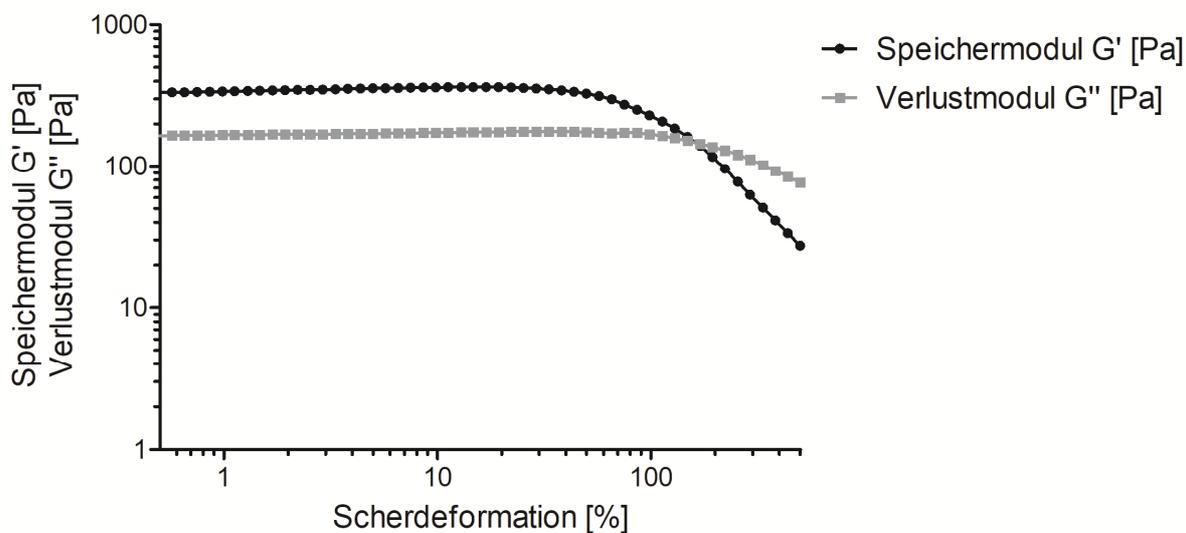


Abbildung 84: Amplitudensweep des Hyaluronsäure-Hydrogels 4 (Hy 4), 24 Stunden nach Herstellung. Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (Einfachbestimmung), Zusammensetzung = 1,0 Gew.-% VLMW-HA, 1,0 Gew.-% SMW-HA, 1,0 Gew.-% HMW-HA; Kreisfrequenz = 10 rad/s, Messtemperatur = 32 °C, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt = 500 μm

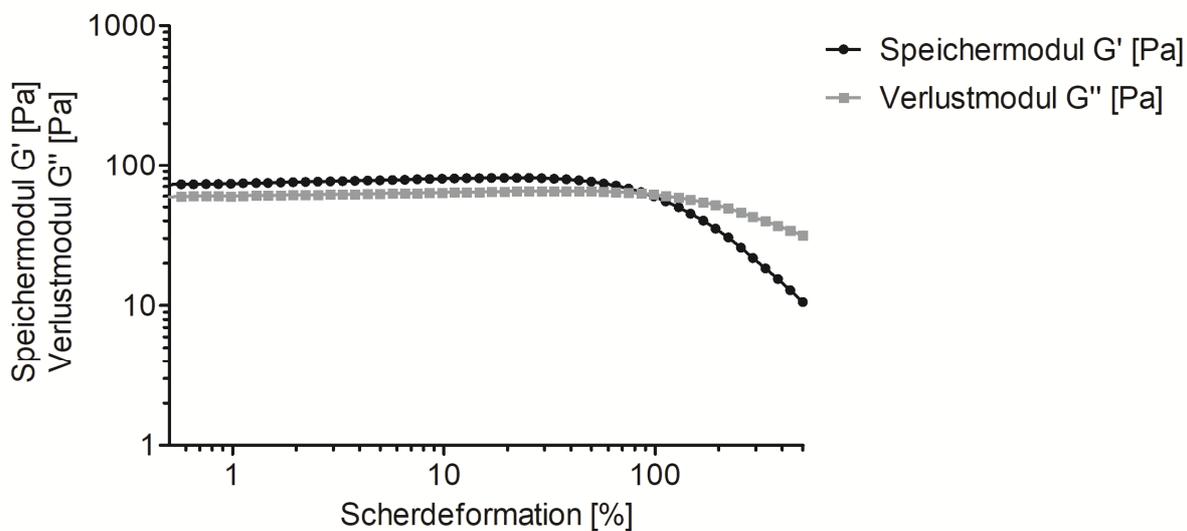


Abbildung 85: Amplitudensweep des Hyaluronsäure-Hydrogels 7 (Hy 7), 24 Stunden nach Herstellung. Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (Einfachbestimmung), Zusammensetzung = 1,0 Gew.-% LMW-HA, 1,0 Gew.-% HMW-HA; Kreisfrequenz = 10 rad/s, Messtemperatur = 32 °C, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt = 500 μm

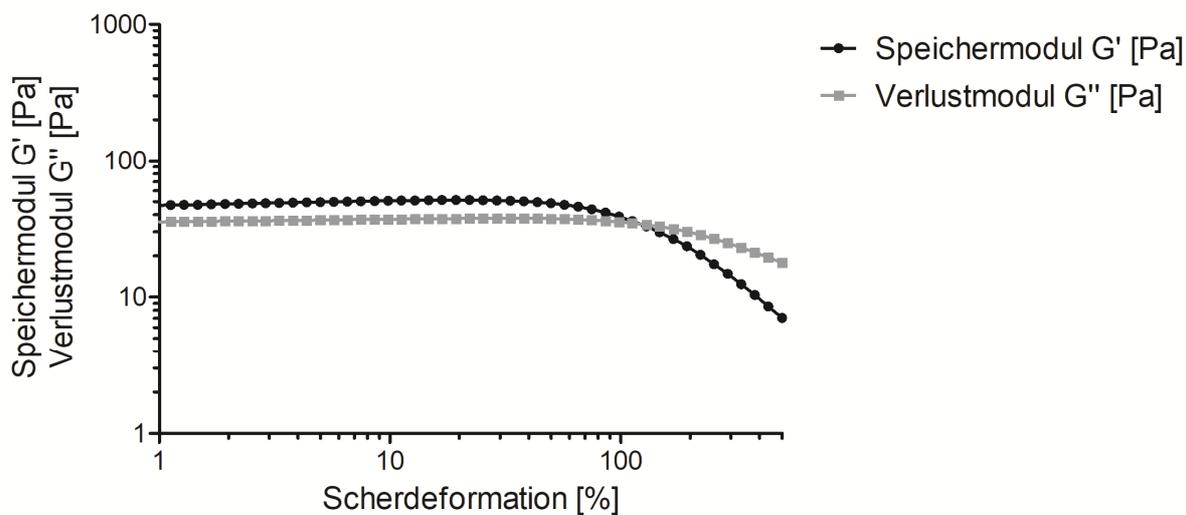


Abbildung 86: Amplitudensweep des Hyaluronsäure-Hydrogels 9 (Hy 9), 24 Stunden nach Herstellung. Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (Einfachbestimmung), Zusammensetzung = 1,0 Gew.-% HMW-HA; Kreisfrequenz = 10 rad/s, Messtemperatur = 32 °C, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt = 500 μm

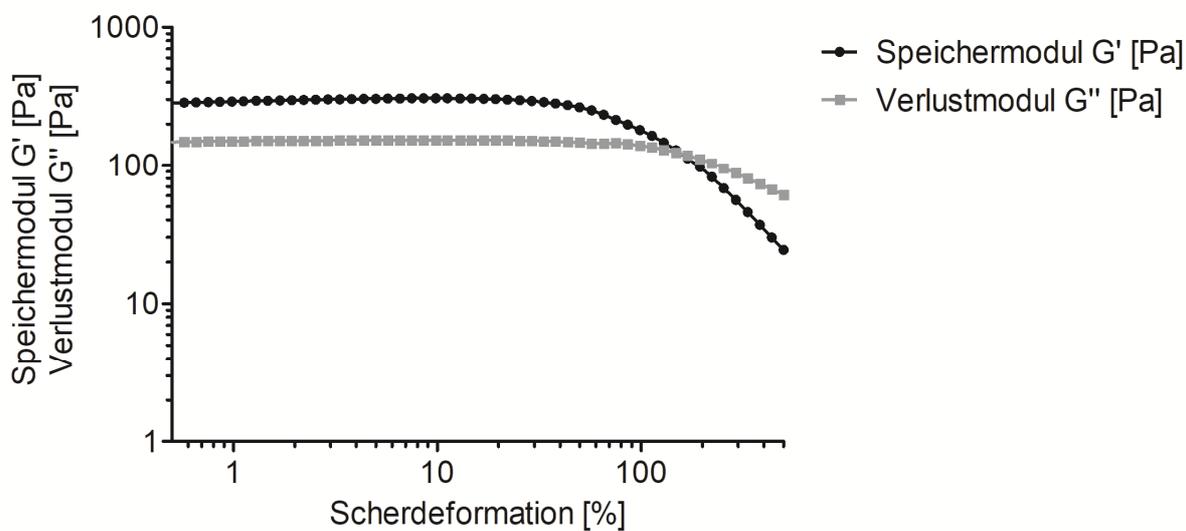


Abbildung 87: Amplitudensweep des Hyaluronsäure-Hydrogels 10 (Hy 10), 24 Stunden nach Herstellung. Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (Einfachbestimmung), Zusammensetzung = 2,0 Gew.-% SMW-HA; Kreisfrequenz = 10 rad/s, Messtemperatur = 32 °C, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt = 500 μm

VIII. Rheogramme: Entwicklung hyaluronsäuremodifizierter Poloxamergele

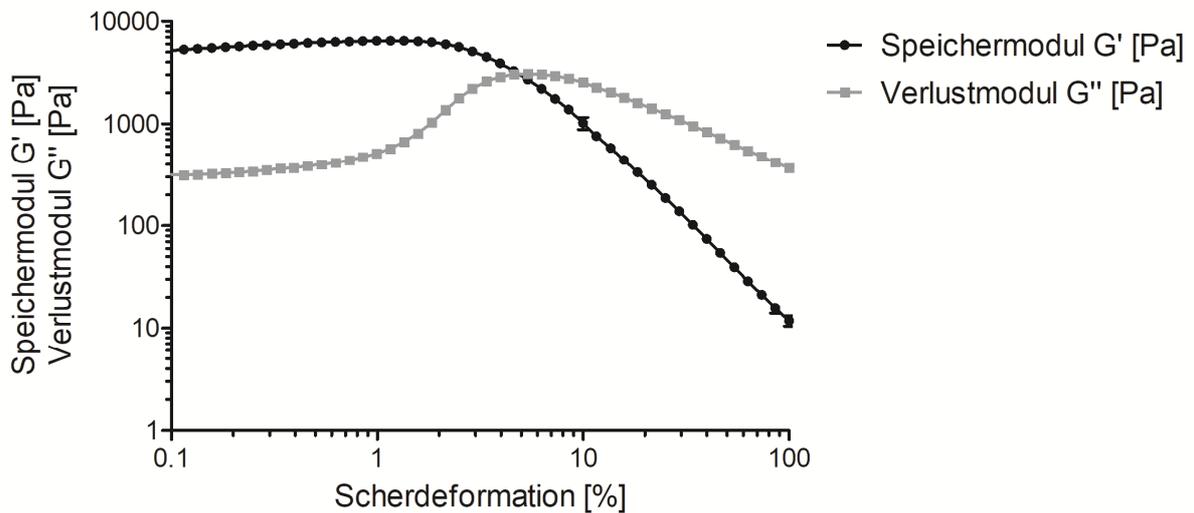


Abbildung 88: Amplitudensweep des Hyaluronsäure-modifizierten Poloxamergels 1 (HyPo 1), 72 Stunden nach Herstellung. Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (Einfachbestimmung), Zusammensetzung = 18,0 Gew.-% P407, 15,0 Gew.-% P188, 0,5 Gew.-% VLMW-HA; Kreisfrequenz = 10 rad/s, Messtemperatur = 32 °C, Platte-Platte-Messapparat, Messspalt = 500 μm

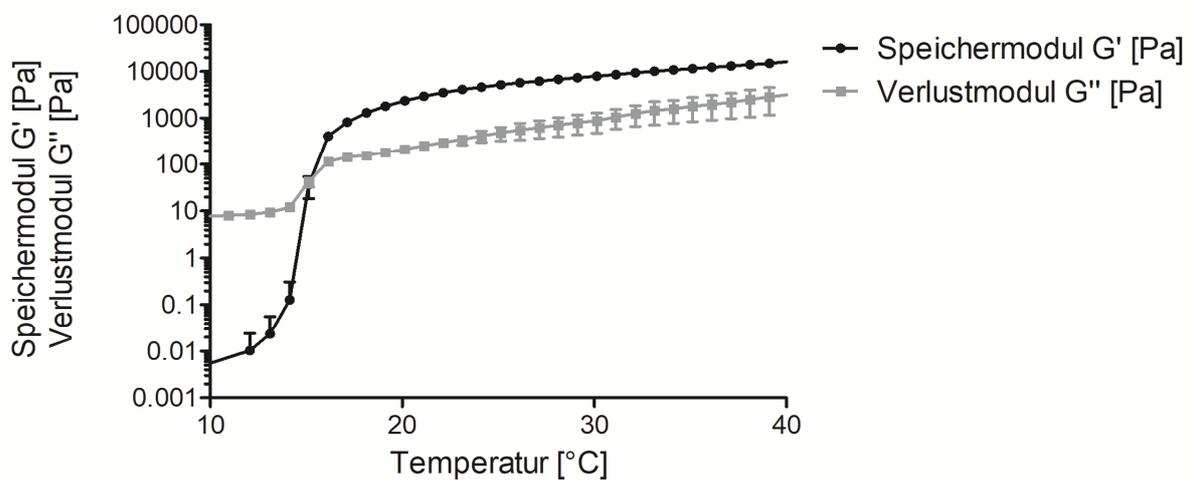


Abbildung 89: Temperatursweep des Hyaluronsäure-modifizierten Poloxamergels 1 (HyPo 1), 120 Stunden nach Herstellung. Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (Einfachbestimmung), Zusammensetzung = 18,0 Gew.-% P407, 15,0 Gew.-% P188, 0,5 Gew.-% VLMW-HA; Scherdeformation = 0,5 %, Kreisfrequenz = 10 rad/s, Platte-Platte-Messapparat, Messspalt = 500 μm

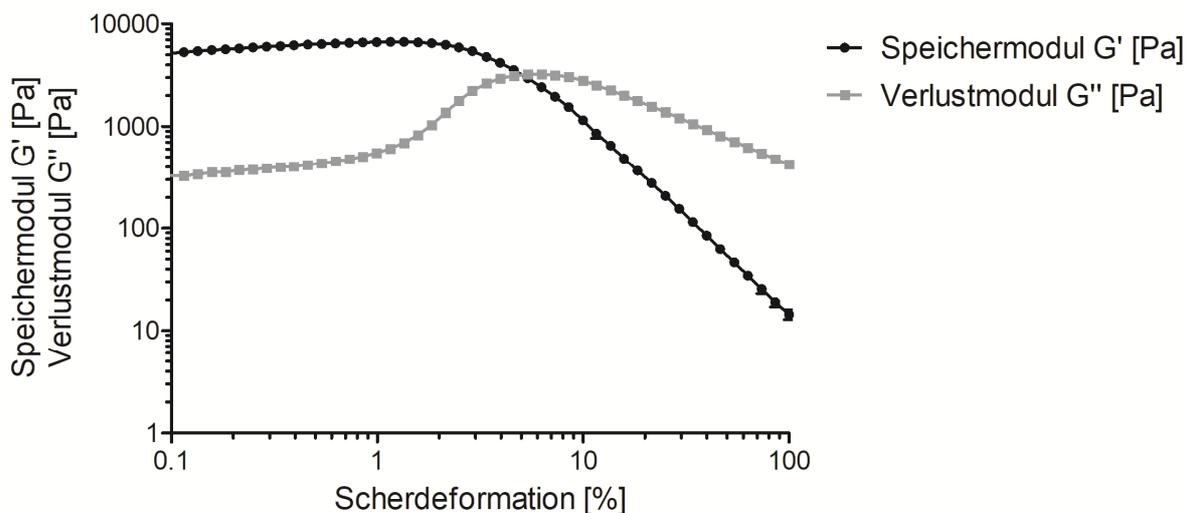


Abbildung 90: Amplitudensweep des Hyaluronsäure-modifizierten Poloxamergels 2 (HyPo 2), 72 Stunden nach Herstellung. Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (Einfachbestimmung), Zusammensetzung = 18,0 Gew.-% P407, 15,0 Gew.-% P188, 1,0 Gew.-% VLMW-HA; Kreisfrequenz = 10 rad/s, Messtemperatur = 32 °C, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt = 500 μm

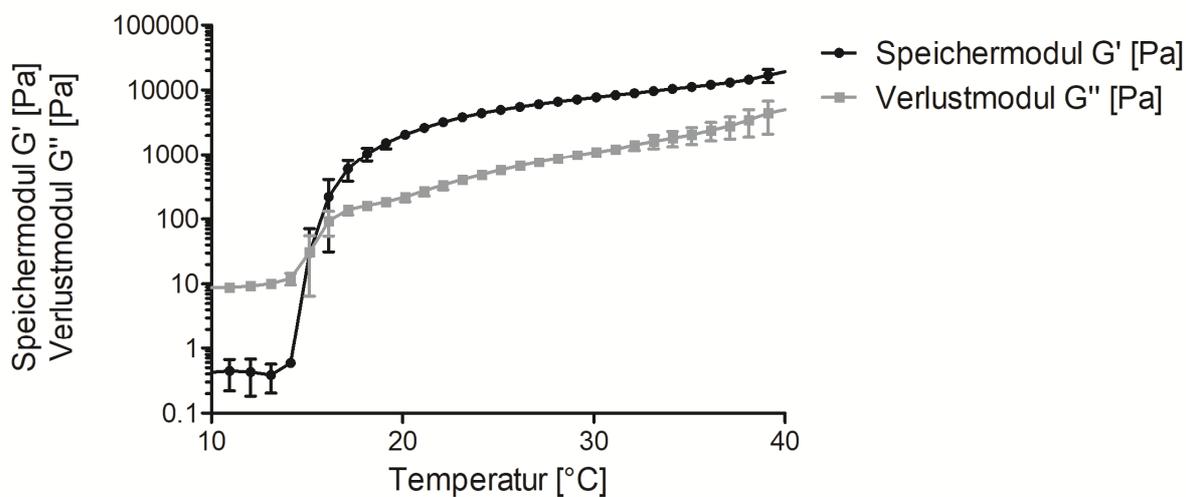


Abbildung 91: Temperatursweep des Hyaluronsäure-modifizierten Poloxamergels 2 (HyPo 2), 120 Stunden nach Herstellung. Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (Einfachbestimmung), Zusammensetzung = 18,0 Gew.-% P407, 15,0 Gew.-% P188, 1,0 Gew.-% VLMW-HA; Scherdeformation = 0,5 %, Kreisfrequenz = 10 rad/s, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt = 500 μm

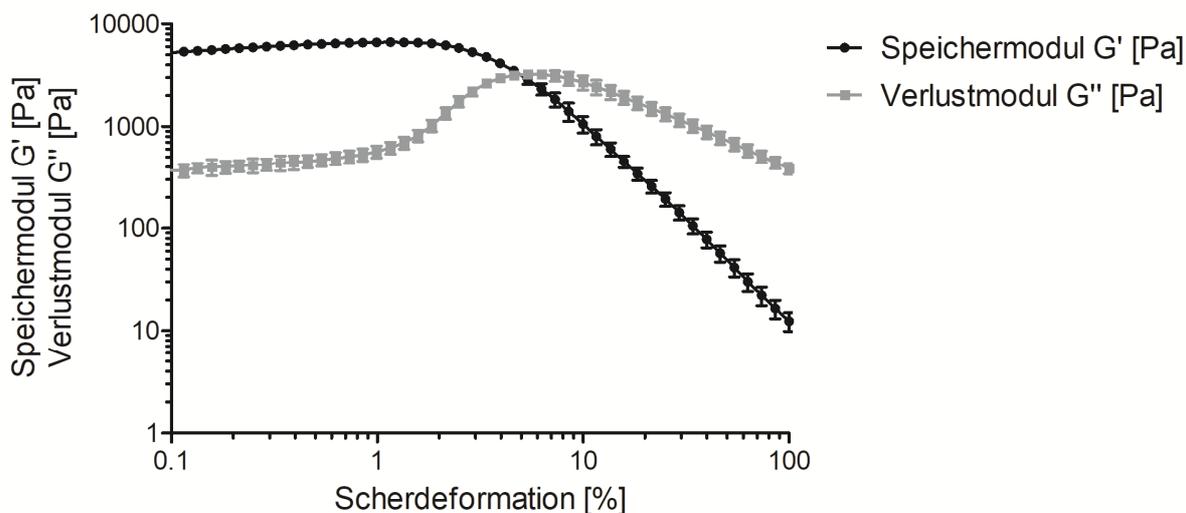


Abbildung 92: Amplitudensweep des Hyaluronsäure-modifizierten Poloxamergels 3 (HyPo 3), 72 Stunden nach Herstellung. Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (Einfachbestimmung), Zusammensetzung = 18,0 Gew.-% P407, 15,0 Gew.-% P188, 0,5 Gew.-% LMW-HA; Kreisfrequenz = 10 rad/s, Messtemperatur = 32 °C, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt = 500 μ m

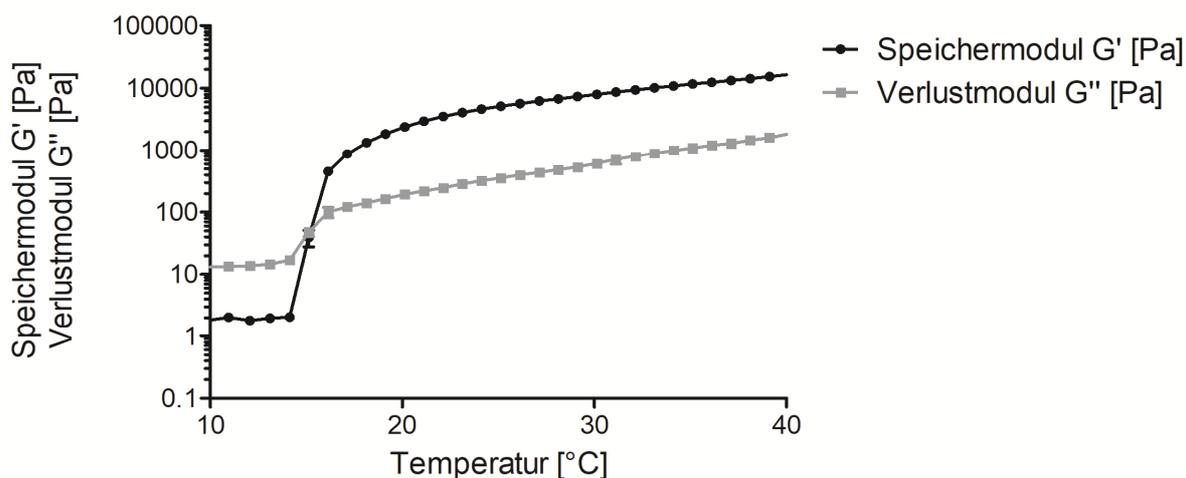


Abbildung 93: Temperatursweep des Hyaluronsäure-modifizierten Poloxamergels 3 (HyPo 3), 120 Stunden nach Herstellung. Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (Einfachbestimmung), Zusammensetzung = 18,0 Gew.-% P407, 15,0 Gew.-% P188, 0,5 Gew.-% LMW-HA; Scherdeformation = 0,5 %, Kreisfrequenz = 10 rad/s, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt = 500 μ m

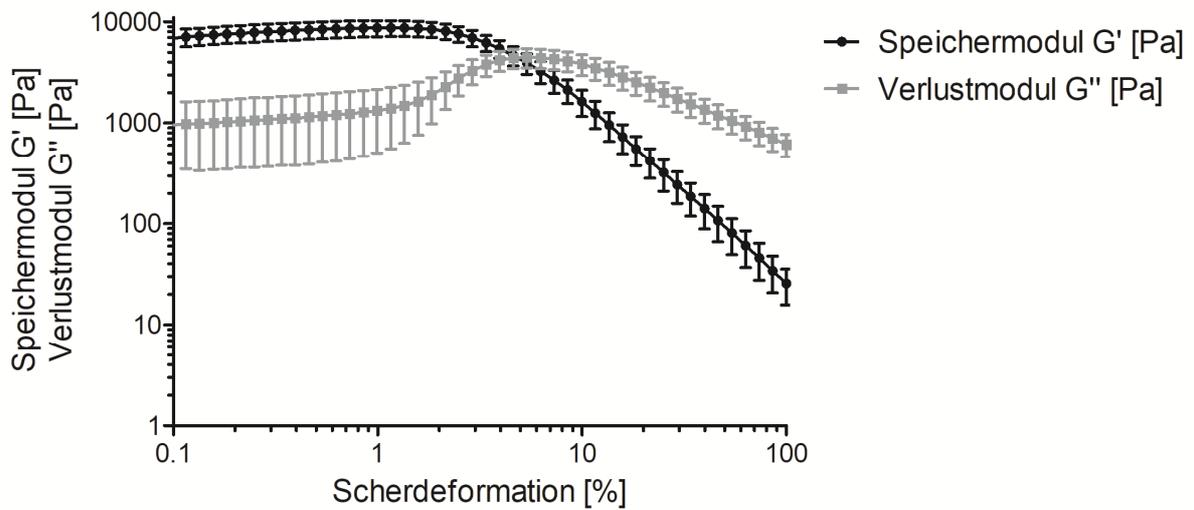


Abbildung 94: Amplitudensweep des Hyaluronsäure-modifizierten Poloxamergels 4 (HyPo 4), 72 Stunden nach Herstellung. Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (Einfachbestimmung), Zusammensetzung = 18,0 Gew.-% P407, 15,0 Gew.-% P188, 1,0 Gew.-% LMW-HA; Kreisfrequenz = 10 rad/s, Messtemperatur = 32 °C, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt = 500 μm

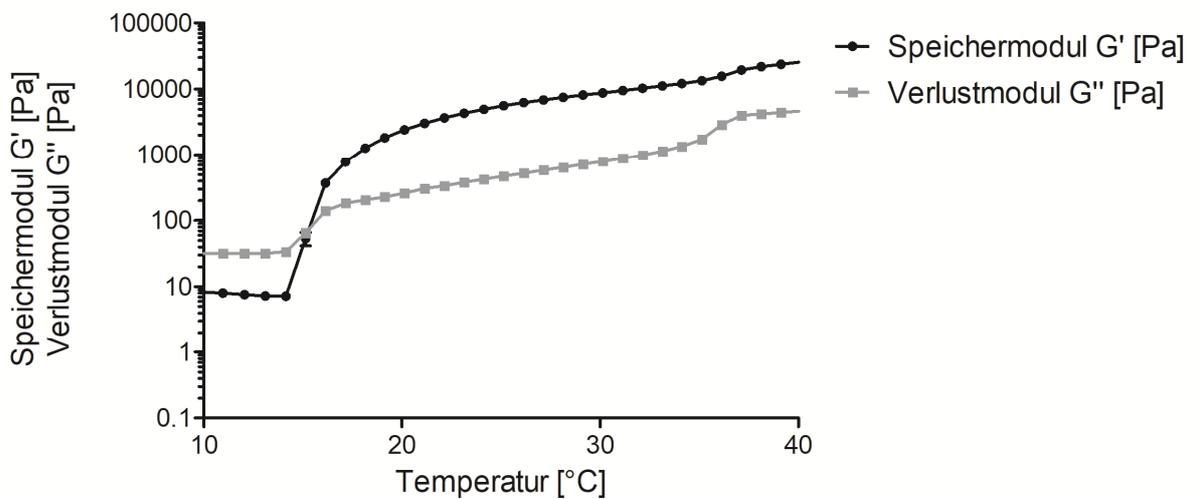


Abbildung 95: Temperaturesweep des Hyaluronsäure-modifizierten Poloxamergels 4 (HyPo 4), 120 Stunden nach Herstellung. Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (Einfachbestimmung), Zusammensetzung = 18,0 Gew.-% P407, 15,0 Gew.-% P188, 1,0 Gew.-% VLMW-HA; Scherdeformation = 0,5 %, Kreisfrequenz = 10 rad/s, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt = 500 μm

IX. Rheogramme: Lagerungsstabilitätsuntersuchung von Hydrogel 1

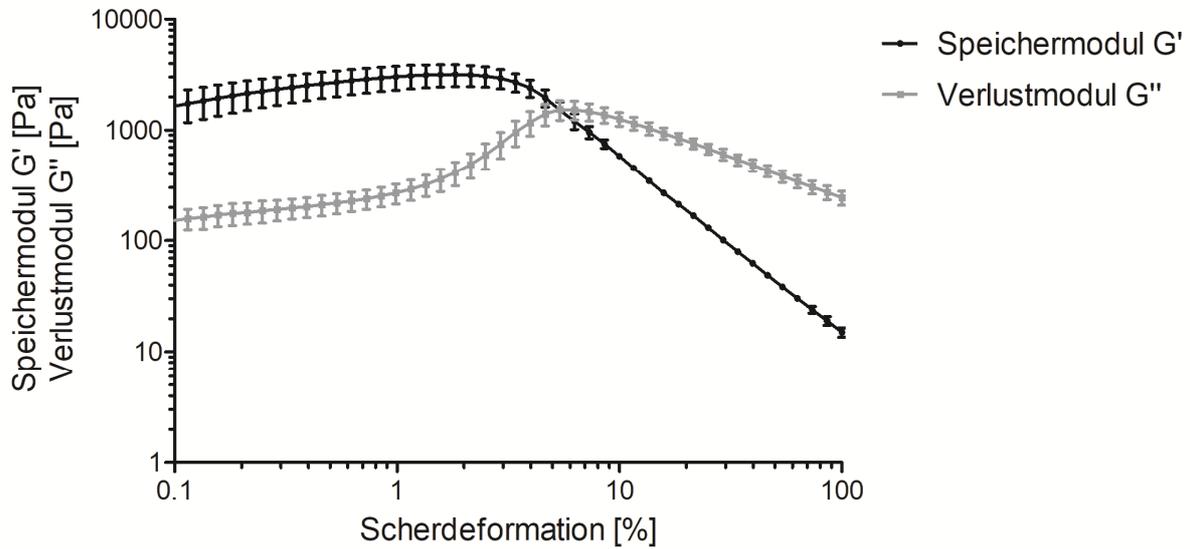


Abbildung 96: Amplitudensweep des Hydrogels 1 an Tag 1 der Lagerungsstabilität, 24 Stunden nach der Herstellung, Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa ($MW \pm SD$; $n = 3$), Hydrogel 1 = 1,0 % VLMW-HA, 18,0 % P407, 15,0 % P188, Kreisfrequenz = 10 rad/s, Messtemperatur = 25 °C, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt 500 μm

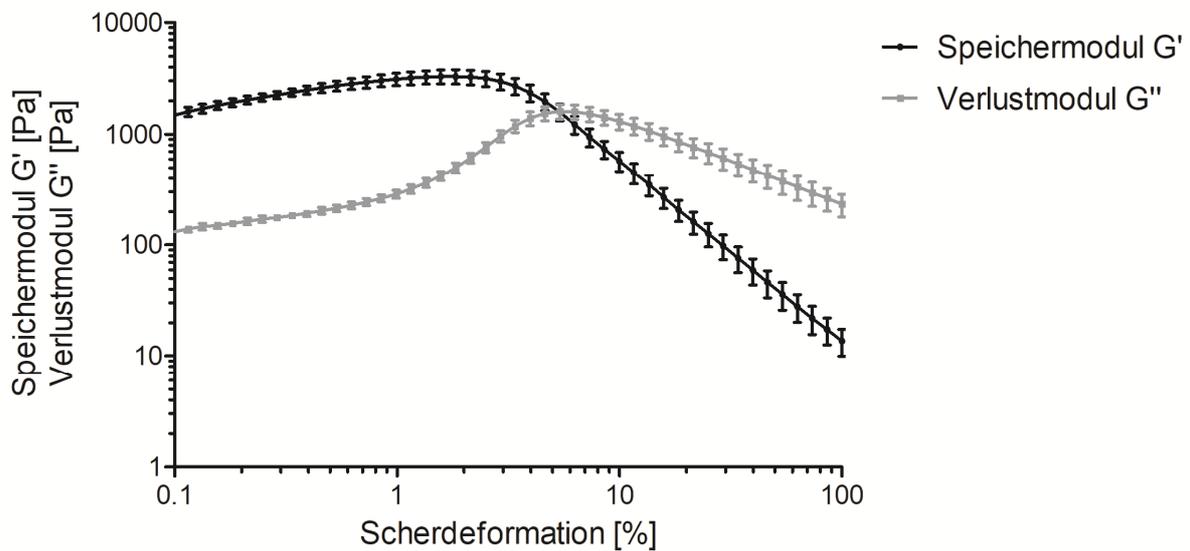


Abbildung 97: Amplitudensweep des Hydrogels 1 nach einmonatiger Lagerung bei 5 °C, Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa ($MW \pm SD$; $n = 3$), Hydrogel 1 = 1,0 % VLMW-HA, 18,0 % P407, 15,0 % P188, Kreisfrequenz = 10 rad/s, Messtemperatur = 25 °C, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt 500 μm

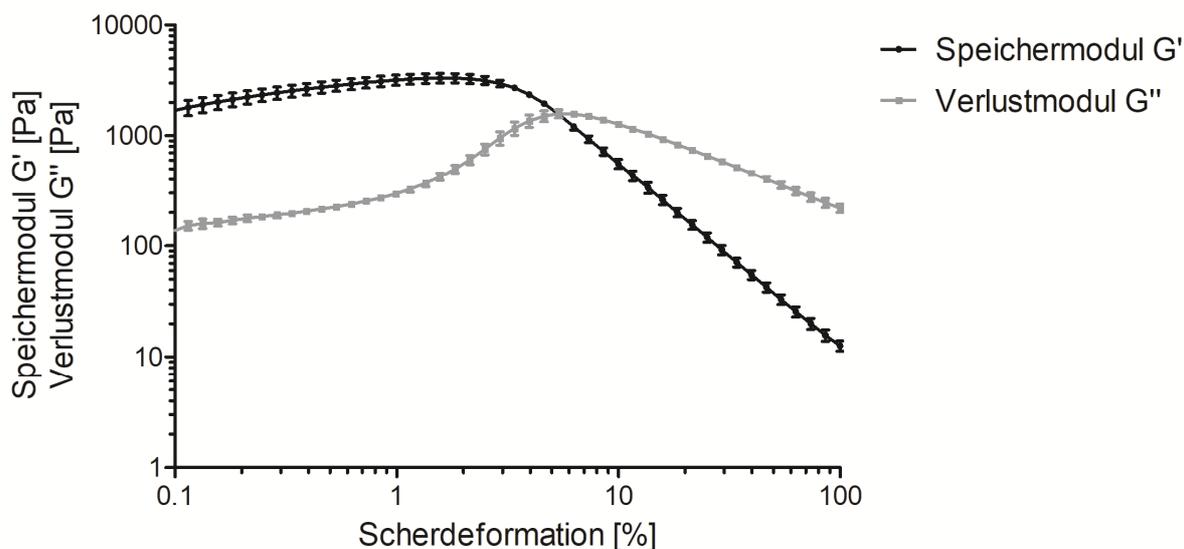


Abbildung 98: Amplitudensweep des Hydrogels 1 nach einmonatiger Lagerung bei 25 °C, 60 %rH, Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa ($MW \pm SD$; $n = 3$), Hydrogel 1 = 1,0 % VLMW-HA, 18,0 % P407, 15,0 % P188, Kreisfrequenz = 10 rad/s, Messtemperatur = 25 °C, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt 500 μm

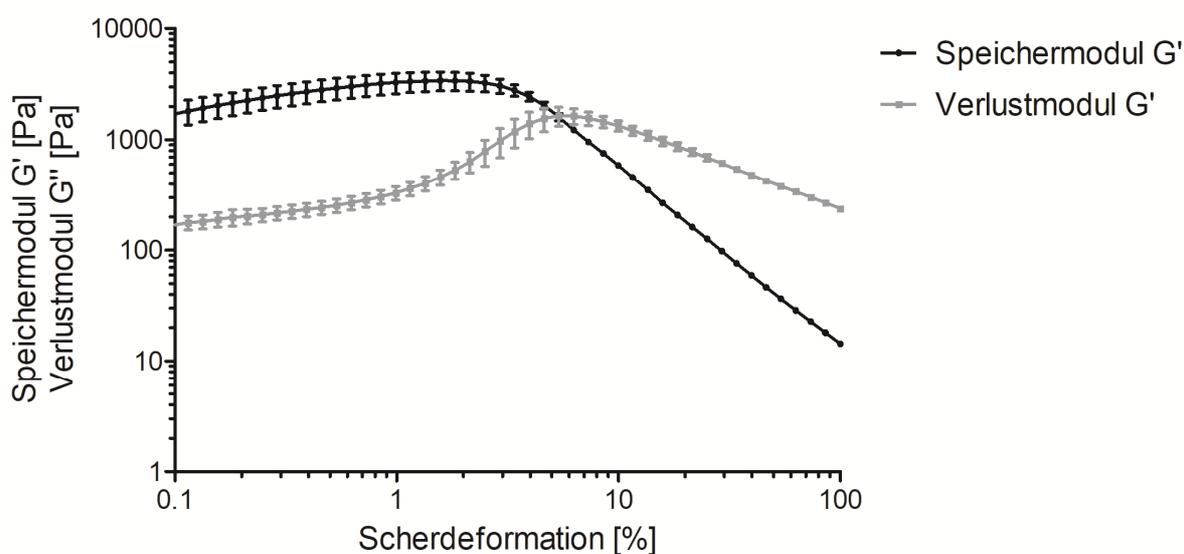


Abbildung 99: Amplitudensweep des Hydrogels 1 nach einmonatiger Lagerung bei 40 °C, 75 %rH, Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa ($MW \pm SD$; $n = 3$), Hydrogel 1 = 1,0 % VLMW-HA, 18,0 % P407, 15,0 % P188, Kreisfrequenz = 10 rad/s, Messtemperatur = 25 °C, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt 500 μm

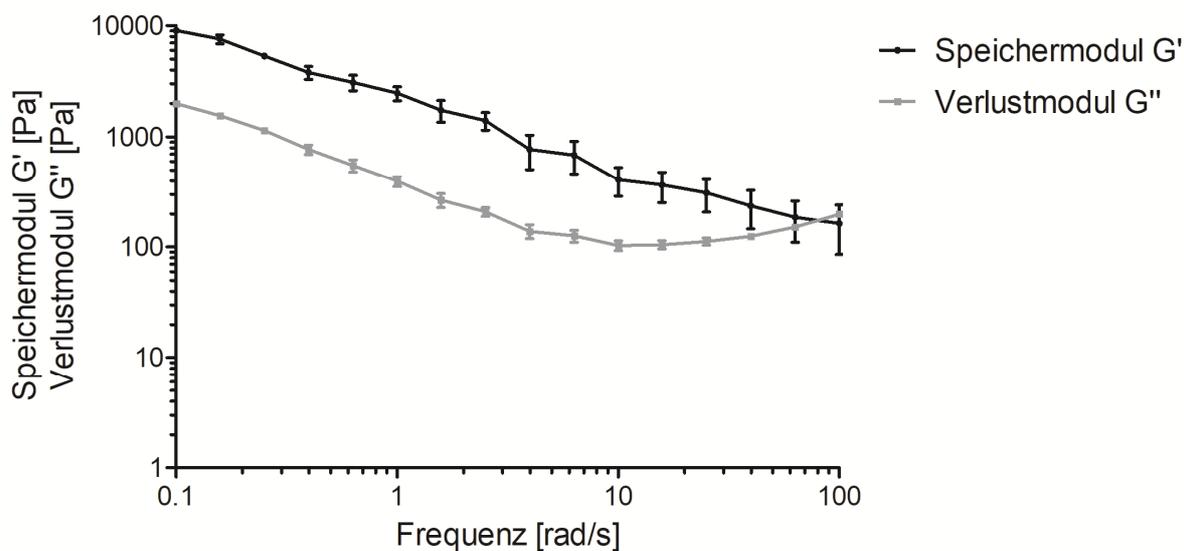


Abbildung 100: Frequenzsweep des Hydrogels 1 an Tag 1 der Lagerungsstabilität, 24 Stunden nach der Herstellung, Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (MW \pm SD; n = 3), Hydrogel 1 = 1,0 % VLMW-HA, 18,0 % P407, 15,0 % P188, Scherdeformation = 0,25 %, Messtemperatur = 25 °C, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt 500 μ m

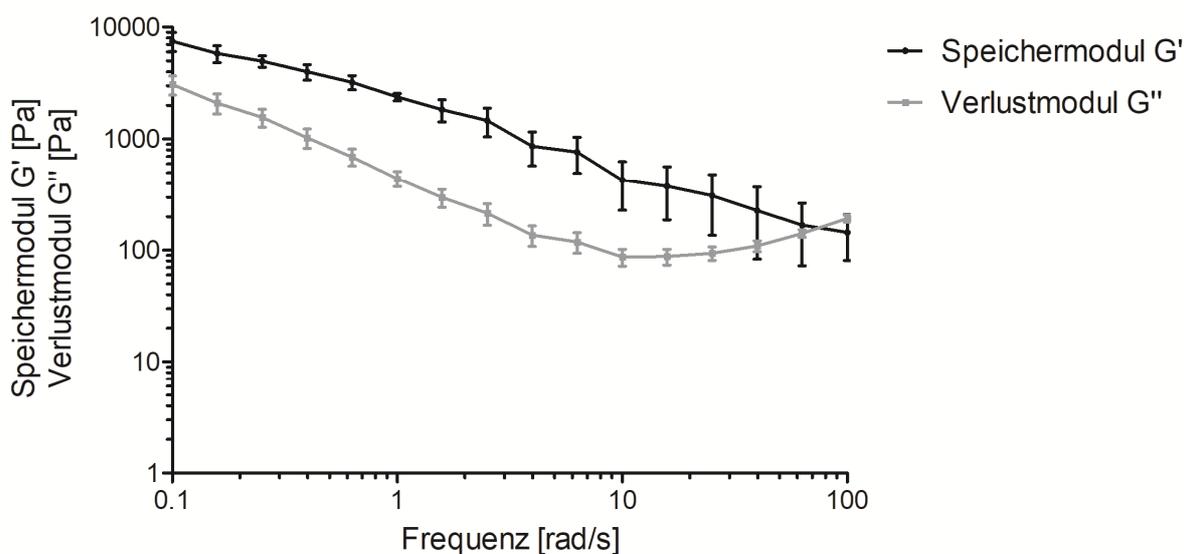


Abbildung 101: Frequenzsweep des Hydrogels 1 nach einmonatiger Lagerung bei 5 °C, Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (MW \pm SD; n = 3), Hydrogel 1 = 1,0 % VLMW-HA, 18,0 % P407, 15,0 % P188, Scherdeformation = 0,25 %, Messtemperatur = 25 °C, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt 500 μ m

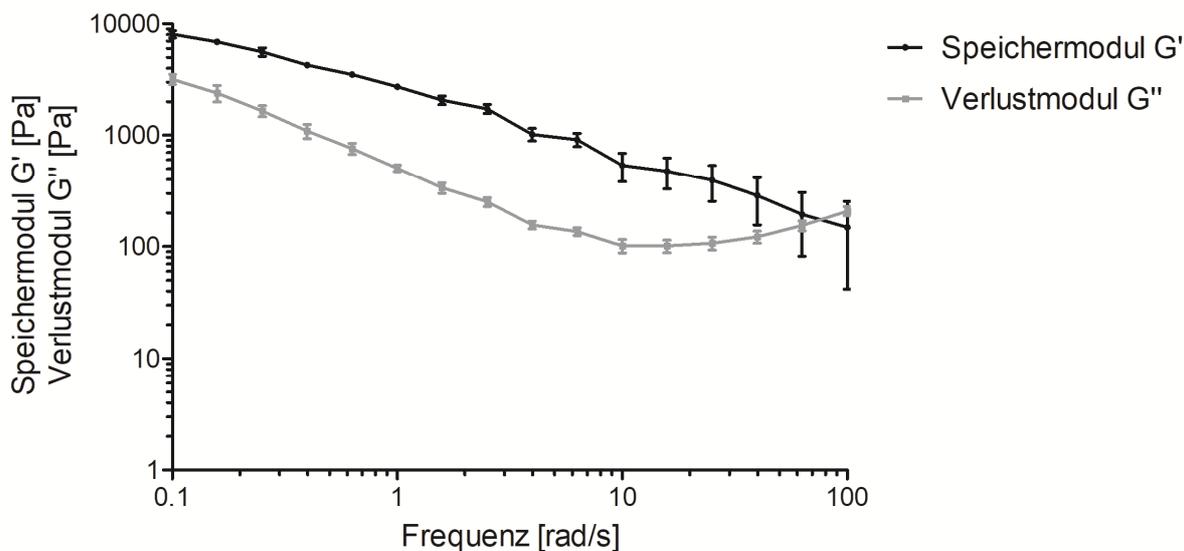


Abbildung 102: Frequenzsweep des Hydrogels 1 nach einmonatiger Lagerung bei 25 °C, 60 %rH, Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (MW ± SD; n = 3), Hydrogel 1 = 1,0 % VLMW-HA, 18,0 % P407, 15,0 % P188, Scherdeformation = 0,25 %, Messtemperatur = 25 °C, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt 500 µm

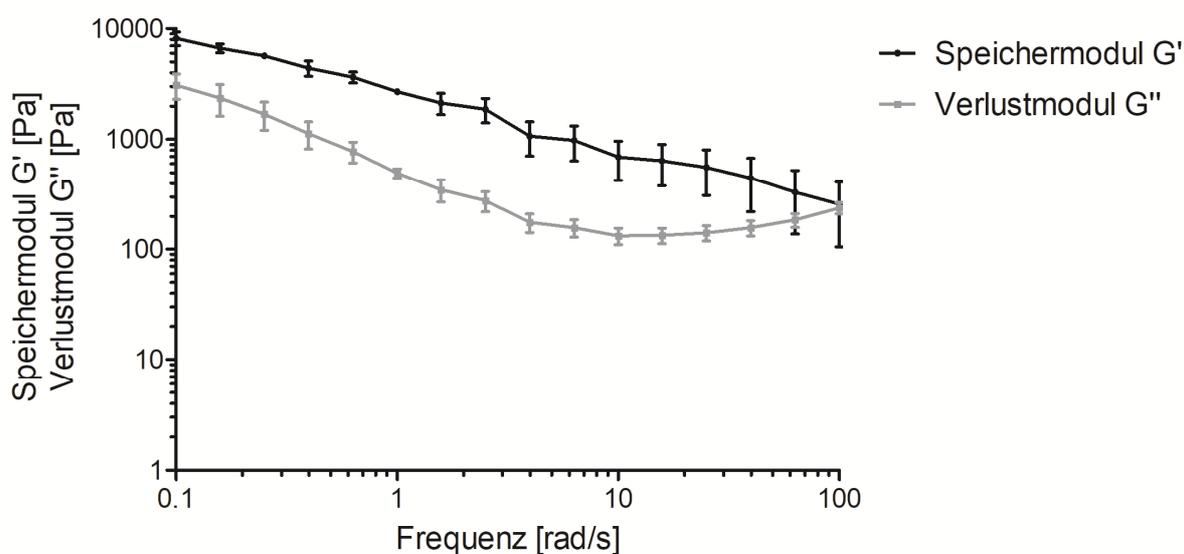


Abbildung 103: Frequenzsweep des Hydrogels 1 nach einmonatiger Lagerung bei 40 °C, 75 %rH, Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (MW ± SD; n = 3), Hydrogel 1 = 1,0 % VLMW-HA, 18,0 % P407, 15,0 % P188, Scherdeformation = 0,25 %, Messtemperatur = 25 °C, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt 500 µm

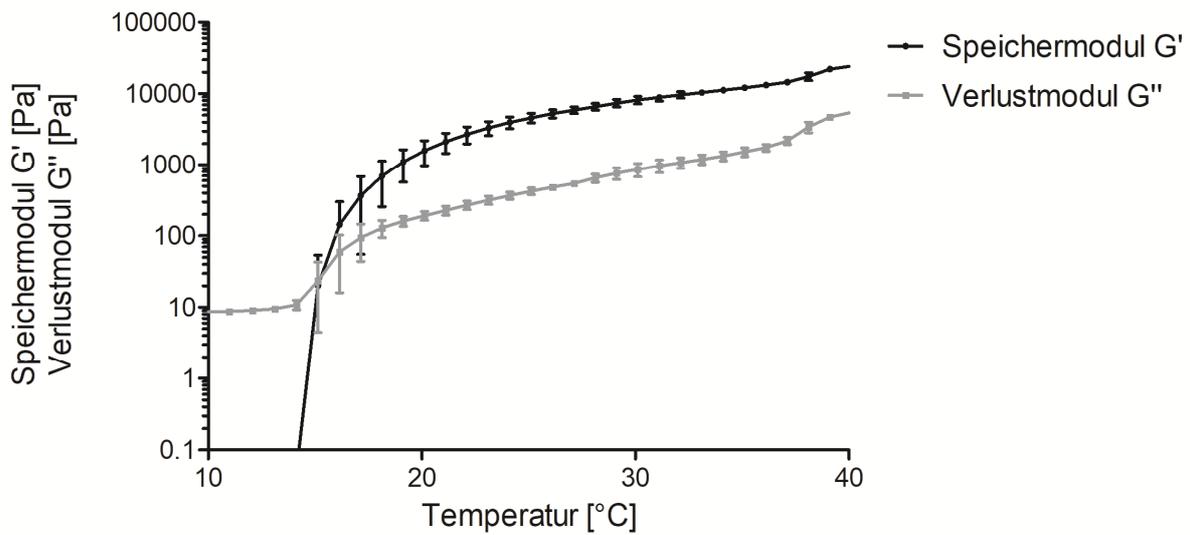


Abbildung 104: Temperatursweep des Hydrogels 1 an Tag 1 der Lagerungsstabilität, 24 Stunden nach der Herstellung, Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa ($MW \pm SD$; $n = 3$), Hydrogel 1 = 1,0 % VLMW-HA, 18,0 % P407, 15,0 % P188, Scherdeformation = 0,25 %, Kreisfrequenz = 10 rad/s, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt 500 μm

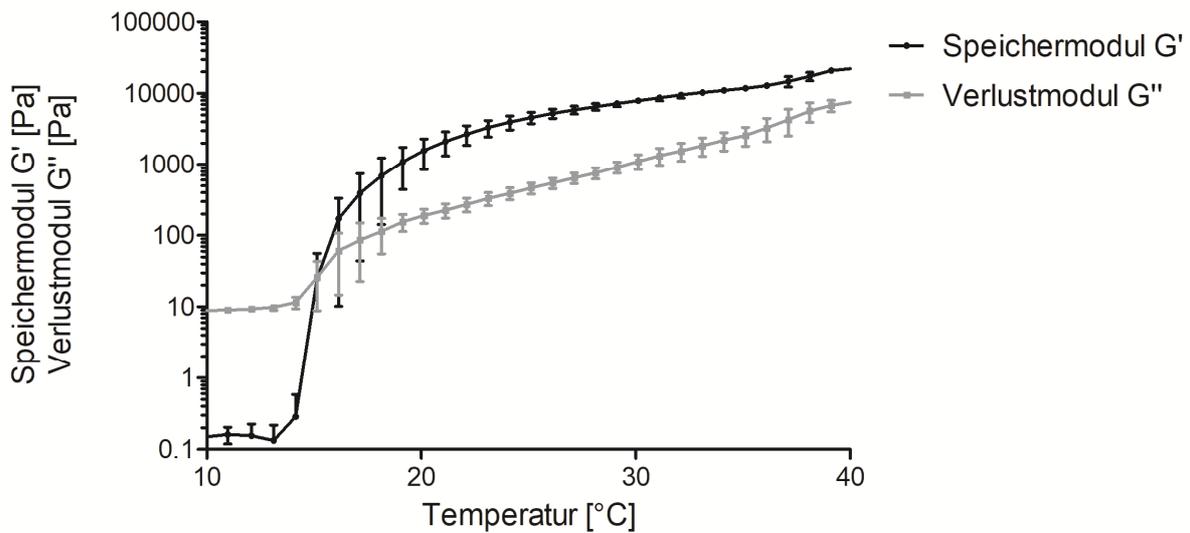


Abbildung 105: Temperatursweep des Hydrogels 1 nach einmonatiger Lagerung bei 5 °C, Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa ($MW \pm SD$; $n = 3$), Hydrogel 1 = 1,0 % VLMW-HA, 18,0 % P407, 15,0 % P188, Scherdeformation = 0,25 %, Kreisfrequenz = 10 rad/s, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt 500 μm

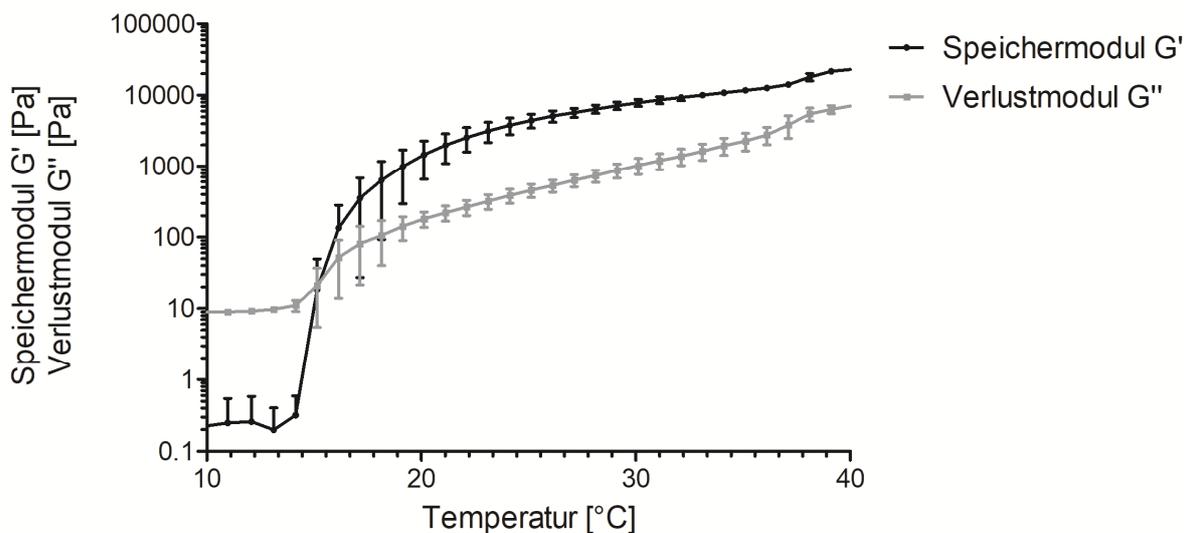


Abbildung 106: Temperatursweep des Hydrogels 1 nach einmonatiger Lagerung bei 25 °C, 60 %rH, Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (MW \pm SD; n = 3), Hydrogel 1 = 1,0 % VLMW-HA, 18,0 % P407, 15,0 % P188, Scherdeformation = 0,25 %, Kreisfrequenz = 10 rad/s, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt 500 μ m

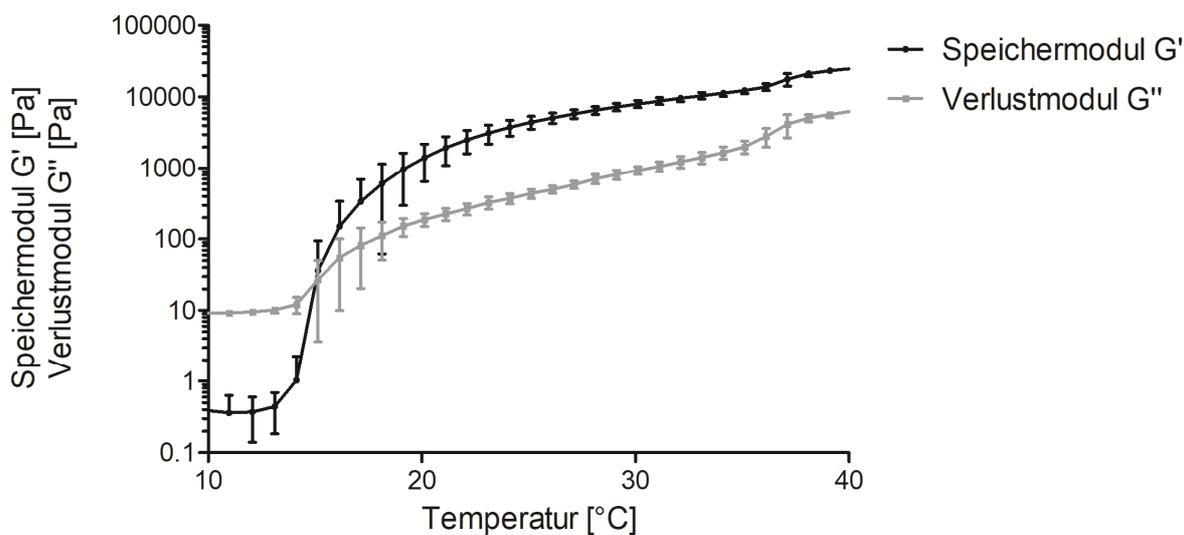


Abbildung 107: Temperatursweep des Hydrogels 1 nach einmonatiger Lagerung bei 40 °C, 75 %rH, Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (MW \pm SD; n = 3), Hydrogel 1 = 1,0 % VLMW-HA, 18,0 % P407, 15,0 % P188, Scherdeformation = 0,25 %, Kreisfrequenz = 10 rad/s, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt 500 μ m

X. Rheogramme: Lagerungsstabilitätsuntersuchung von Hydrogel 2

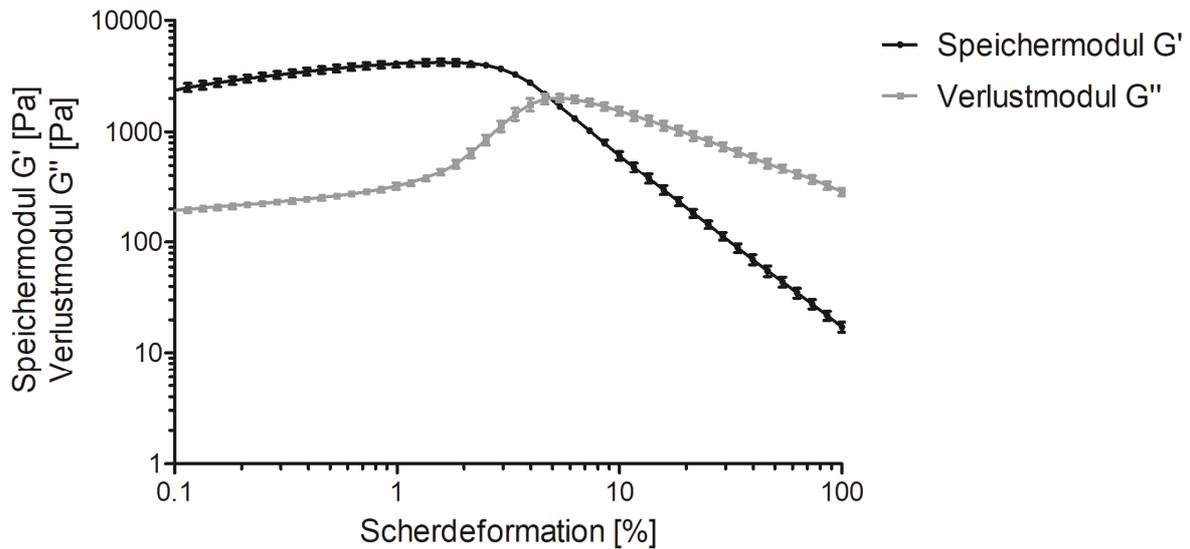


Abbildung 108: Amplitudensweep des Hydrogels 2 an Tag 1 der Lagerungsstabilität, 24 Stunden nach der Herstellung, Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (MW \pm SD; n = 3), Hydrogel 2 = 18,0 % P407, 15,0 % P188, 1,0 % LMW-HA, Kreisfrequenz = 10 rad/s, Messtemperatur = 25 °C, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt 500 μ m

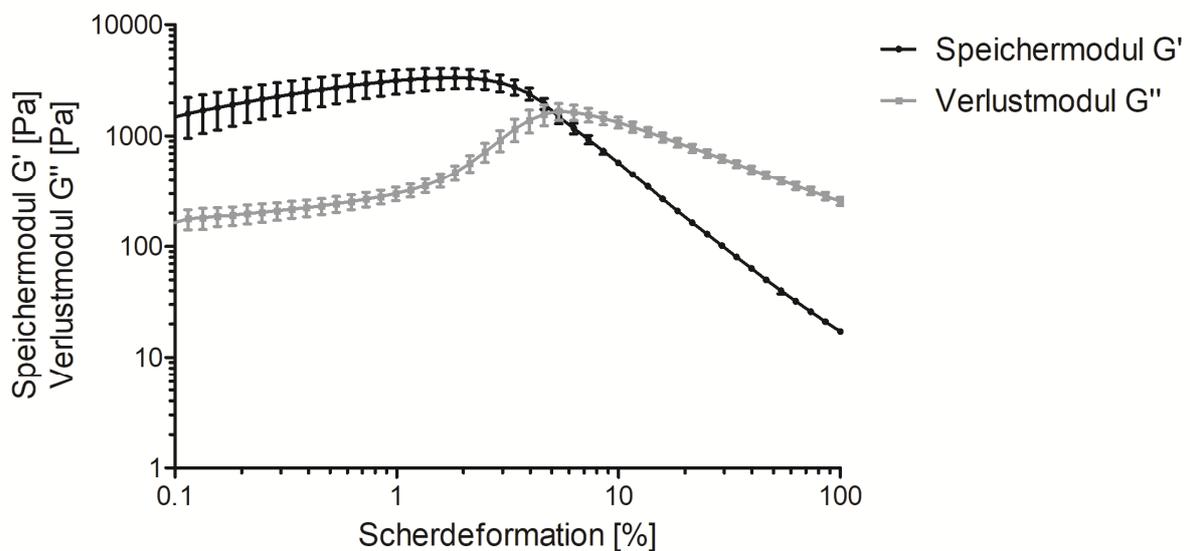


Abbildung 109: Amplitudensweep des Hydrogels 2 nach einmonatiger Lagerung bei 5 °C, Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (MW \pm SD; n = 3), Hydrogel 2 = 18,0 % P407, 15,0 % P188, 1,0 % LMW-HA, Kreisfrequenz = 10 rad/s, Messtemperatur = 25 °C, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt 500 μ m

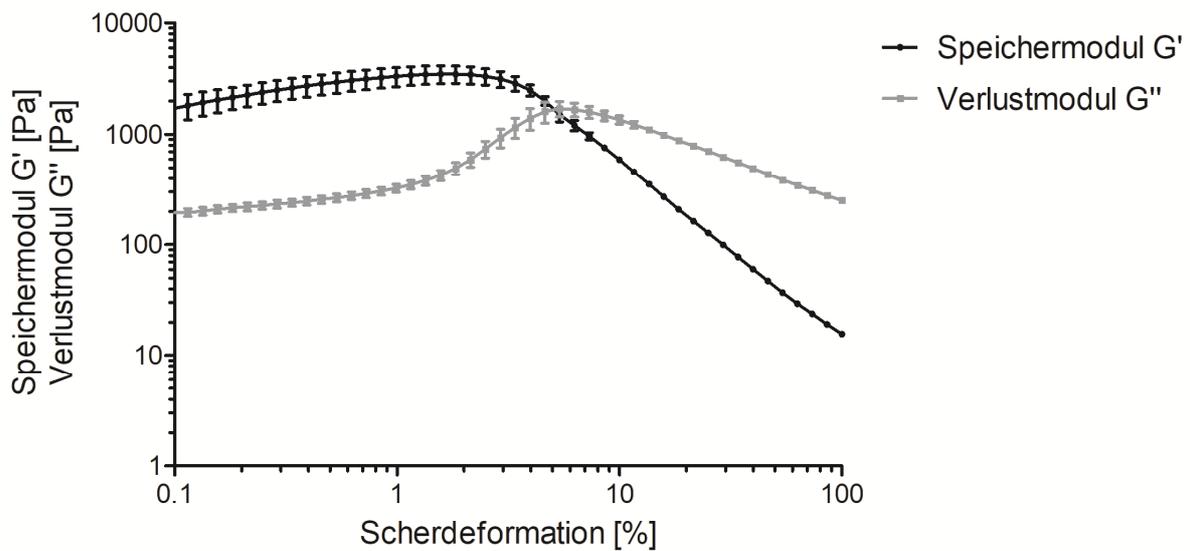


Abbildung 110: Amplitudensweep des Hydrogels 2 nach einmonatiger Lagerung bei 25 °C, 60 %rH, Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa ($MW \pm SD$; $n = 3$), Hydrogel 2 = 18,0 % P407, 15,0 % P188, 1,0 % LMW-HA, Kreisfrequenz = 10 rad/s, Messtemperatur = 25 °C, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt 500 μm

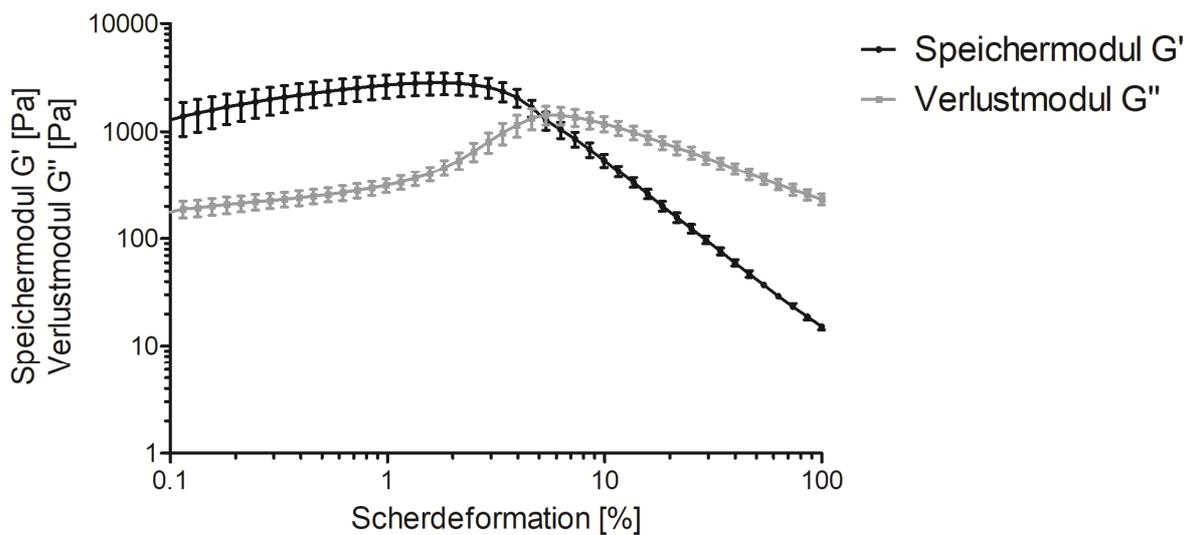


Abbildung 111: Amplitudensweep des Hydrogels 2 nach einmonatiger Lagerung bei 40 °C, 75 %rH, Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa ($MW \pm SD$; $n = 3$), Hydrogel 2 = 18,0 % P407, 15,0 % P188, 1,0 % LMW-HA, Kreisfrequenz = 10 rad/s, Messtemperatur = 25 °C, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt 500 μm

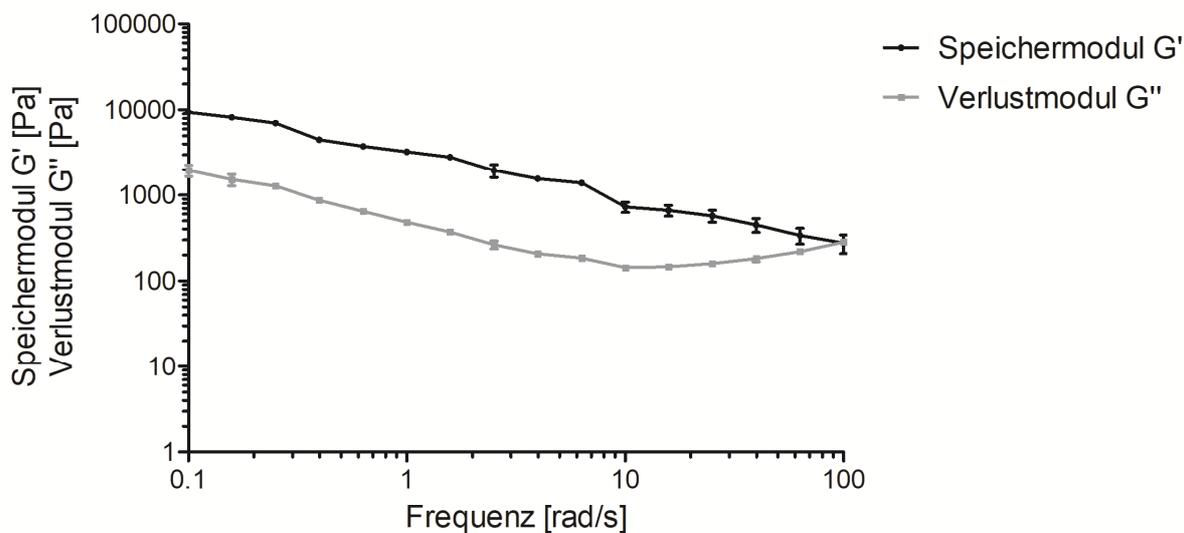


Abbildung 112: Frequenzsweep des Hydrogels 2 an Tag 1 der Lagerungsstabilität, 24 Stunden nach der Herstellung, Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa ($MW \pm SD$; $n = 3$), Hydrogel 2 = 18,0 % P407, 15,0 % P188, 1,0 % LMW-HA, Scherdeformation = 0,25 %, Messtemperatur = 25 °C, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt 500 μm

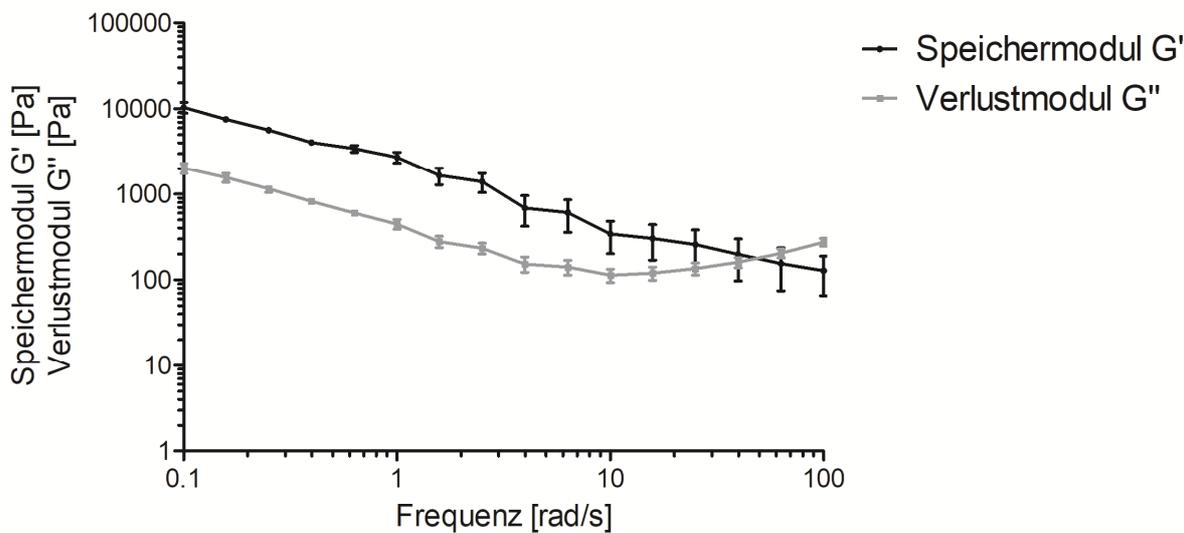


Abbildung 113: Frequenzsweep des Hydrogels 2 nach einmonatiger Lagerung bei 5 °C, Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa ($MW \pm SD$; $n = 3$), Hydrogel 2 = 18,0 % P407, 15,0 % P188, 1,0 % LMW-HA, Scherdeformation = 0,25 %, Messtemperatur = 25 °C, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt 500 μm

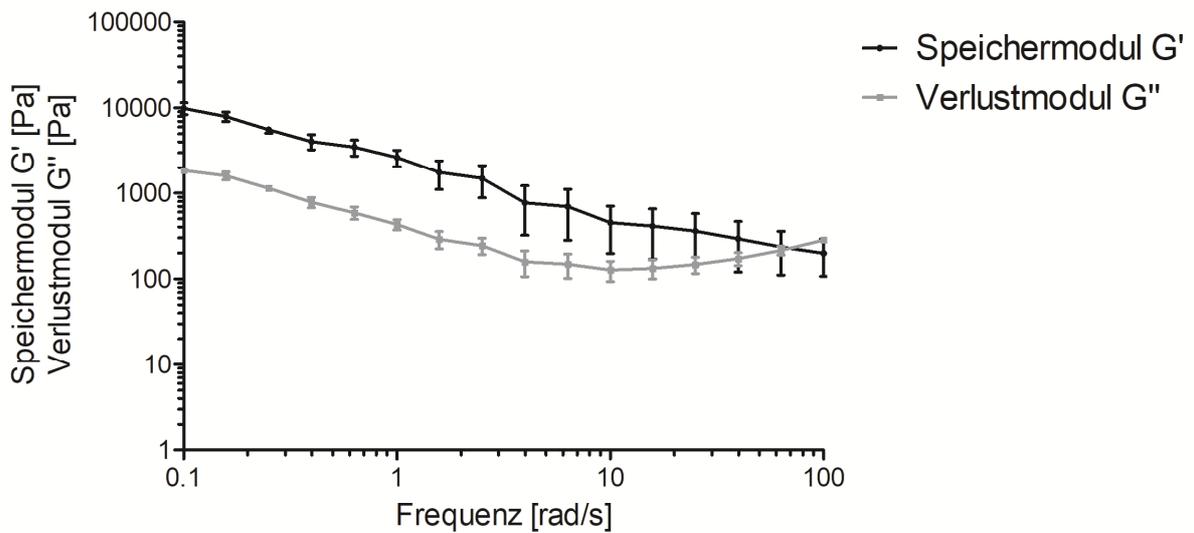


Abbildung 114: Frequenzsweep des Hydrogels 2 nach einmonatiger Lagerung bei 25 °C, 60 %rH, Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (MW ± SD; n = 3), Hydrogel 2 = 18,0 % P407, 15,0 % P188, 1,0 % LMW-HA, Scherdeformation = 0,25 %, Messtemperatur = 25 °C, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt 500 µm

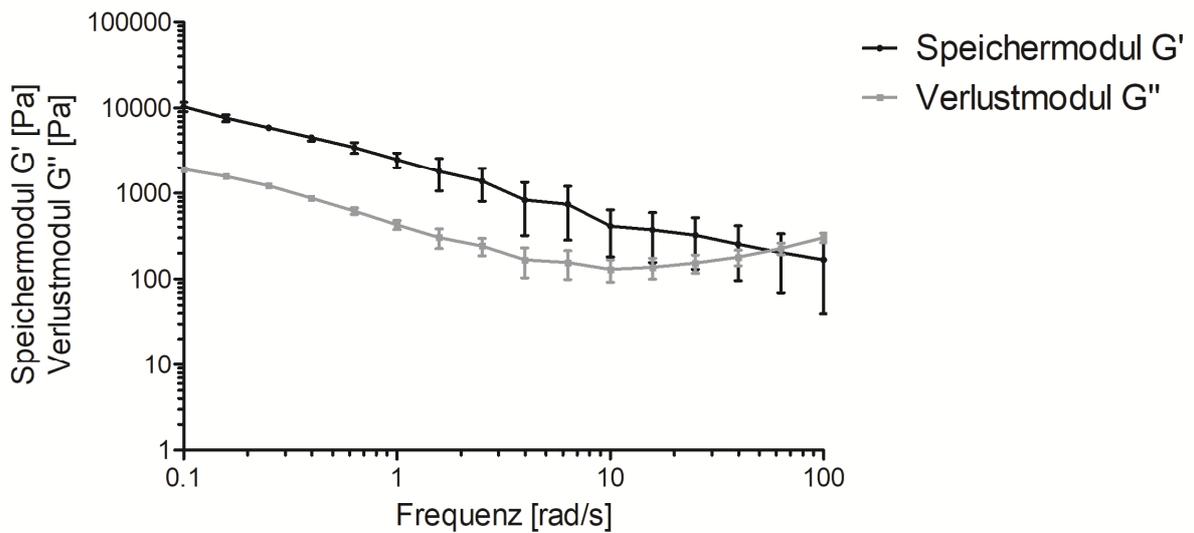


Abbildung 115: Frequenzsweep des Hydrogels 2 nach einmonatiger Lagerung bei 40 °C, 75 %rH, Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (MW ± SD; n = 3), Hydrogel 2 = 18,0 % P407, 15,0 % P188, 1,0 % LMW-HA, Scherdeformation = 0,25 %, Messtemperatur = 25 °C, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt 500 µm

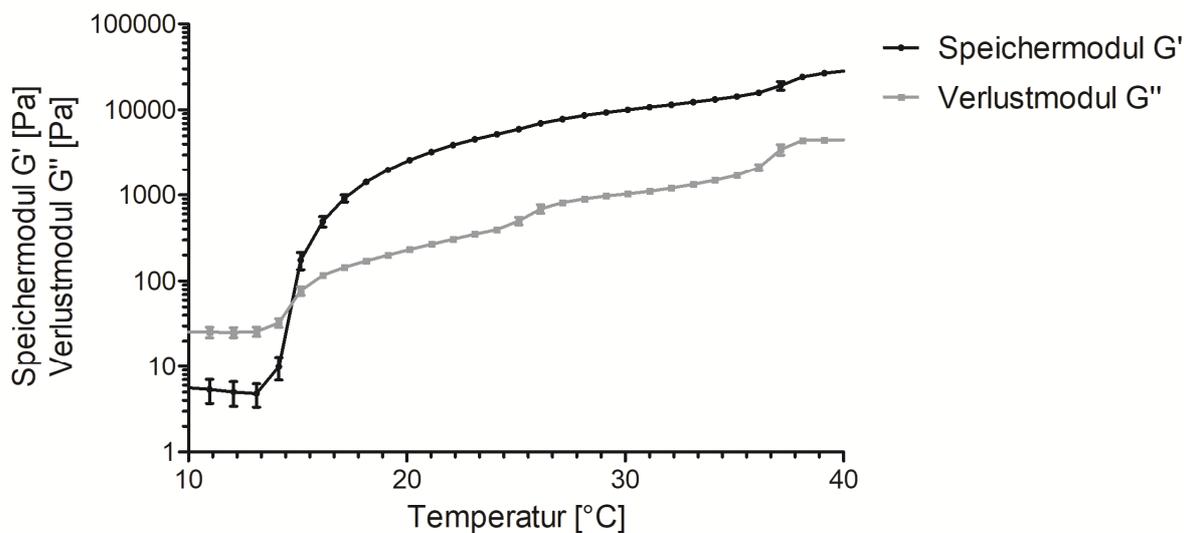


Abbildung 116: Temperatursweep des Hydrogels 2 an Tag 1 der Lagerungsstabilität, 24 Stunden nach der Herstellung, Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa ($MW \pm SD$; $n = 3$), Hydrogel 2 = 18,0 % P407, 15,0 % P188, 1,0 % LMW-HA, Scherdeformation = 0,25 %, Kreisfrequenz = 10 rad/s, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt 500 μm

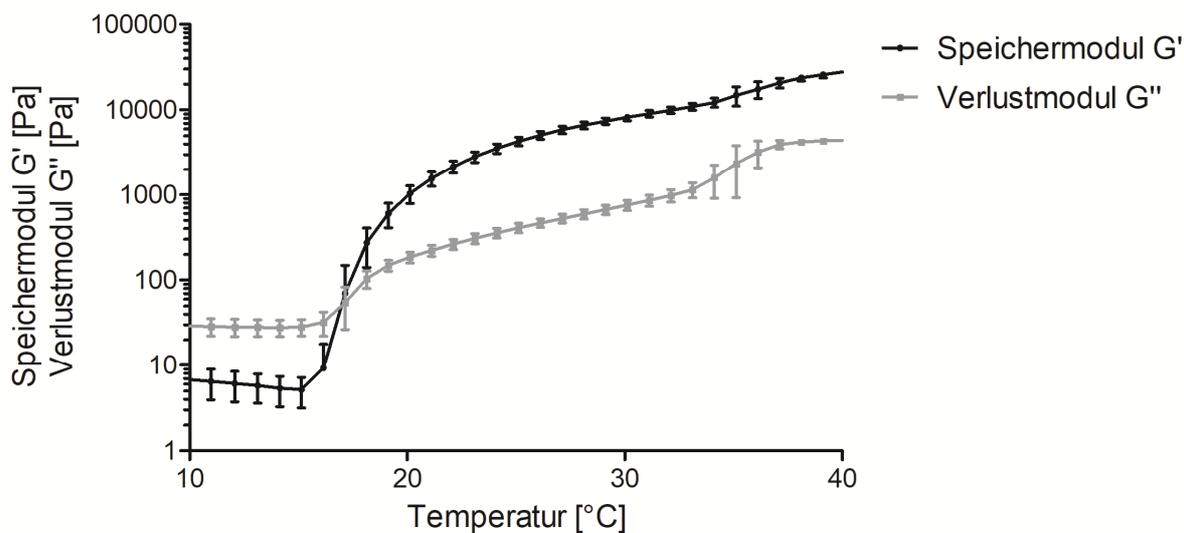


Abbildung 117: Temperatursweep des Hydrogels 2 nach einmonatiger Lagerung bei 5 °C, Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa ($MW \pm SD$; $n = 3$), Hydrogel 2 = 18,0 % P407, 15,0 % P188, 1,0 % LMW-HA, Scherdeformation = 0,25 %, Kreisfrequenz = 10 rad/s, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt 500 μm

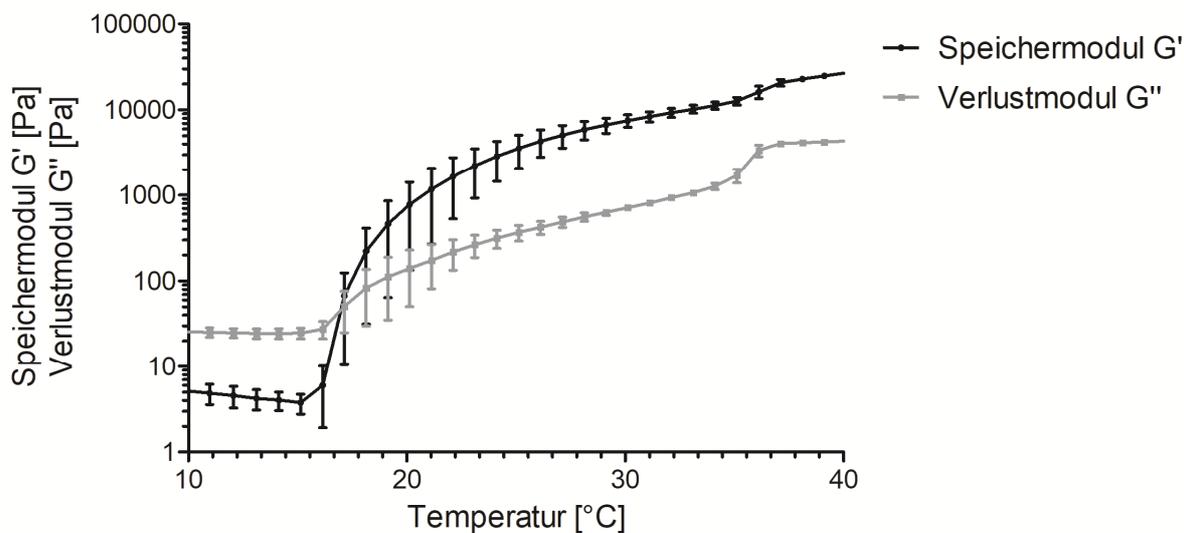


Abbildung 118: Temperatursweep des Hydrogels 2 nach einmonatiger Lagerung bei 25 °C, 60 %rH, Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa ($MW \pm SD$; $n = 3$), Hydrogel 2 = 18,0 % P407, 15,0 % P188, 1,0 % LMW-HA, Scherdeformation = 0,25 %, Kreisfrequenz = 10 rad/s, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt 500 μm

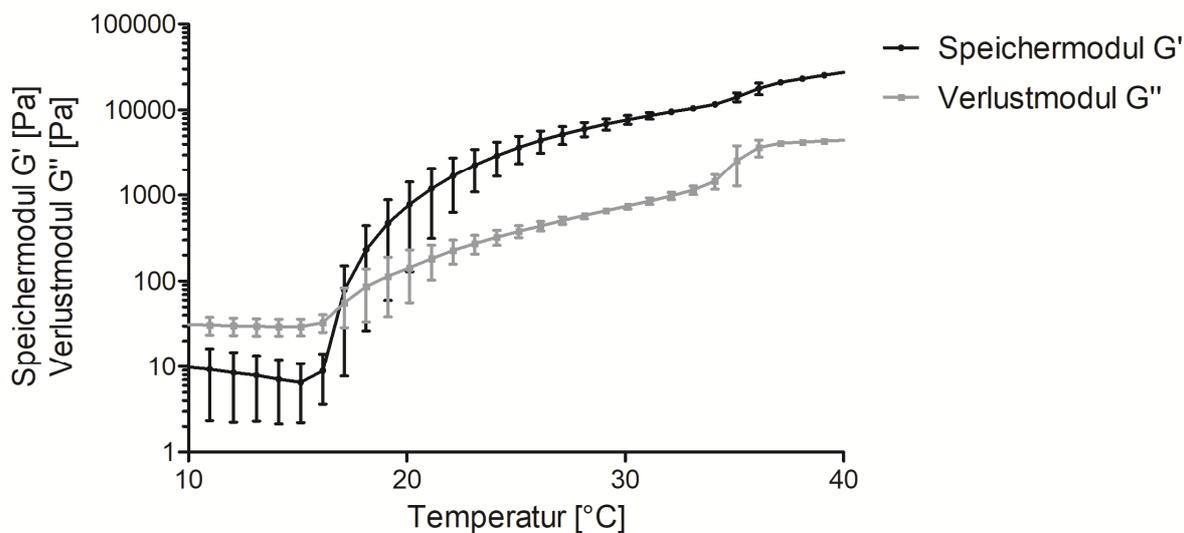


Abbildung 119: Temperatursweep des Hydrogels 2 nach einmonatiger Lagerung bei 40 °C, 75 %rH, Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa ($MW \pm SD$; $n = 3$), Hydrogel 2 = 18,0 % P407, 15,0 % P188, 1,0 % LMW-HA, Scherdeformation = 0,25 %, Kreisfrequenz = 10 rad/s, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt 500 μm

XI. Rheogramme: Lagerungsstabilitätsuntersuchung von Hydrogel 3

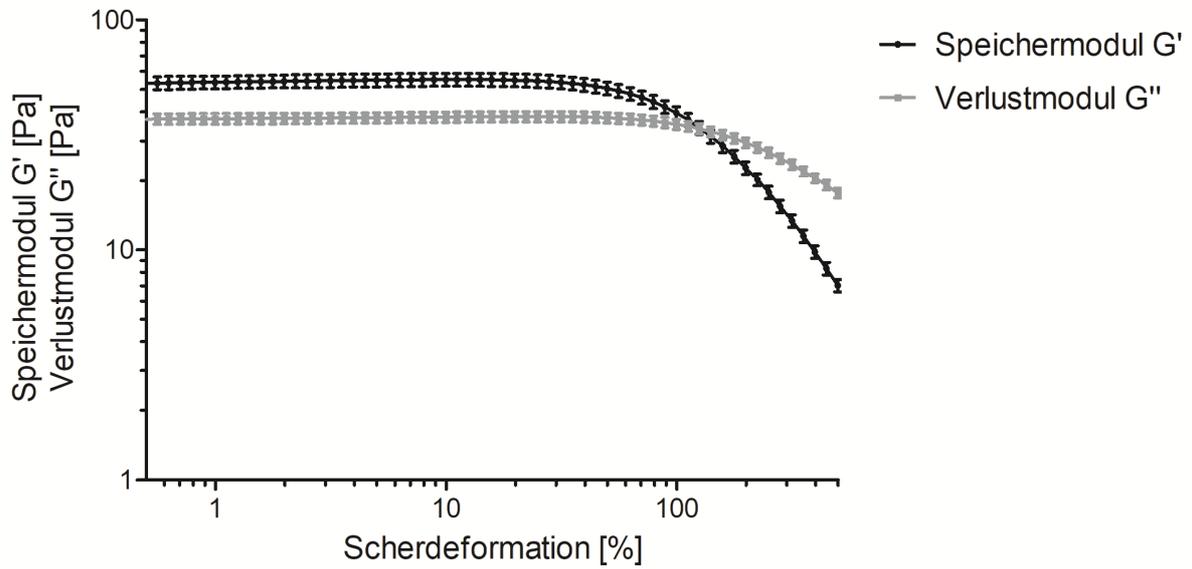


Abbildung 120: Amplitudensweep des Hydrogels 3 an Tag 1 der Lagerungsstabilität, 24 Stunden nach der Herstellung, Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa ($MW \pm SD$; $n = 3$), Hydrogel 3 = 1,0 % VLMW-HA, 1,0 % HMW-HA, Kreisfrequenz = 10 rad/s, Messtemperatur = 25 °C, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt 500 μm

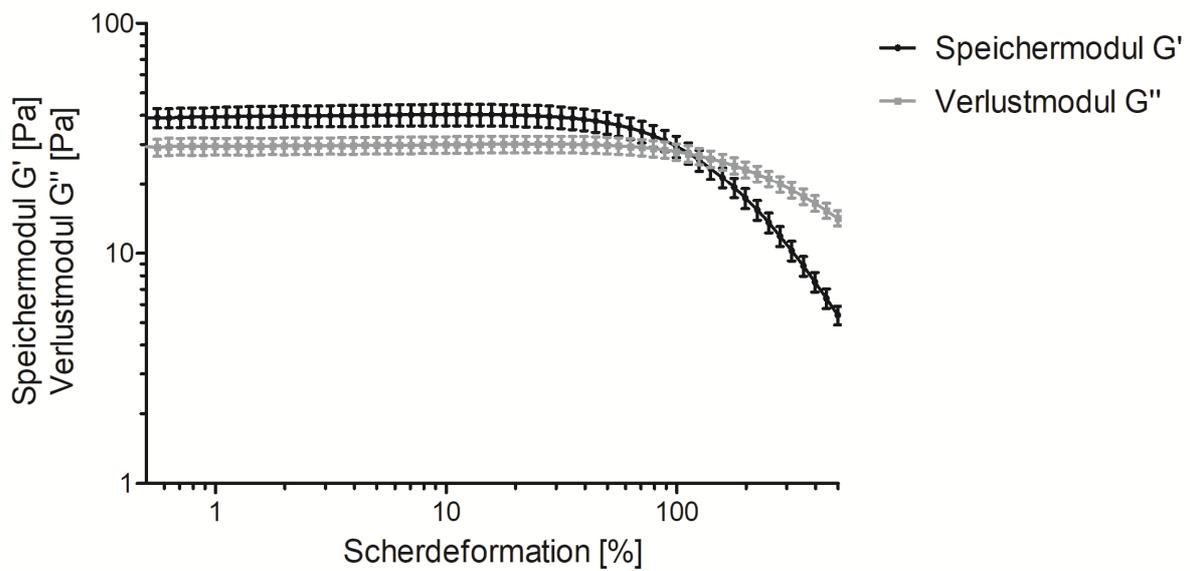


Abbildung 121: Amplitudensweep des Hydrogels 3 nach einmonatiger Lagerung bei 5 °C, Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (MW ± SD; n = 3), Hydrogel 3 = 1,0 % VLMW-HA, 1,0 % HMW-HA, Kreisfrequenz = 10 rad/s, Messtemperatur = 25 °C, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt 500 µm

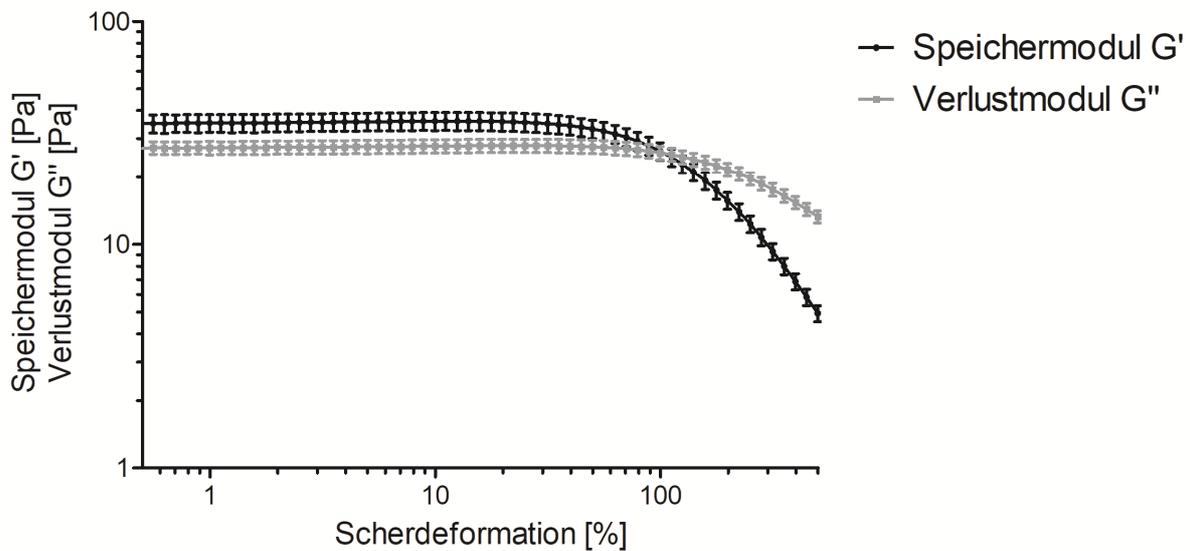


Abbildung 122: Amplitudensweep des Hydrogels 3 nach einmonatiger Lagerung bei 25 °C, 60 %rH, Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (MW ± SD; n = 3), Hydrogel 3 = 1,0 % VLMW-HA, 1,0 % HMW-HA, Kreisfrequenz = 10 rad/s, Messtemperatur = 25 °C, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt 500 µm

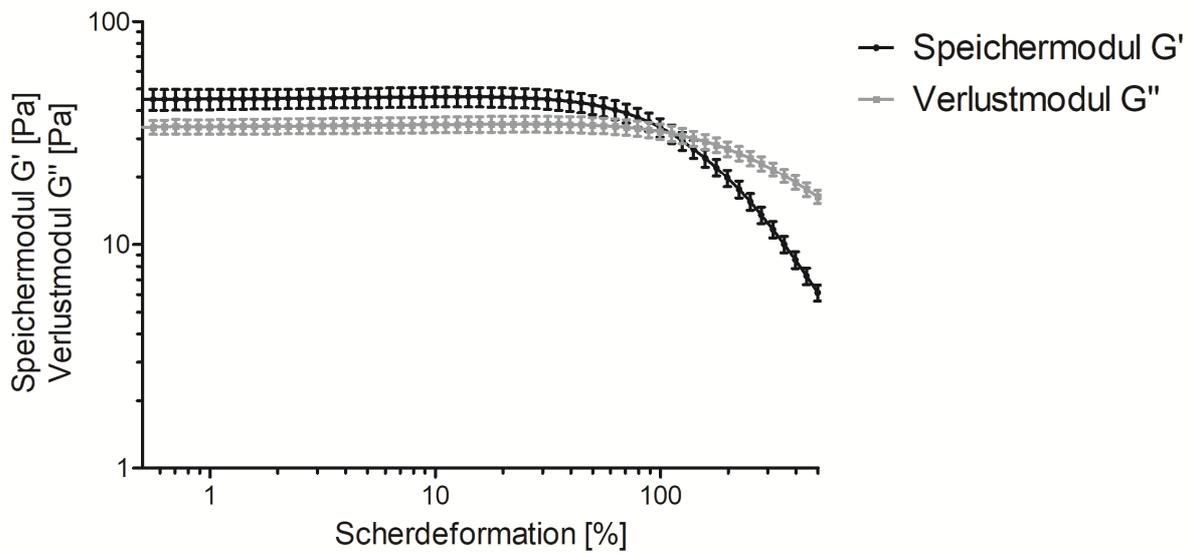


Abbildung 123: Amplitudensweep des Hydrogels 3 nach einmonatiger Lagerung bei 40 °C, 75 %rH, Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (MW \pm SD; n = 3), Hydrogel 3 = 1,0 % VLMW-HA, 1,0 % HMW-HA, Kreisfrequenz = 10 rad/s, Messtemperatur = 25 °C, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt 500 μ m

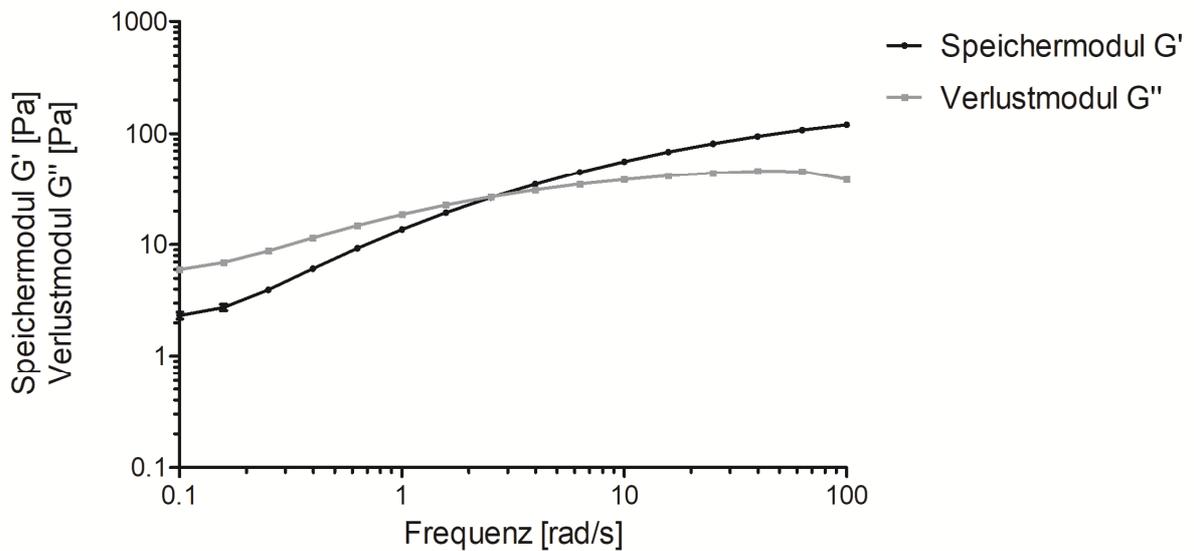


Abbildung 124: Frequenzsweep des Hydrogels 3 an Tag 1 der Lagerungsstabilität, 24 Stunden nach der Herstellung, Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (MW \pm SD; n = 3), Hydrogel 3 = 1,0 % VLMW-HA, 1,0 % HMW-HA, Scherdeformation = 5,0 %, Messtemperatur = 25 °C, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt 500 μ m

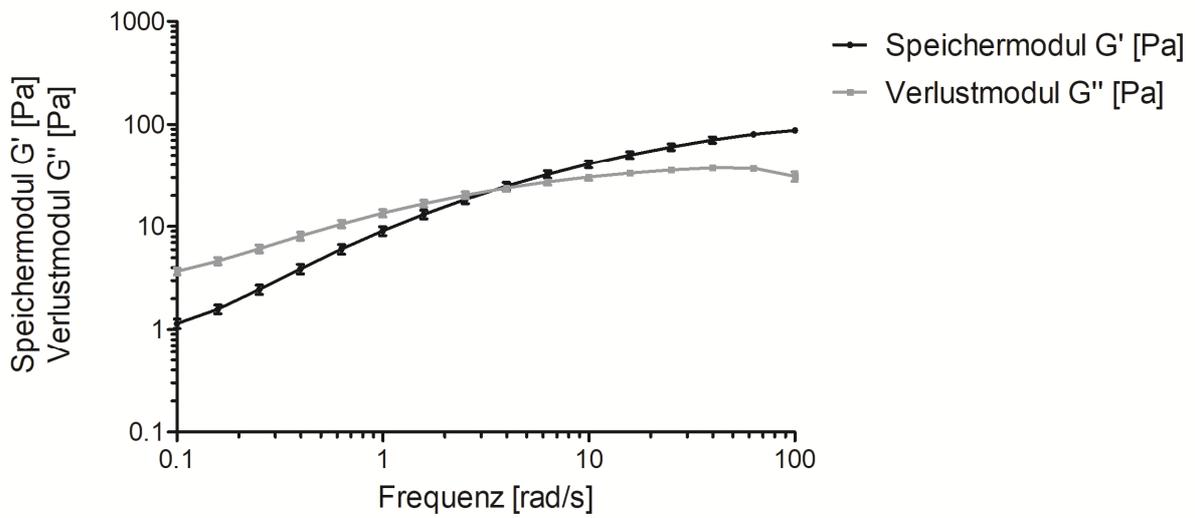


Abbildung 125: Frequenzsweep des Hydrogels 3 nach einmonatiger Lagerung bei 5 °C, Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (MW ± SD; n = 3), Hydrogel 3 = 1,0 % VLMW-HA, 1,0 % HMW-HA, Scherdeformation = 5,0 %, Messtemperatur = 25 °C, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt 500 µm

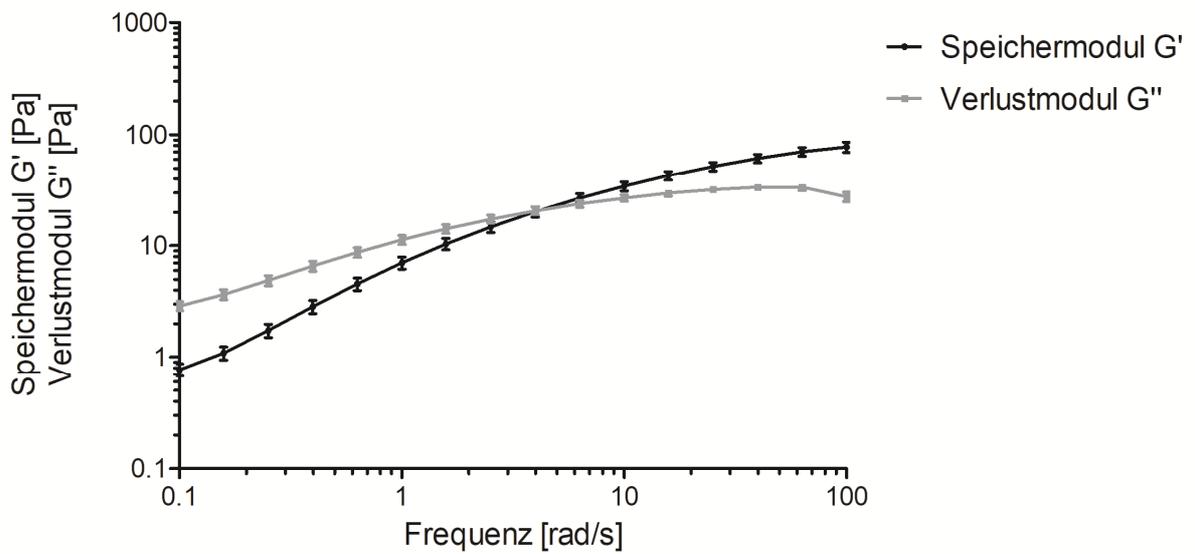


Abbildung 126: Frequenzsweep des Hydrogels 3 nach einmonatiger Lagerung bei 25 °C, 60 %rH, Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (MW ± SD; n = 3), Hydrogel 3 = 1,0 % VLMW-HA, 1,0 % HMW-HA, Scherdeformation = 5,0 %, Messtemperatur = 25 °C, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt 500 µm

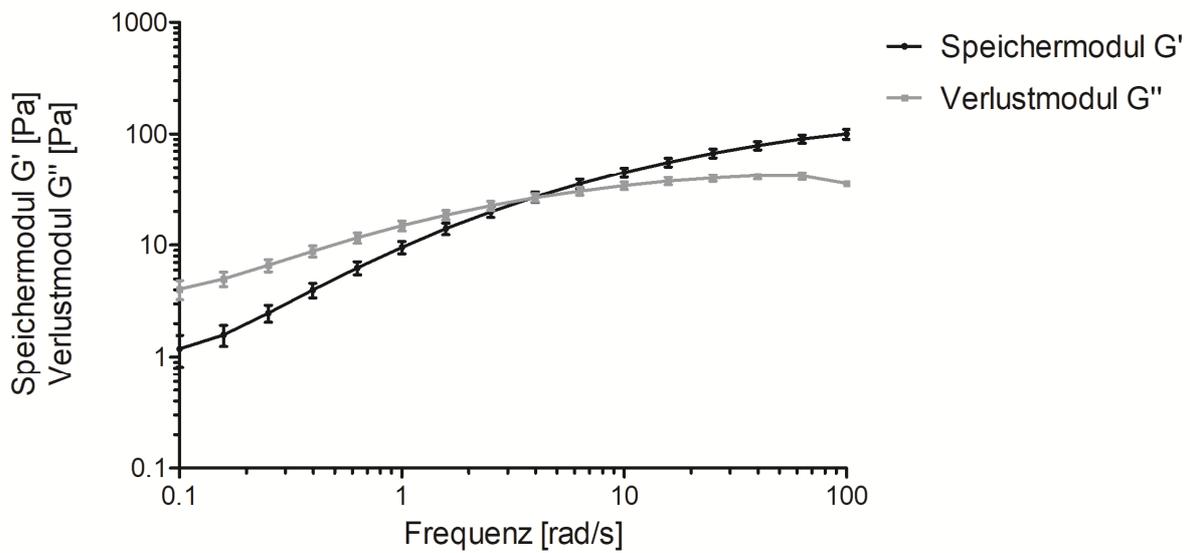


Abbildung 127: Frequenzsweep des Hydrogels 3 nach einmonatiger Lagerung bei 40 °C, 75 %rH, Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (MW ± SD; n = 3), Hydrogel 3 = 1,0 % VLMW-HA, 1,0 % HMW-HA, Scherdeformation = 5,0 %, Messtemperatur = 25 °C, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt 500 µm

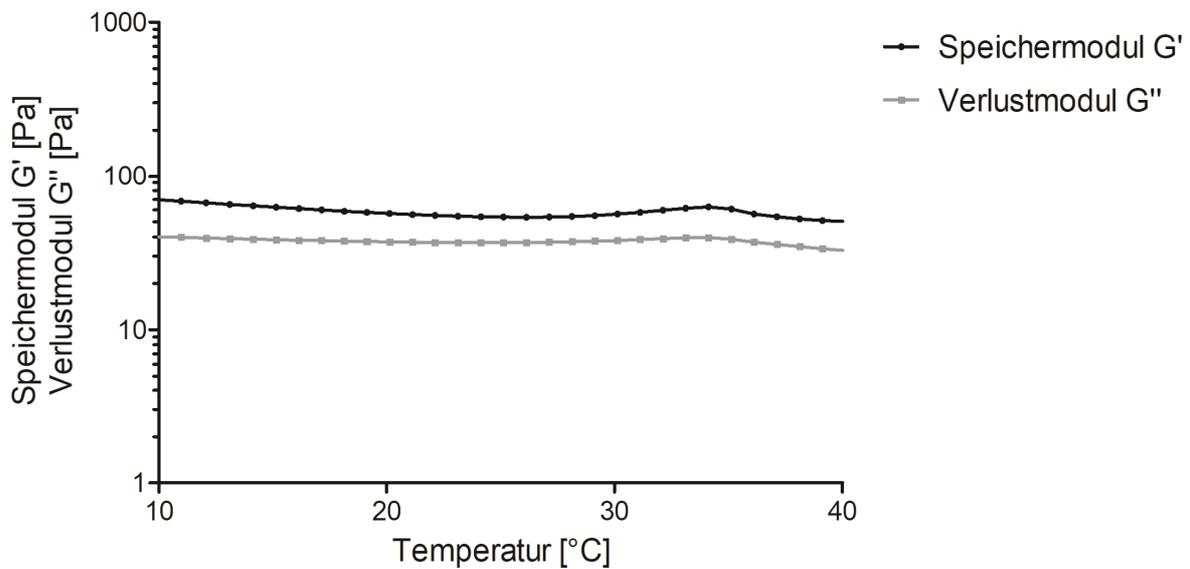


Abbildung 128: Temperatursweep des Hydrogels 3 an Tag 1 der Lagerungsstabilität, 24 Stunden nach der Herstellung, Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (MW ± SD; n = 3), Hydrogel 3 = 1,0 % VLMW-HA, 1,0 % HMW-HA, Scherdeformation = 5,0 %, Kreisfrequenz = 10 rad/s, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt 500 µm

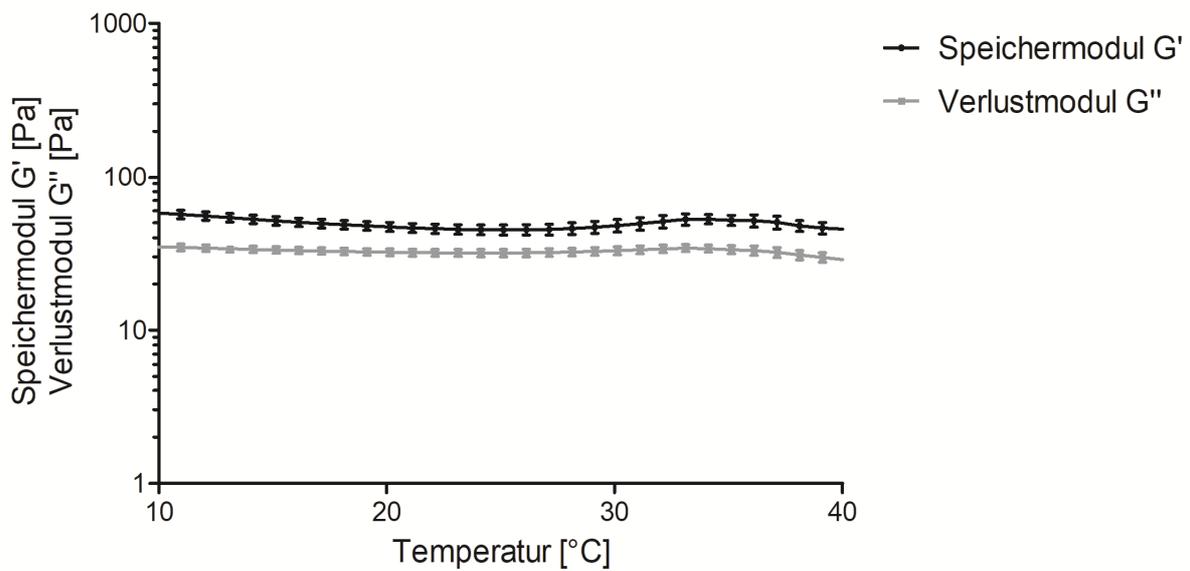


Abbildung 129: Temperatursweep des Hydrogels 3 nach einmonatiger Lagerung bei 5 °C, Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (MW ± SD; n = 3), Hydrogel 3 = 1,0 % VLMW-HA, 1,0 % HMW-HA, Scherdeformation = 5,0 %, Kreisfrequenz = 10 rad/s, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt 500 µm

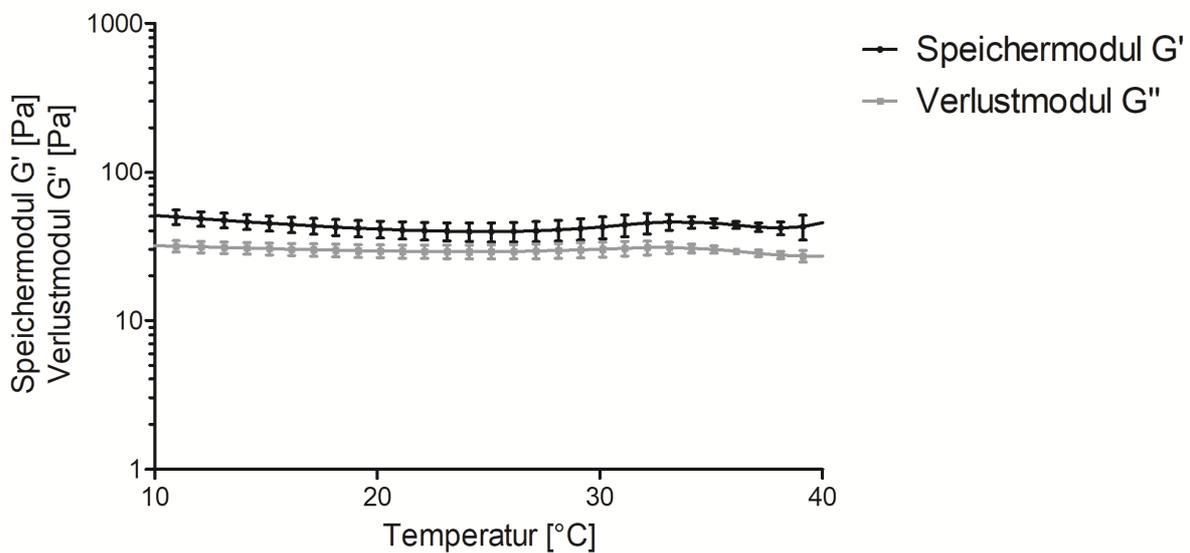


Abbildung 130: Temperatursweep des Hydrogels 3 nach einmonatiger Lagerung bei 25 °C, 60 %rH, Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (MW ± SD; n = 3), Hydrogel 3 = 1,0 % VLMW-HA, 1,0 % HMW-HA, Scherdeformation = 5,0 %, Kreisfrequenz = 10 rad/s, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt 500 µm

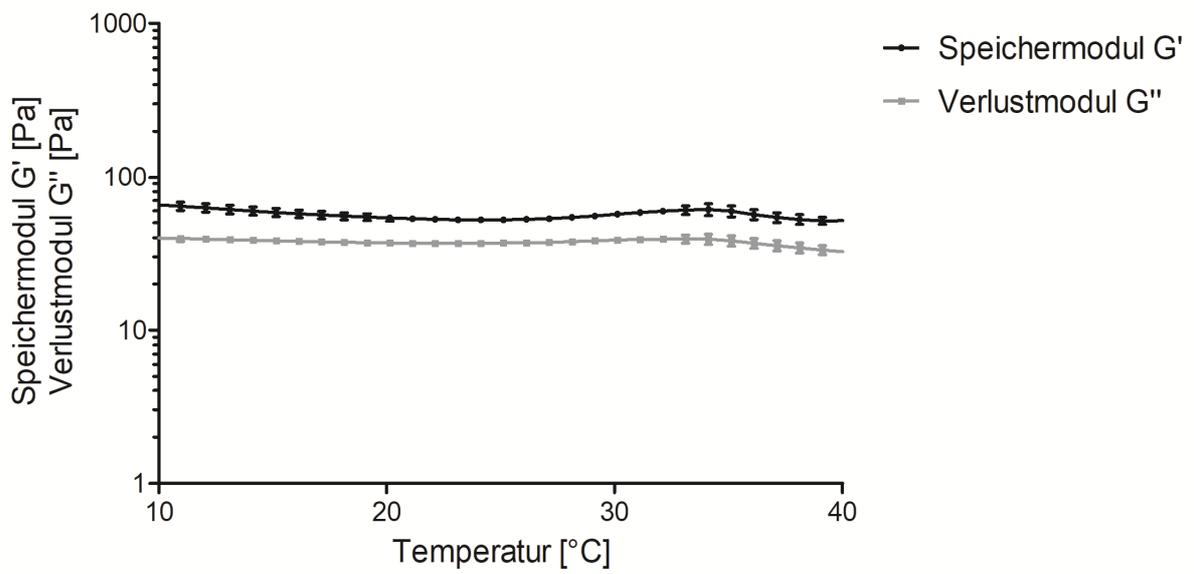


Abbildung 131: Temperatursweep des Hydrogels 3 nach einmonatiger Lagerung bei 40 °C, 75 %rH, Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa ($MW \pm SD$; $n = 3$), Hydrogel 3 = 1,0 % VLMW-HA, 1,0 % HMW-HA, Scherdeformation = 5,0 %, Kreisfrequenz = 10 rad/s, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt 500 μm

XII. Rheogramme: Lagerungsstabilitätsuntersuchung von Hydrogel 4

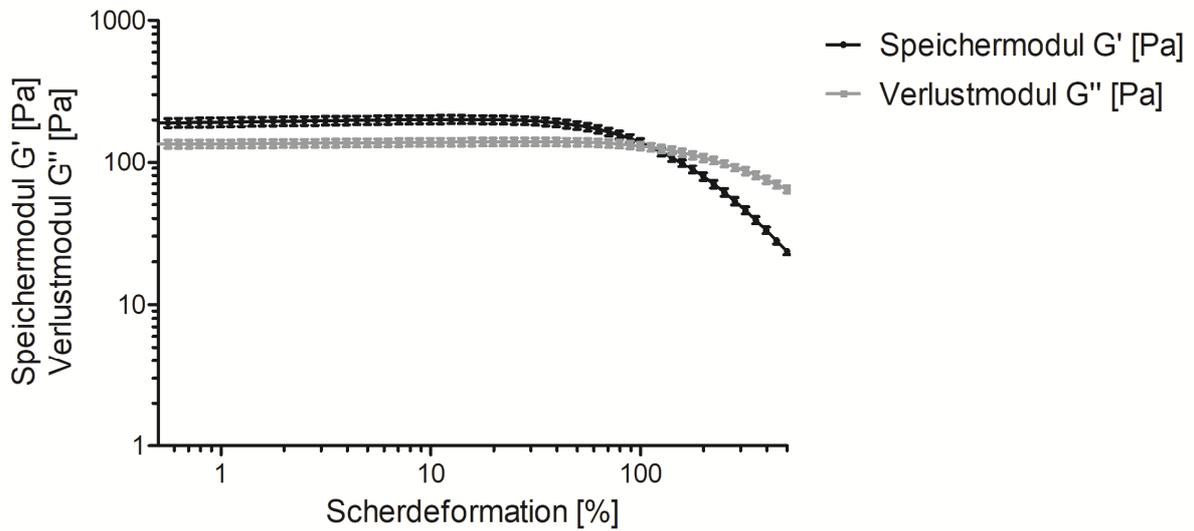


Abbildung 132: Amplitudensweep des Hydrogels 4 an Tag 1 der Lagerungsstabilität, 24 Stunden nach der Herstellung, Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa ($MW \pm SD$; $n = 3$), Hydrogel 4 = 1,0 % LMW-HA, 1,5 % SMW-HA, Kreisfrequenz = 10 rad/s, Messtemperatur = 25 °C, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt 500 μm

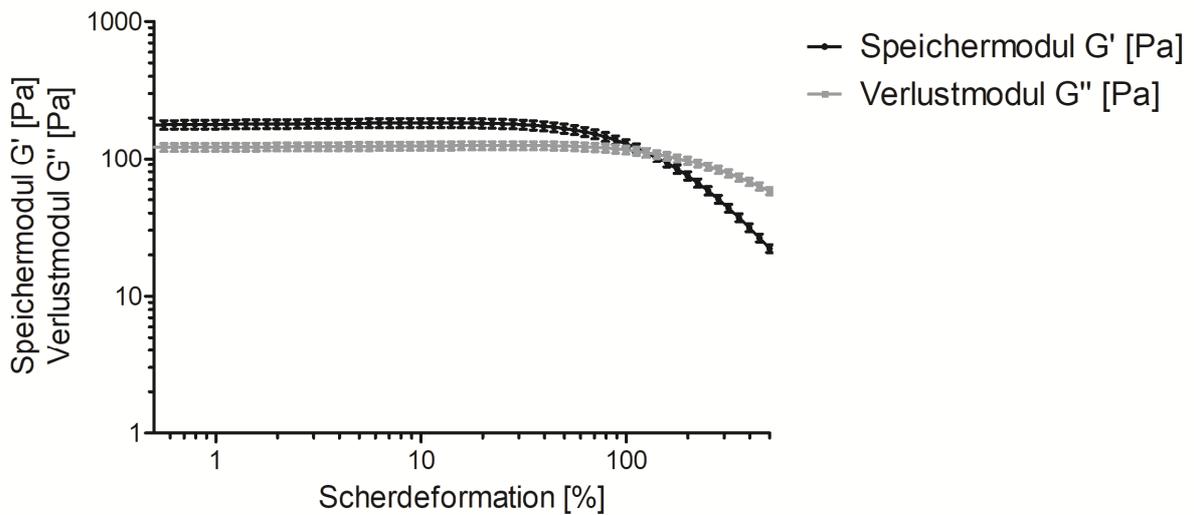


Abbildung 133: Amplitudensweep des Hydrogels 4 nach einmonatiger Lagerung bei 5 °C, Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (MW ± SD; n = 3), Hydrogel 4 = 1,0 % LMW-HA, 1,5 % SMW-HA, Kreisfrequenz = 10 rad/s, Messtemperatur = 25 °C, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt 500 µm

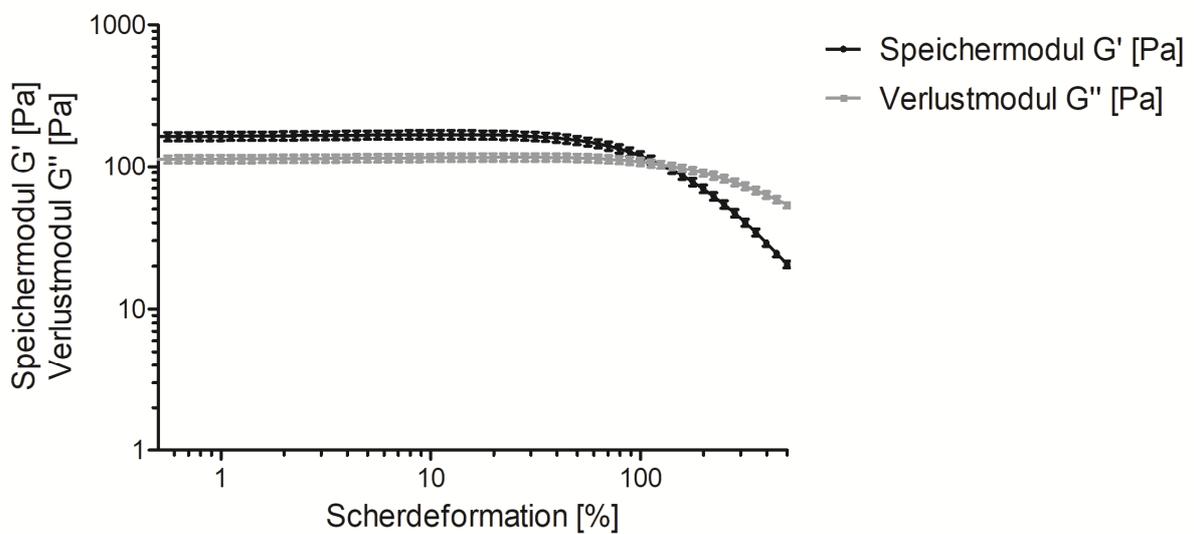


Abbildung 134: Amplitudensweep des Hydrogels 4 nach einmonatiger Lagerung bei 25 °C, 60 %rH, Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (MW ± SD; n = 3), Hydrogel 4 = 1,0 % LMW-HA, 1,5 % SMW-HA, Kreisfrequenz = 10 rad/s, Messtemperatur = 25 °C, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt 500 µm

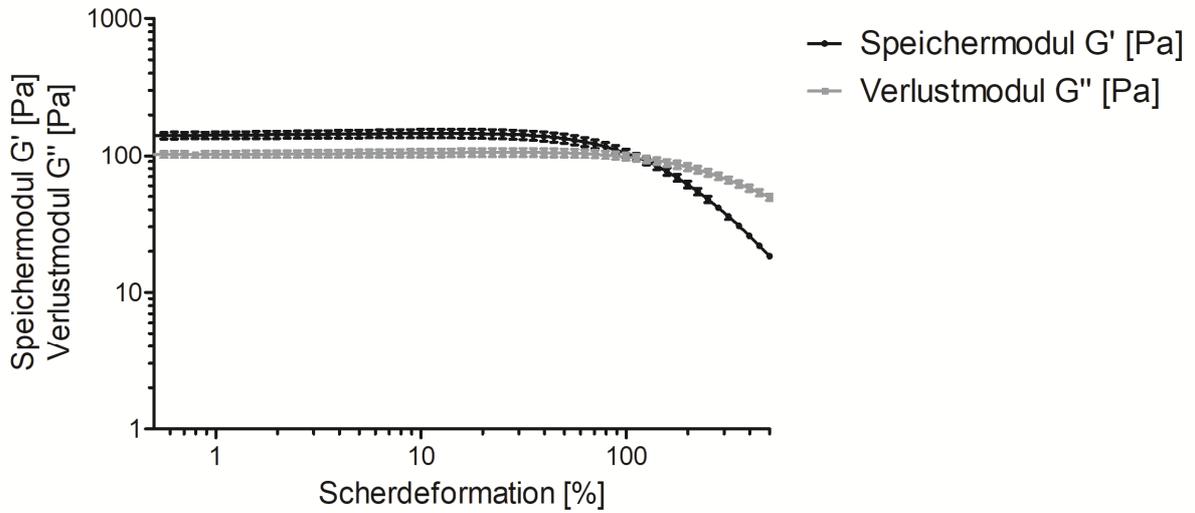


Abbildung 135: Amplitudensweep des Hydrogels 4 nach einmonatiger Lagerung bei 40 °C, 75 %rH, Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (MW \pm SD; n = 3), Hydrogel 4 = 1,0 % LMW-HA, 1,5 % SMW-HA, Kreisfrequenz = 10 rad/s, Messtemperatur = 25 °C, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt 500 μ m

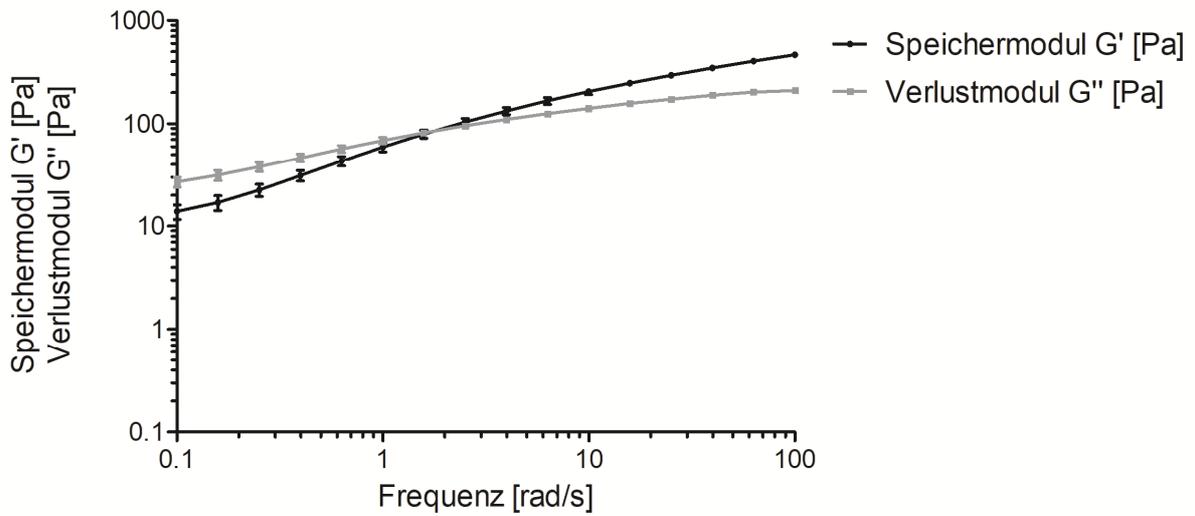


Abbildung 136: Frequenzsweep des Hydrogels 4 an Tag 1 der Lagerungsstabilität, 24 Stunden nach der Herstellung, Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (MW \pm SD; n = 3), Hydrogel 4 = 1,0 % LMW-HA, 1,5 % SMW-HA, Scherdeformation = 5,0 %, Messtemperatur = 25 °C, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt 500 μ m

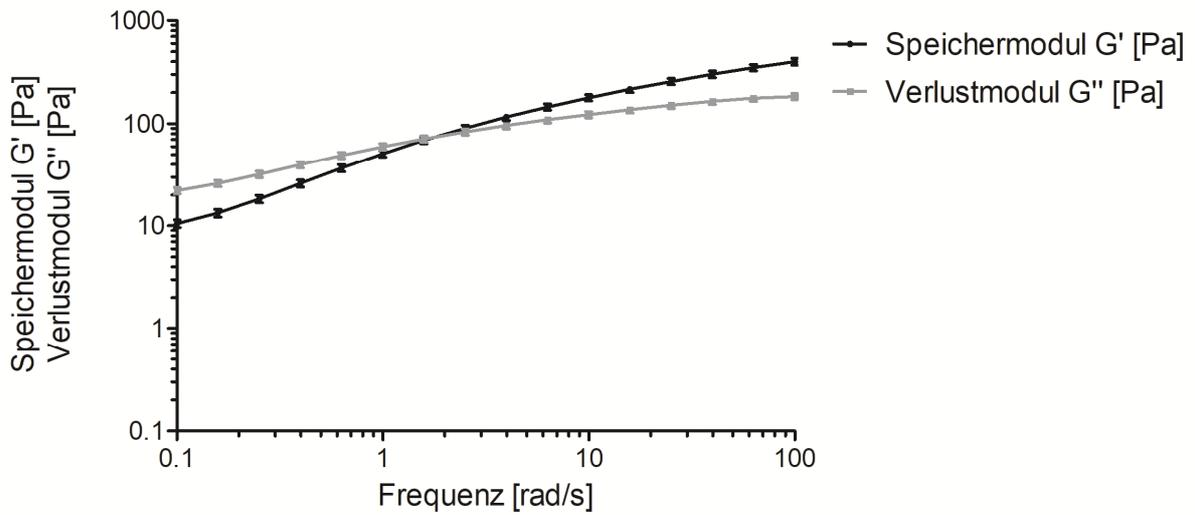


Abbildung 137: Frequenzsweep des Hydrogels 4 nach einmonatiger Lagerung bei 5 °C, Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (MW ± SD; n = 3), Hydrogel 4 = 1,0 % LMW-HA, 1,5 % SMW-HA, Scherdeformation = 5,0 %, Messtemperatur = 25 °C, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt 500 µm

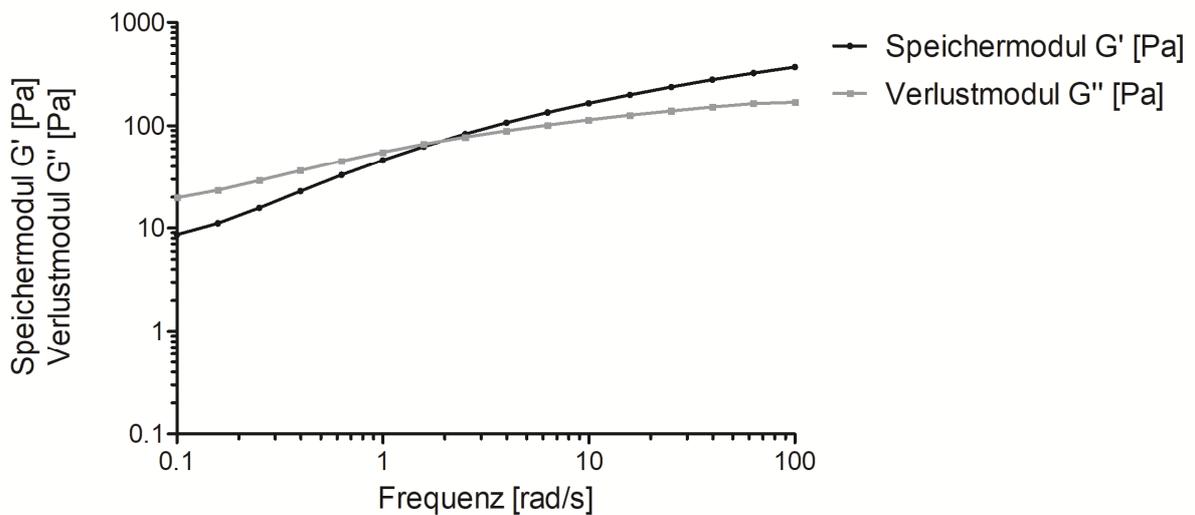


Abbildung 138: Frequenzsweep des Hydrogels 4 nach einmonatiger Lagerung bei 25 °C, 60 %rH, Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (MW ± SD; n = 3), Hydrogel 4 = 1,0 % LMW-HA, 1,5 % SMW-HA, Scherdeformation = 5,0 %, Messtemperatur = 25 °C, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt 500 µm

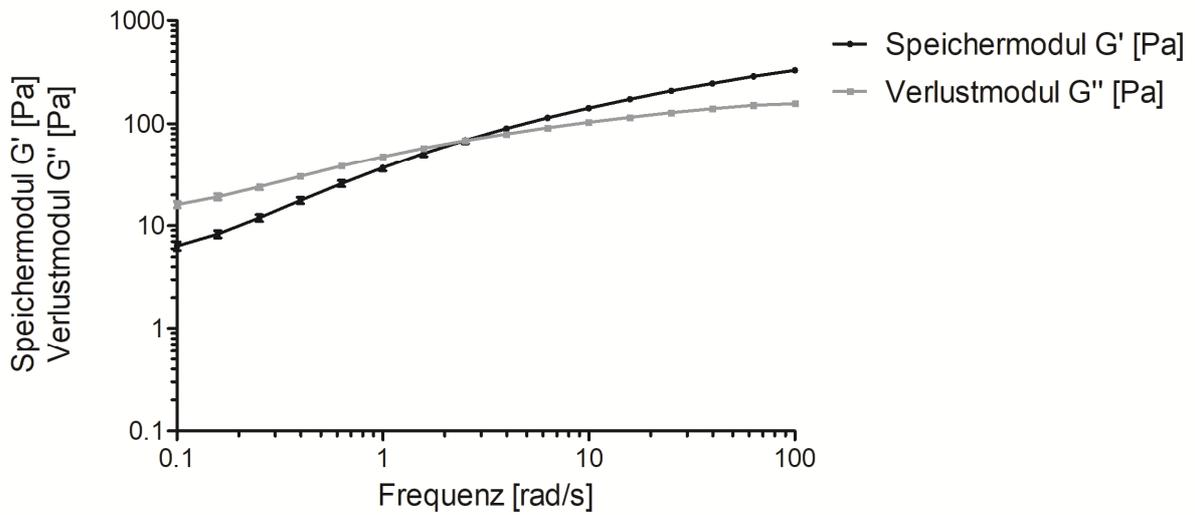


Abbildung 139: Frequenzsweep des Hydrogels 4 nach einmonatiger Lagerung bei 40 °C, 75 %rH, Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (MW ± SD; n = 3), Hydrogel 4 = 1,0 % LMW-HA, 1,5 % SMW-HA, Scherdeformation = 5,0 %, Messtemperatur = 25 °C, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt 500 µm

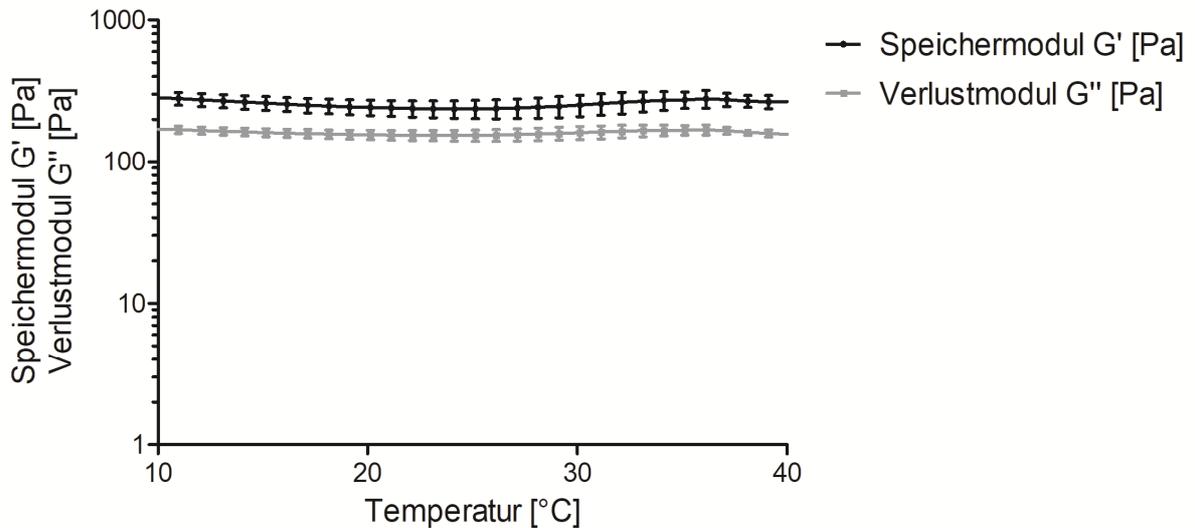


Abbildung 140: Temperatursweep des Hydrogels 4 an Tag 1 der Lagerungsstabilität, 24 Stunden nach der Herstellung, Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (MW ± SD; n = 3), Hydrogel 4 = 1,0 % LMW-HA, 1,5% SMW-HA, Scherdeformation = 5,0 %, Messtemperatur = 25 °C, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt 500 µm

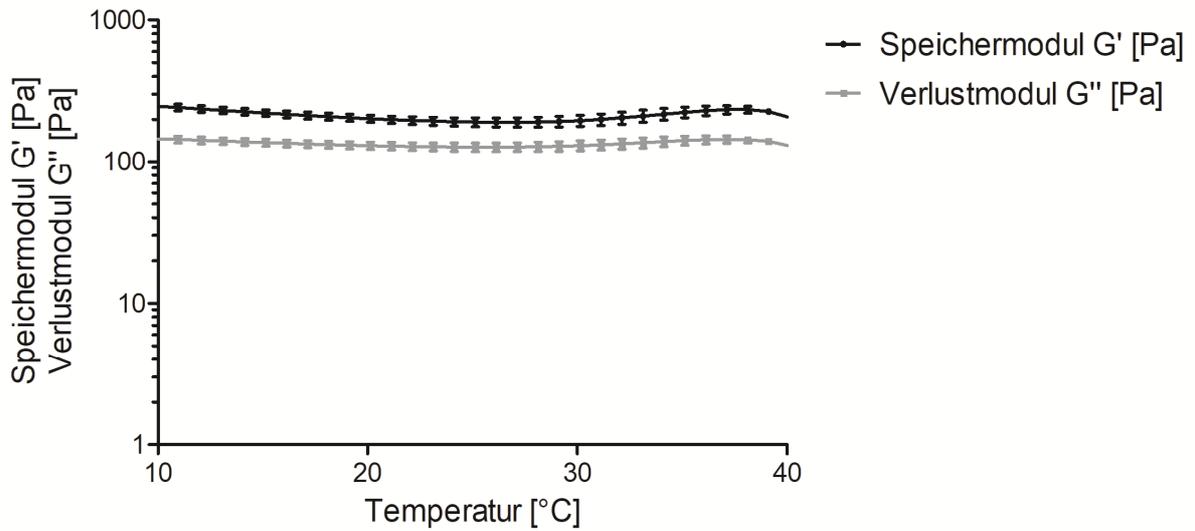


Abbildung 141: Temperatursweep des Hydrogels 4 nach einmonatiger Lagerung bei 5 °C, Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (MW ± SD; n = 3), Hydrogel 4 = 1,0 % LMW-HA, 1,5% SMW-HA, Scherdeformation = 5,0 %, Messtemperatur = 25 °C, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt 500 µm

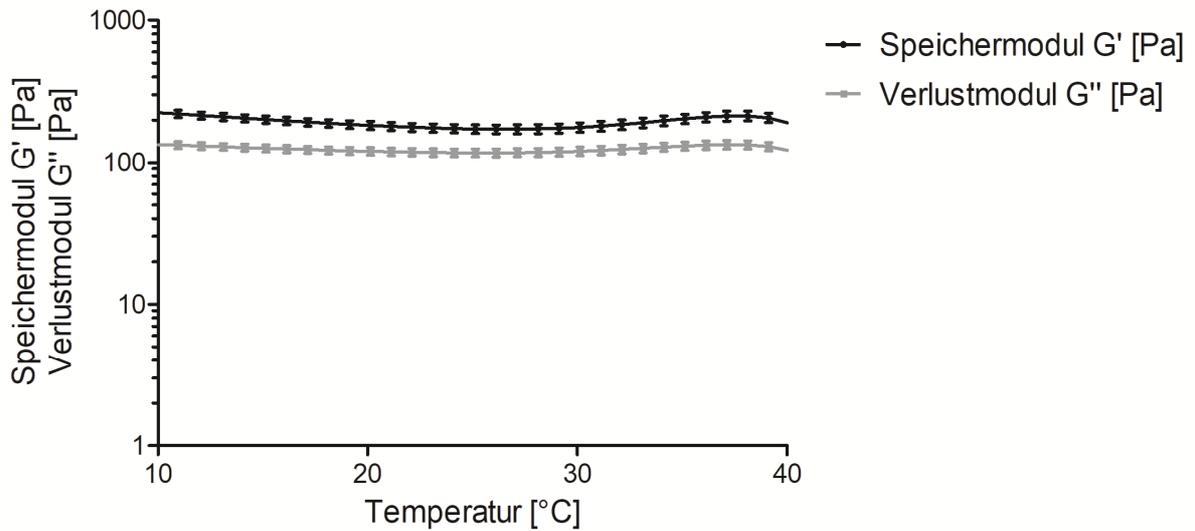


Abbildung 142: Temperatursweep des Hydrogels 4 nach einmonatiger Lagerung bei 25 °C, 60 %rH, Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (MW ± SD; n = 3), Hydrogel 4 = 1,0 % LMW-HA, 1,5% SMW-HA, Scherdeformation = 5,0 %, Messtemperatur = 25 °C, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt 500 µm

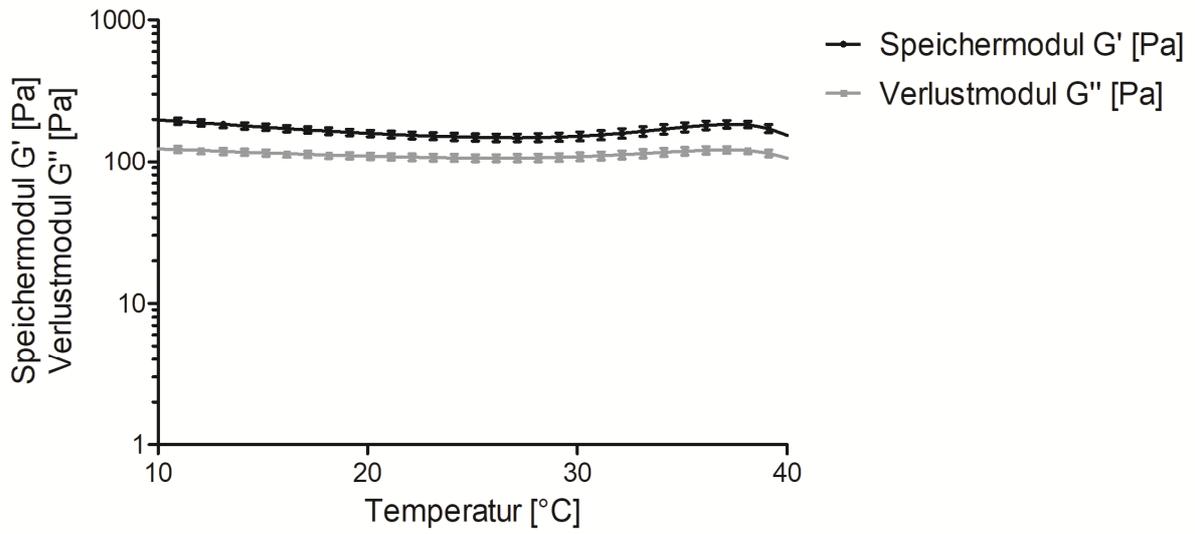


Abbildung 143: Temperatursweep des Hydrogels 4 nach einmonatiger Lagerung bei 40 °C, 75 %rH, Speichermodul G' und Verlustmodul G'' in Pa (MW ± SD; n = 3), Hydrogel 4 = 1,0 % LMW-HA, 1,5% SMW-HA, Scherdeformation = 5,0 %, Messtemperatur = 25 °C, Platte-Platte-Messapparatur, Messspalt 500 µm

XIII. Chromatogramme von Api m 1 in PBS

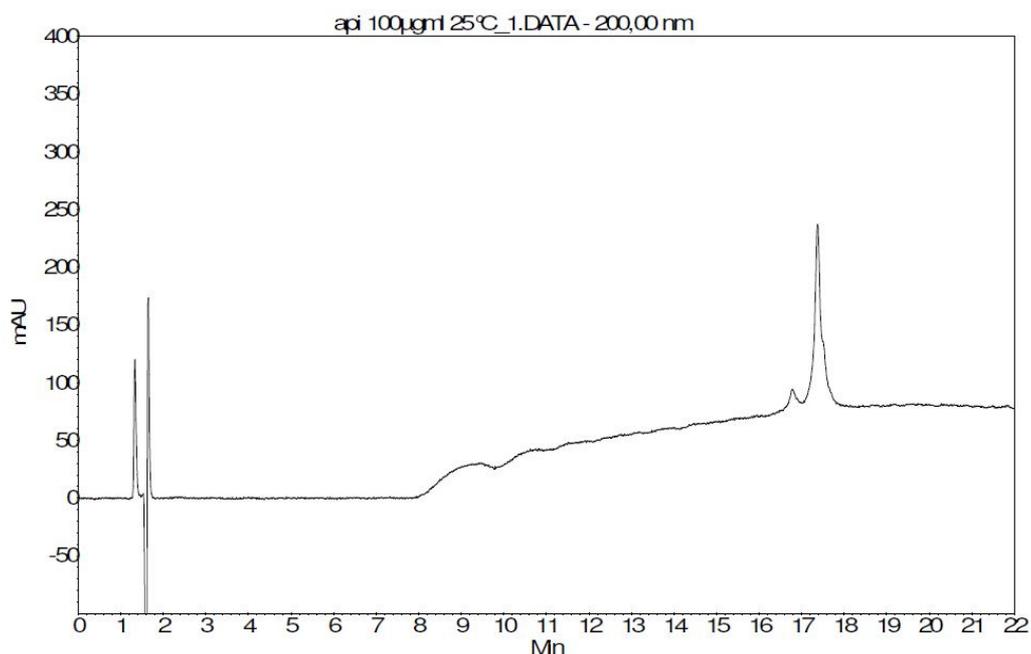


Abbildung 144: Chromatogramm einer Api m 1-haltigen PBS-Lösung (0,1 mg/ml), Wellenlänge = 200 nm, Säule: Phenomenex Jupiter® C18 (300 Å, 5 µm 100x4,6 mm), Temperatur = 25 °C, Absorption in Millivolt (mV), Flussrate = 1,0 ml/min, Eluent A: Acetonitril + 0,1 % TFA, Eluent B: Gereinigtes Wasser + 0,1 % TFA, Gradient (min, %A): (0; 5), (5; 5) (20; 52), (25; 80), (30; 100), (35; 5), (40; 5)

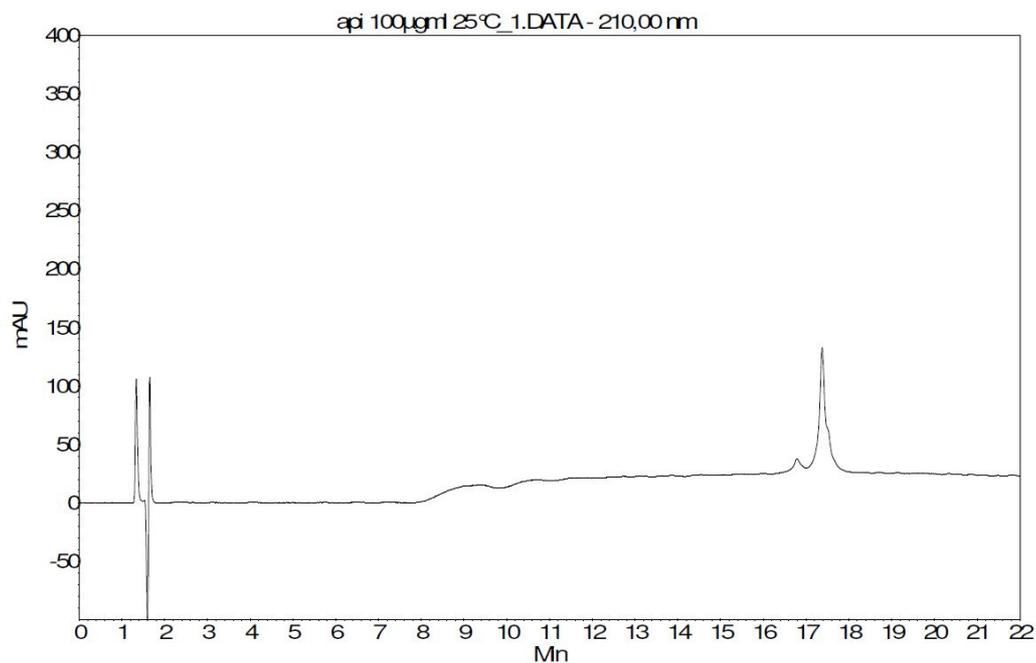


Abbildung 145: Chromatogramm einer Api m 1-haltigen PBS-Lösung (0,1 mg/ml), Wellenlänge = 210 nm, Säule: Phenomenex Jupiter® C18 (300 Å, 5 µm 100x4,6 mm), Temperatur = 25 °C, Absorption in Millivolt (mV), Flussrate = 1,0 ml/min, Eluent A: Acetonitril + 0,1 % TFA, Eluent B: Gereinigtes Wasser + 0,1 % TFA, Gradient (min, %A): (0; 5), (5; 5) (20; 52), (25; 80), (30; 100), (35; 5), (40; 5)

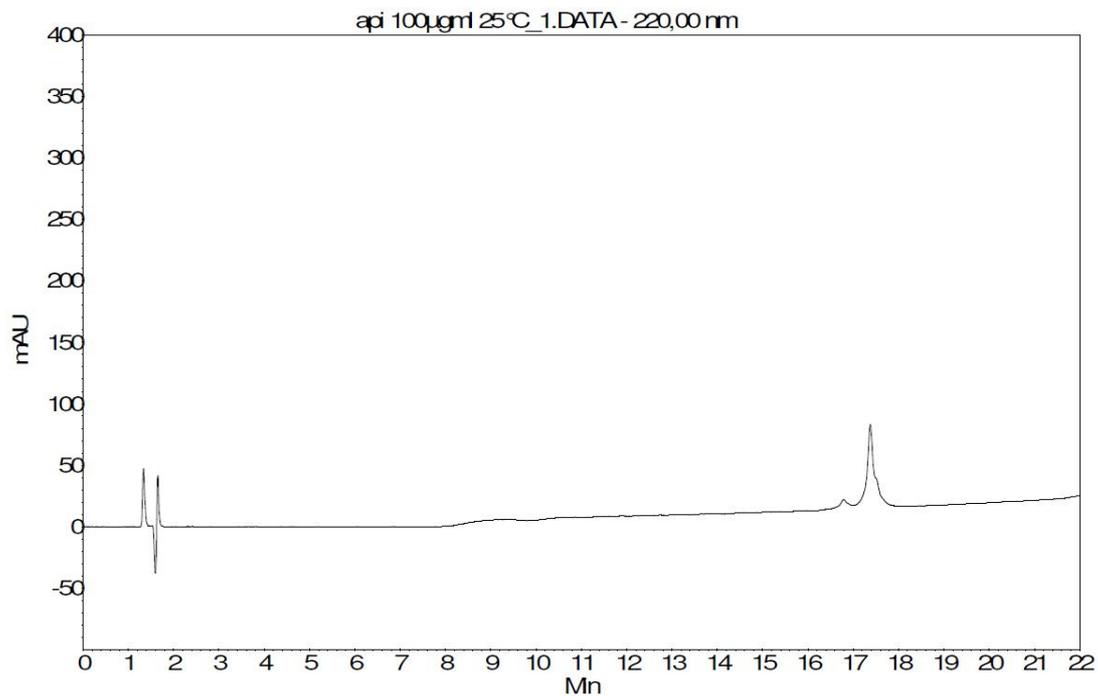


Abbildung 146: Chromatogramm einer Api m 1-haltigen PBS-Lösung (0,1 mg/ml), Wellenlänge 220 nm, Säule: Phenomenex Jupiter® C18 (300 Å, 5 µm 100x4,6 mm), Temperatur = 25 °C, Absorption in Millivolt (mV), Flussrate = 1,0 ml/min, Eluent A: Acetonitril + 0,1 % TFA, Eluent B: Gereinigtes Wasser + 0,1 % TFA, Gradient (min, %A): (0; 5), (5; 5) (20; 52), (25; 80), (30; 100), (35; 5), (40; 5)

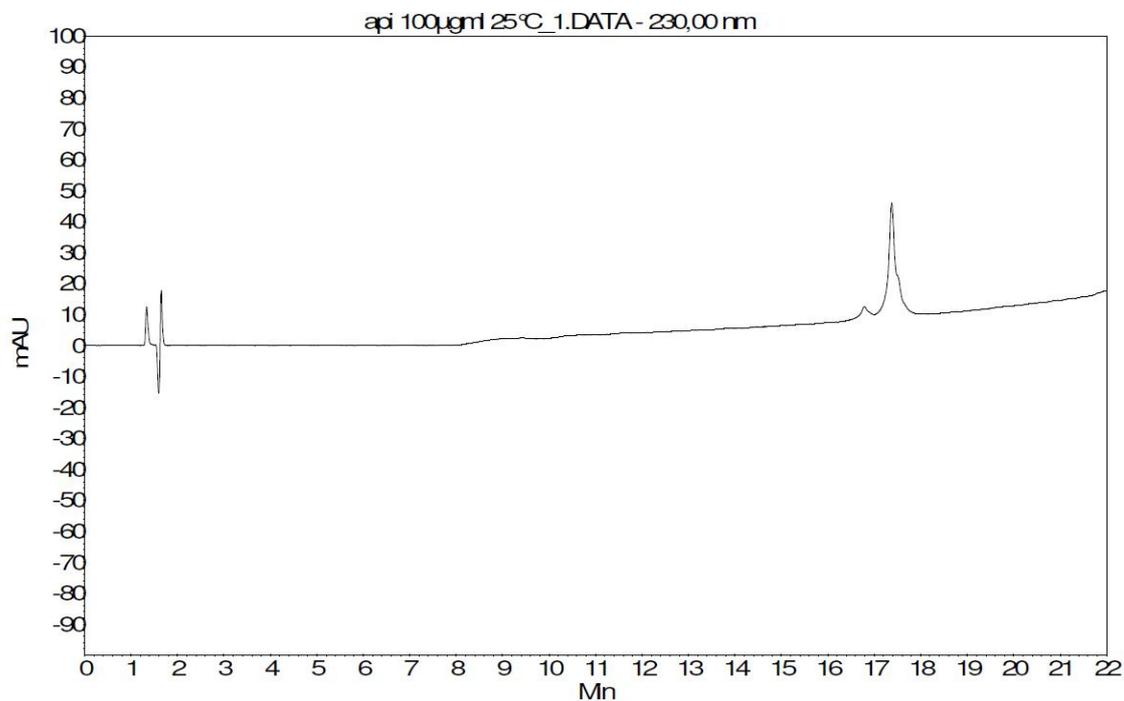


Abbildung 147: Chromatogramm einer Api m 1-haltigen PBS-Lösung (0,1 mg/ml), Wellenlänge = 230 nm, Säule: Phenomenex Jupiter® C18 (300 Å, 5 µm 100x4,6 mm), Temperatur = 25 °C, Absorption in Millivolt (mV), Flussrate = 1,0 ml/min, Eluent A: Acetonitril + 0,1 % TFA, Eluent B: Gereinigtes Wasser + 0,1 % TFA, Gradient (min, %A): (0; 5), (5; 5) (20; 52), (25; 80), (30; 100), (35; 5), (40; 5)

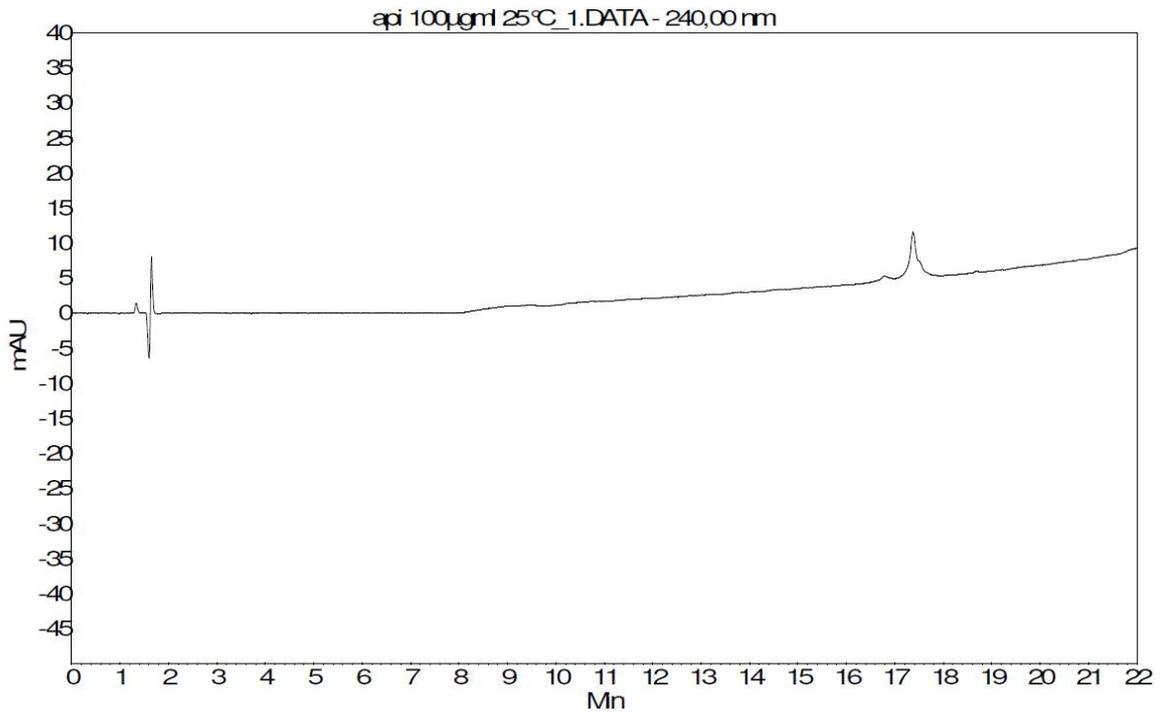


Abbildung 148: Chromatogramm einer Apim 1-haltigen PBS-Lösung (0,1 mg/ml), Wellenlänge = 240 nm, Säule: Phenomenex Jupiter® C18 (300 Å, 5 µm 100x4,6 mm), Temperatur = 25 °C, Absorption in Millivolt (mV), Flussrate = 1,0 ml/min, Eluent A: Acetonitril + 0,1 % TFA, Eluent B: Gereinigtes Wasser + 0,1 % TFA, Gradient (min, %A): (0; 5), (5; 5) (20; 52), (25; 80), (30; 100), (35; 5), (40; 5)

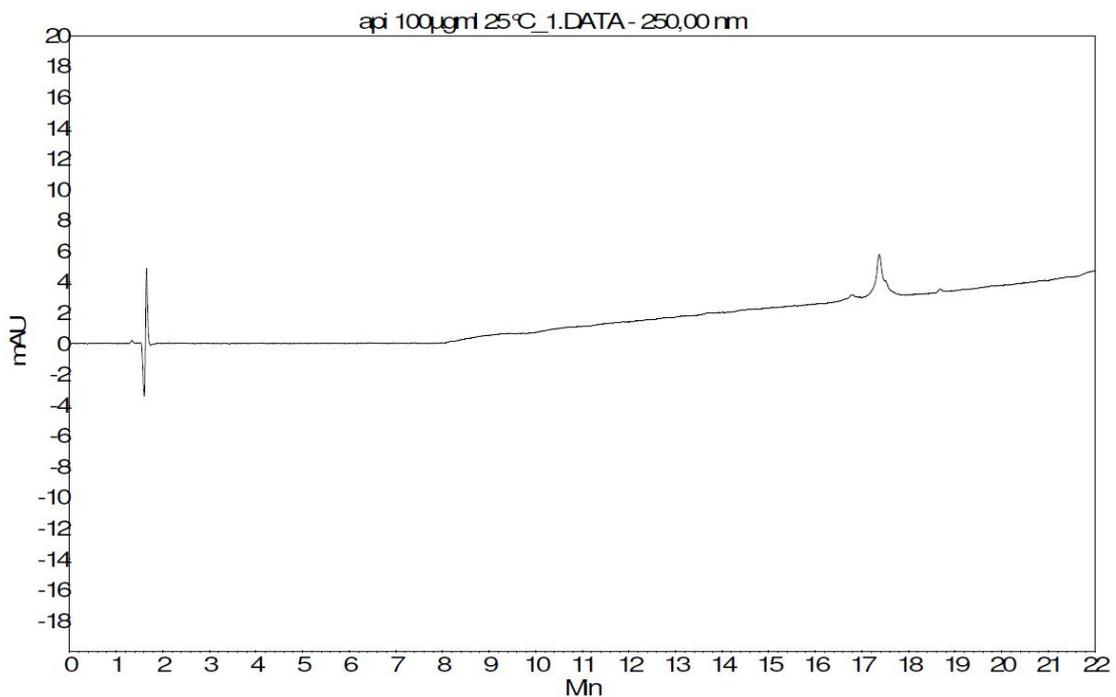


Abbildung 149: Chromatogramm einer Apim 1-haltigen PBS-Lösung (0,1 mg/ml), Wellenlänge = 250 nm, Säule: Phenomenex Jupiter® C18 (300 Å, 5 µm 100x4,6 mm), Temperatur = 25 °C, Absorption in Millivolt (mV), Flussrate = 1,0 ml/min, Eluent A: Acetonitril + 0,1 % TFA, Eluent B: Gereinigtes Wasser + 0,1 % TFA, Gradient (min, %A): (0; 5), (5; 5) (20; 52), (25; 80), (30; 100), (35; 5), (40; 5)

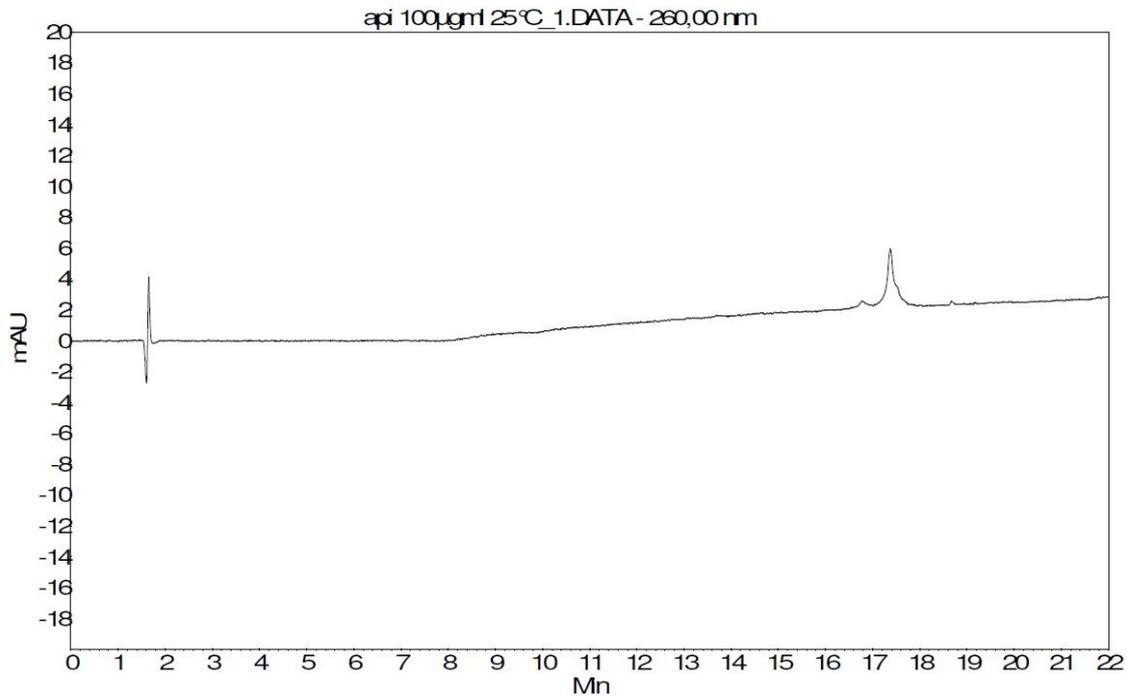


Abbildung 150: Chromatogramm einer Apim 1-haltigen PBS-Lösung (0,1 mg/ml), Wellenlänge = 260 nm, Säule: Phenomenex Jupiter® C18 (300 Å, 5 µm 100x4,6 mm), Temperatur = 25 °C, Absorption in Millivolt (mV), Flussrate = 1,0 ml/min, Eluent A: Acetonitril + 0,1 % TFA, Eluent B: Gereinigtes Wasser + 0,1 % TFA, Gradient (min, %A): (0; 5), (5; 5) (20; 52), (25; 80), (30; 100), (35; 5), (40; 5)

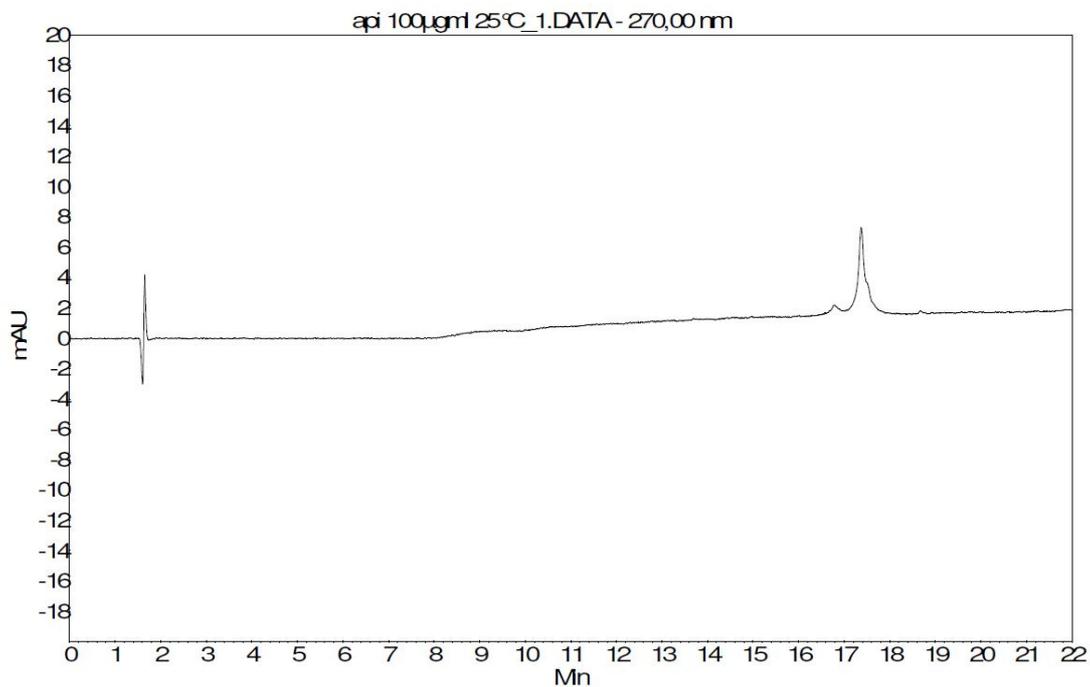


Abbildung 151: Chromatogramm einer Apim 1-haltigen PBS-Lösung (0,1 mg/ml), Wellenlänge = 270 nm, Säule: Phenomenex Jupiter® C18 (300 Å, 5 µm 100x4,6 mm), Temperatur = 25 °C, Absorption in Millivolt (mV), Flussrate = 1,0 ml/min, Eluent A: Acetonitril + 0,1 % TFA, Eluent B: Gereinigtes Wasser + 0,1 % TFA, Gradient (min, %A): (0; 5), (5; 5) (20; 52), (25; 80), (30; 100), (35; 5), (40; 5)

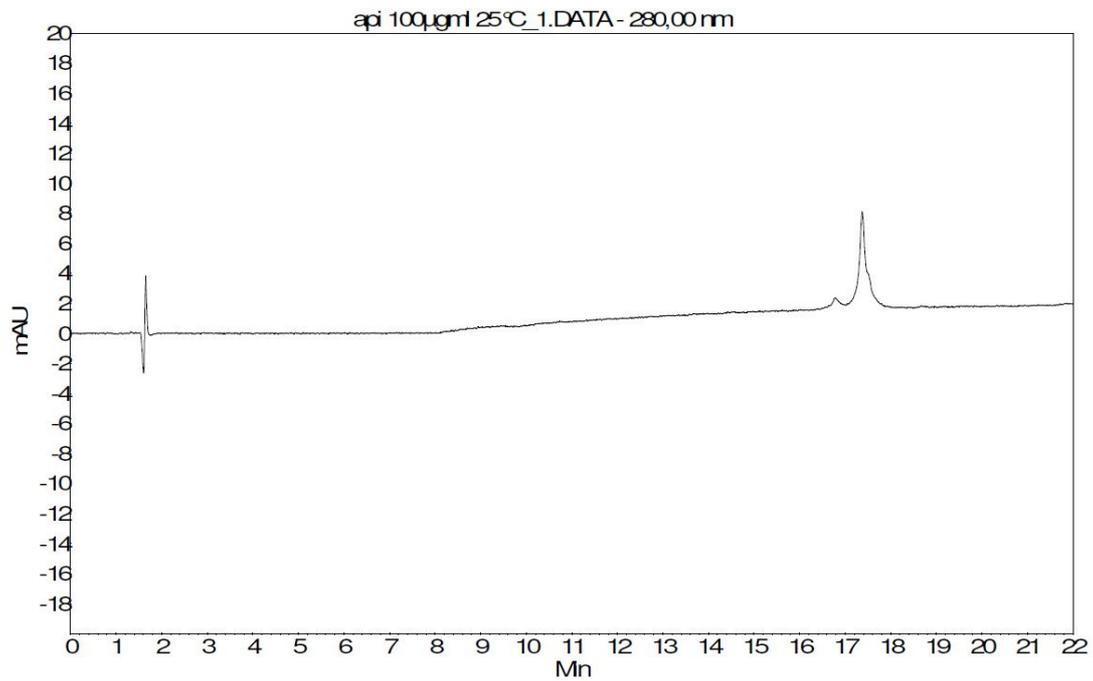


Abbildung 152: Chromatogramm einer Api m 1-haltigen PBS-Lösung (0,1 mg/ml), Wellenlänge = 280 nm, Säule: Phenomenex Jupiter® C18 (300 Å, 5 µm 100x4,6 mm), Temperatur = 25 °C, Absorption in Millivolt (mV), Flussrate = 1,0 ml/min, Eluent A: Acetonitril + 0,1 % TFA, Eluent B: Gereinigtes Wasser + 0,1 % TFA, Gradient (min, %A): (0; 5), (5; 5) (20; 52), (25; 80), (30; 100), (35; 5), (40; 5)

XIV. Chromatogramme: HPLC-Methodenentwicklung

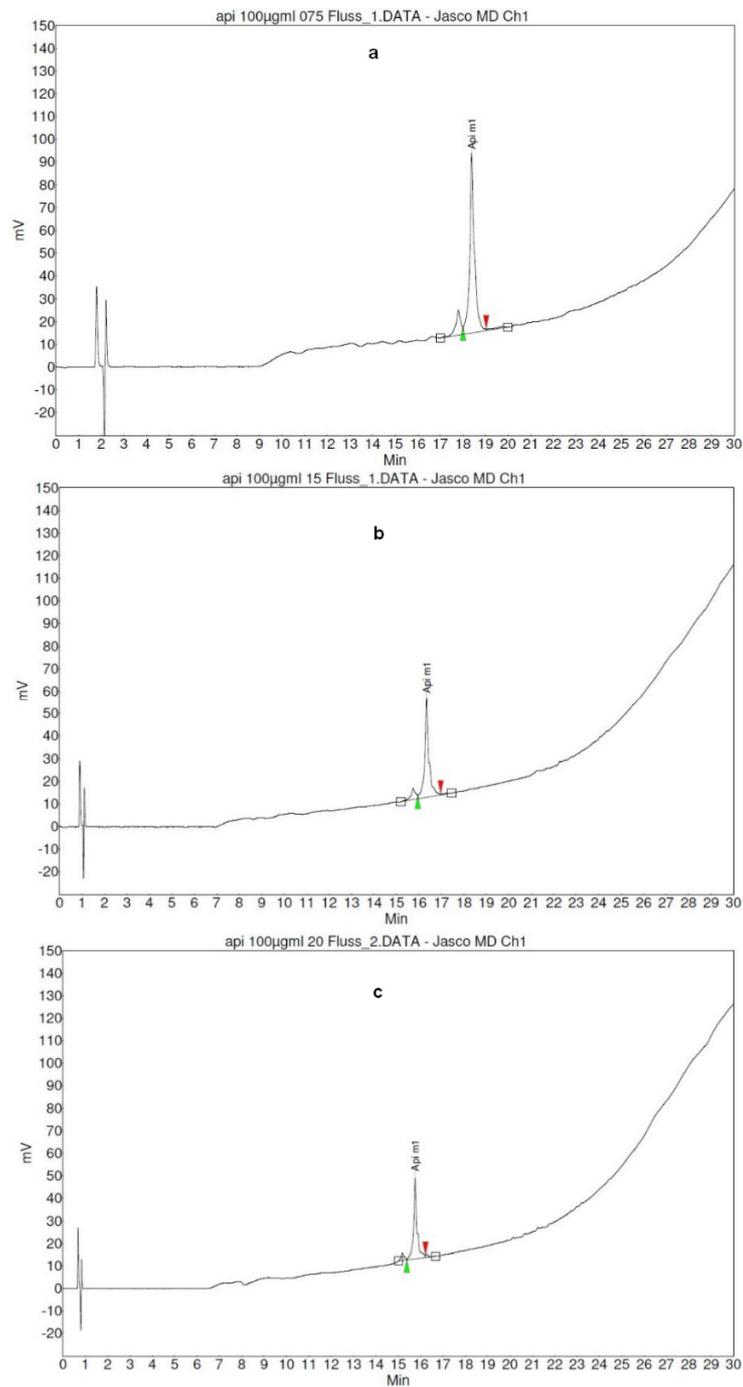


Abbildung 153: Chromatogramme von Api m 1 in PBS, Säule: Phenomenex Jupiter® C18 (300 Å, 5 µm 100x4,6 mm), Temperatur = 25 °C, Absorption in Millivolt (mV), Eluent A: Acetonitril + 0,1 % TFA, Eluent B: Gereinigtes Wasser + 0,1 % TFA, Gradient (min, %A): (0; 5), (5; 5) (20; 52), (25; 80), (30; 100), (35; 5), (40; 5); Flussrate = 0,75 ml/min (a), 1,0 ml/min (b), 2,0 ml/min (c)

XV. Chromatogramme von Api m 1 in PBS, Methodenverkürzung 1

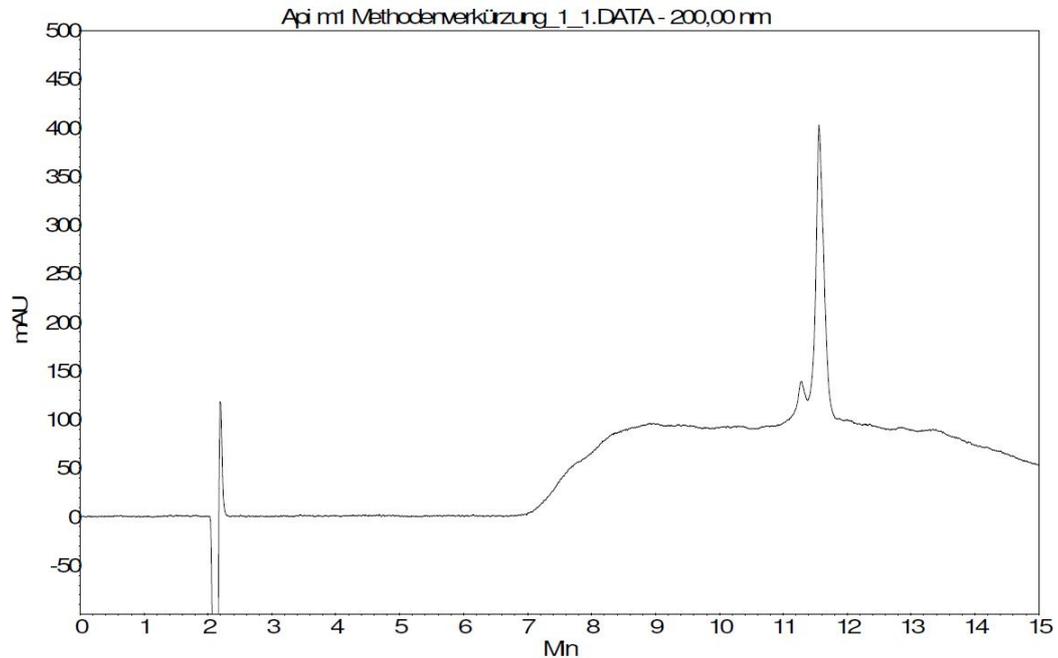


Abbildung 154: Chromatogramm einer Api m 1-haltigen PBS-Lösung (0,1 mg/ml), Wellenlänge = 200 nm, Säule: Phenomenex Jupiter® C18 (300 Å, 5 µm 100x4,6 mm), Temperatur = 25 °C, Absorption in Millivolt (mV), Flussrate = 0,75 ml/min, Eluent A: Acetonitril + 0,1 % TFA, Eluent B: Gereinigtes Wasser + 0,1 % TFA, Gradient (min, %A): (0; 5), (3; 5) (10,5; 52), (15,5; 80), (20; 100), (24; 5), (26; 5)

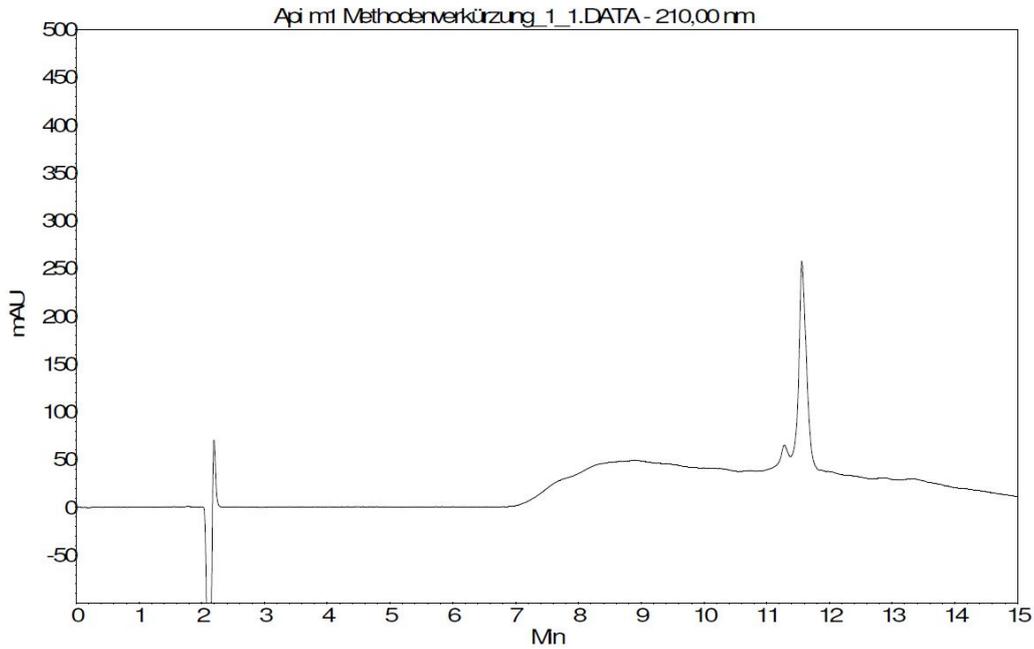


Abbildung 155: Chromatogramm einer Api m 1-haltigen PBS-Lösung (0,1 mg/ml), Wellenlänge = 210 nm, Säule: Phenomenex Jupiter® C18 (300 Å, 5 µm 100x4,6 mm), Temperatur = 25 °C, Absorption in Millivolt (mV), Flussrate = 0,75 ml/min, Eluent A: Acetonitril + 0,1 % TFA, Eluent B: Gereinigtes Wasser + 0,1 % TFA, Gradient (min, %A): (0; 5), (3; 5) (10,5; 52), (15,5; 80), (20; 100), (24; 5), (26; 5)

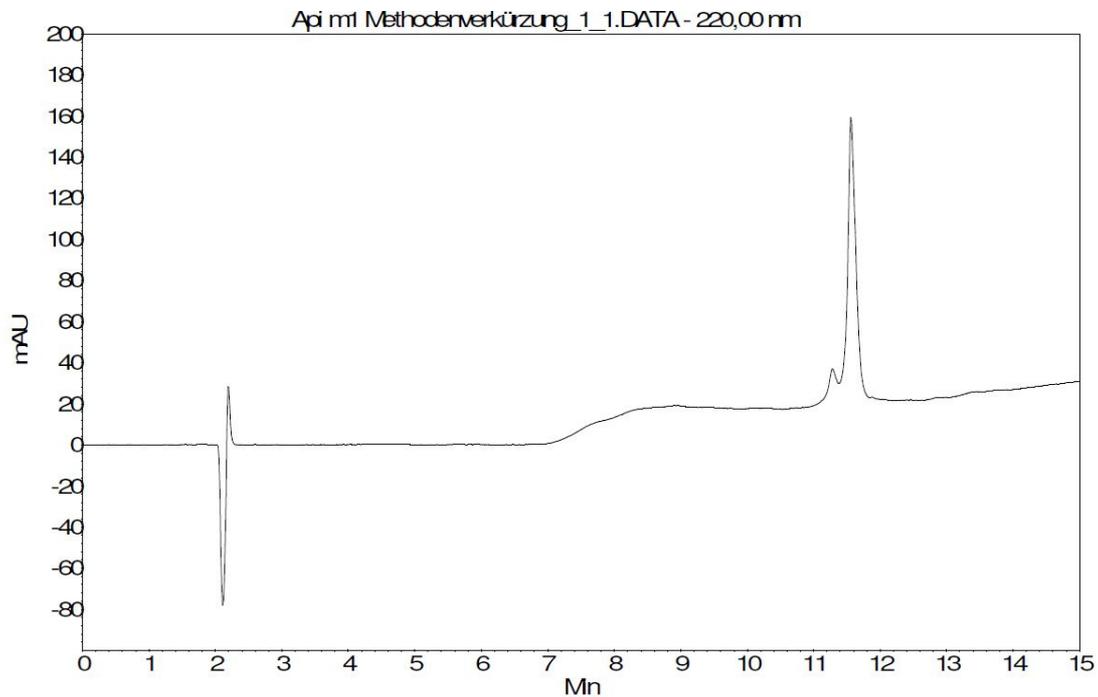


Abbildung 156: Chromatogramm einer Api m 1-haltigen PBS-Lösung (0,1 mg/ml), Wellenlänge = 220 nm, Säule: Phenomenex Jupiter® C18 (300 Å, 5 µm 100x4,6 mm), Temperatur = 25 °C, Absorption in Millivolt (mV), Flussrate = 0,75 ml/min, Eluent A: Acetonitril + 0,1 % TFA, Eluent B: Gereinigtes Wasser + 0,1 % TFA, Gradient (min, %A): (0; 5), (3; 5) (10,5; 52), (15,5; 80), (20; 100), (24; 5), (26; 5)

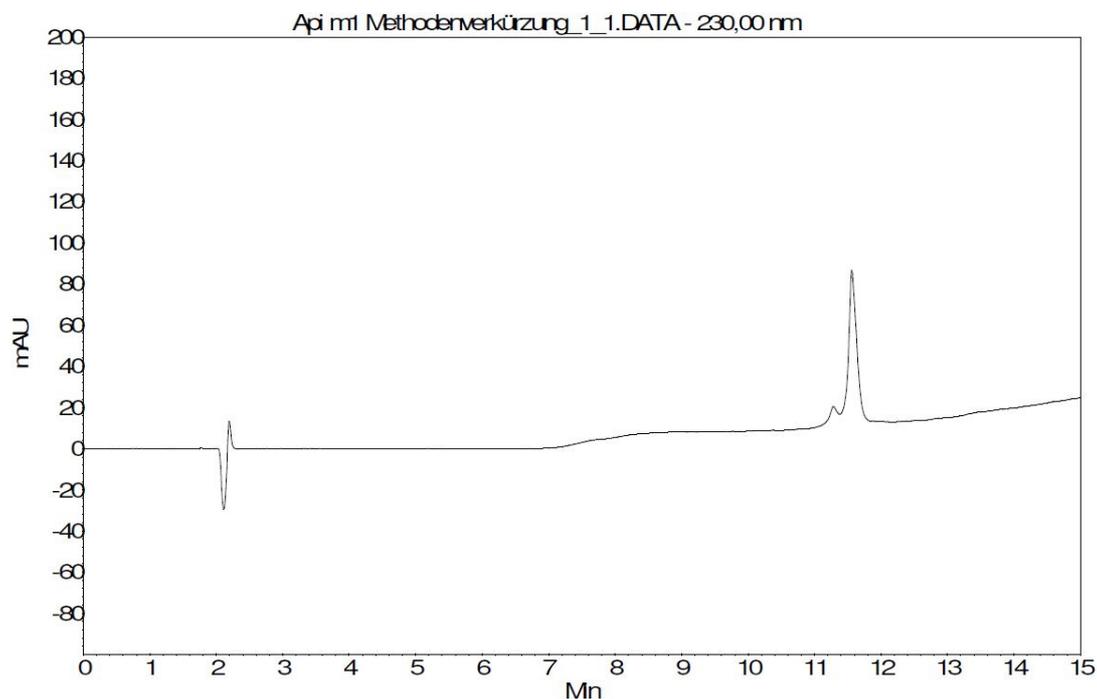


Abbildung 157: Chromatogramm einer Api m 1-haltigen PBS-Lösung (0,1 mg/ml), Wellenlänge = 230 nm, Säule: Phenomenex Jupiter® C18 (300 Å, 5 µm 100x4,6 mm), Temperatur = 25 °C, Absorption in Millivolt (mV), Flussrate = 0,75 ml/min, Eluent A: Acetonitril + 0,1 % TFA, Eluent B: Gereinigtes Wasser + 0,1 % TFA, Gradient (min, %A): (0; 5), (3; 5) (10,5; 52), (15,5; 80), (20; 100), (24; 5), (26; 5)

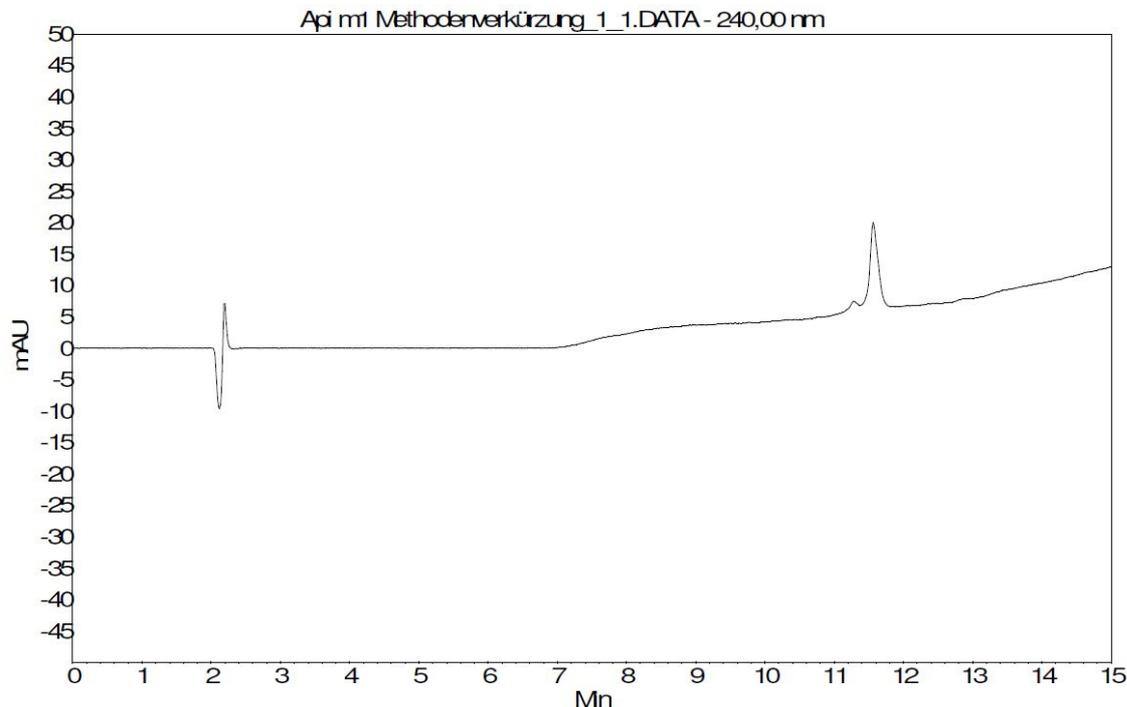


Abbildung 158: Chromatogramm einer Api m 1-haltigen PBS-Lösung (0,1 mg/ml), Wellenlänge = 240 nm, Säule: Phenomenex Jupiter® C18 (300 Å, 5 µm 100x4,6 mm), Temperatur = 25 °C, Absorption in Millivolt (mV), Flussrate = 0,75 ml/min, Eluent A: Acetonitril + 0,1 % TFA, Eluent B: Gereinigtes Wasser + 0,1 % TFA, Gradient (min, %A): (0; 5), (3; 5) (10,5; 52), (15,5; 80), (20; 100), (24; 5), (26; 5)

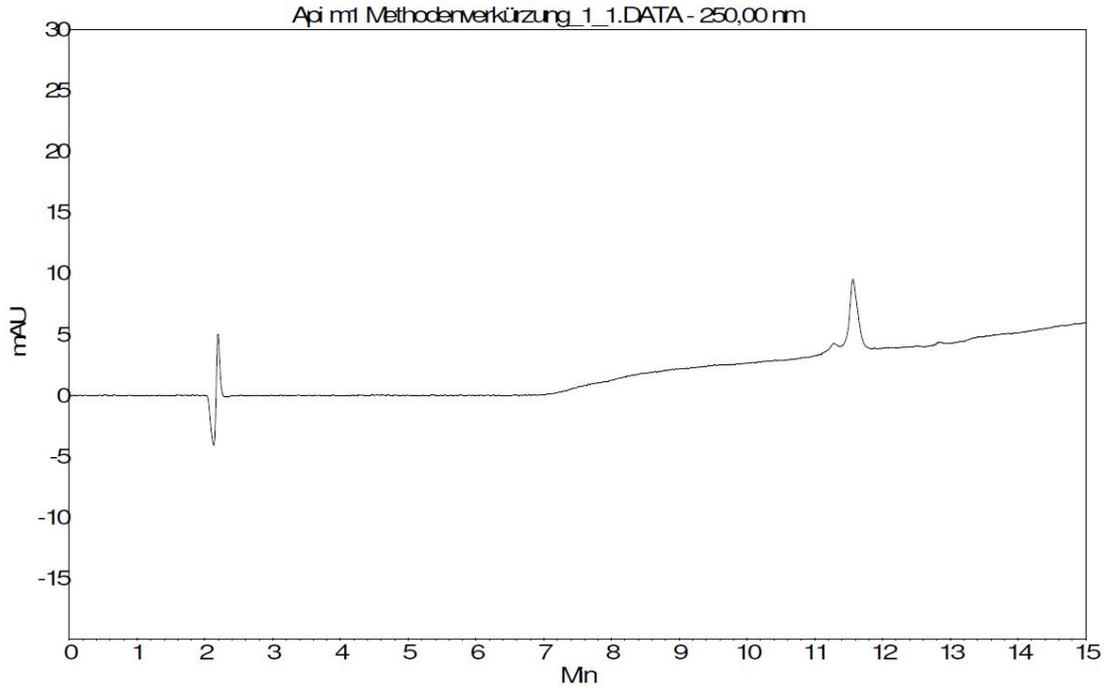


Abbildung 159: Chromatogramm einer Api m 1-haltigen PBS-Lösung (0,1 mg/ml), Wellenlänge = 250 nm, Säule: Phenomenex Jupiter® C18 (300 Å, 5 µm 100x4,6 mm), Temperatur = 25 °C, Absorption in Millivolt (mV), Flussrate = 0,75 ml/min, Eluent A: Acetonitril + 0,1 % TFA, Eluent B: Gereinigtes Wasser + 0,1 % TFA, Gradient (min, %A): (0; 5), (3; 5) (10,5; 52), (15,5; 80), (20; 100), (24; 5), (26; 5)

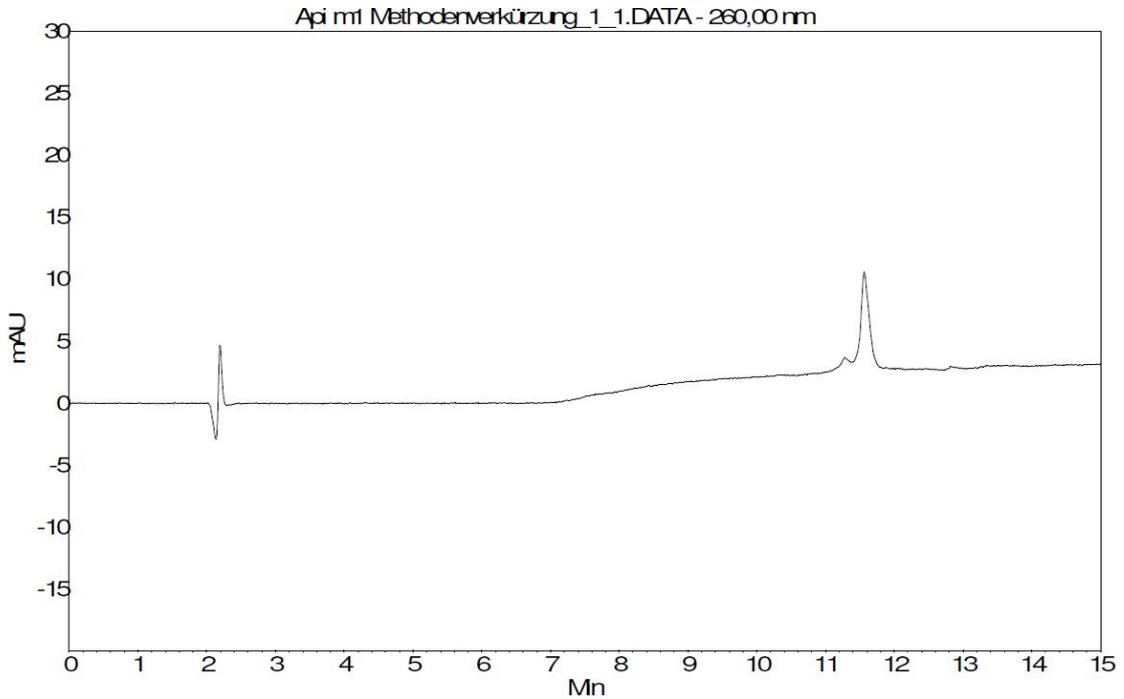


Abbildung 160: Chromatogramm einer Api m 1-haltigen PBS-Lösung (0,1 mg/ml), Wellenlänge = 260 nm, Säule: Phenomenex Jupiter® C18 (300 Å, 5 µm 100x4,6 mm), Temperatur = 25 °C, Absorption in Millivolt (mV), Flussrate = 0,75 ml/min, Eluent A: Acetonitril + 0,1 % TFA, Eluent B: Gereinigtes Wasser + 0,1 % TFA, Gradient (min, %A): (0; 5), (3; 5) (10,5; 52), (15,5; 80), (20; 100), (24; 5), (26; 5)

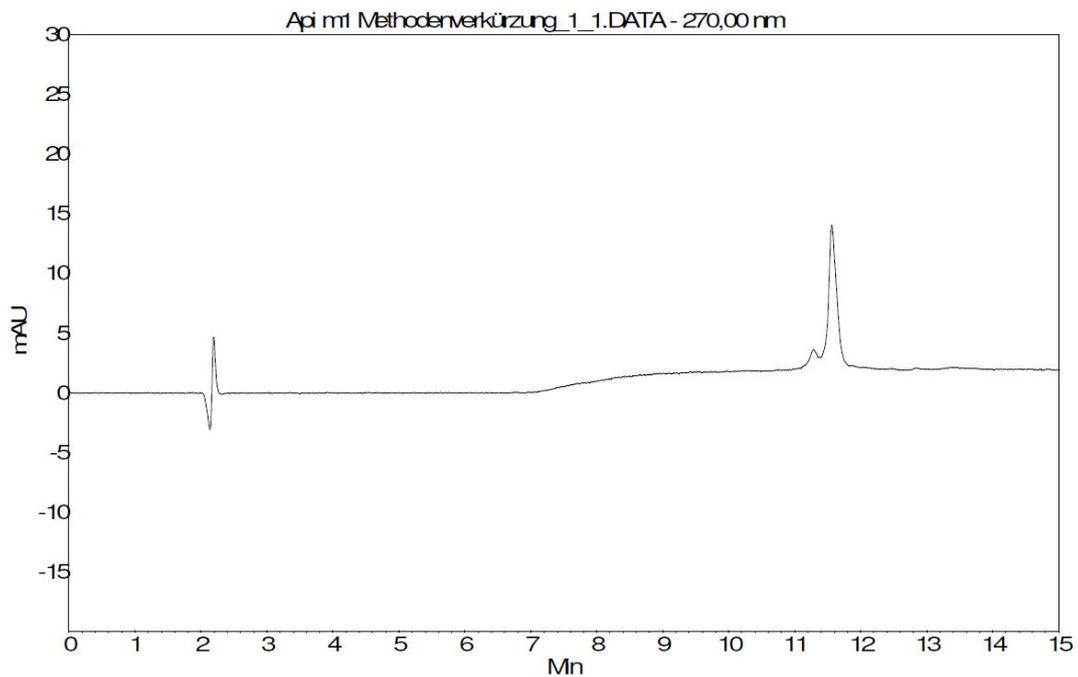


Abbildung 161: Chromatogramm einer Api m 1-haltigen PBS-Lösung (0,1 mg/ml), Wellenlänge = 270 nm, Säule: Phenomenex Jupiter® C18 (300 Å, 5 µm 100x4,6 mm), Temperatur = 25 °C, Absorption in Millivolt (mV), Flussrate = 0,75 ml/min, Eluent A: Acetonitril + 0,1 % TFA, Eluent B: Gereinigtes Wasser + 0,1 % TFA, Gradient (min, %A): (0; 5), (3; 5) (10,5; 52), (15,5; 80), (20; 100), (24; 5), (26; 5)

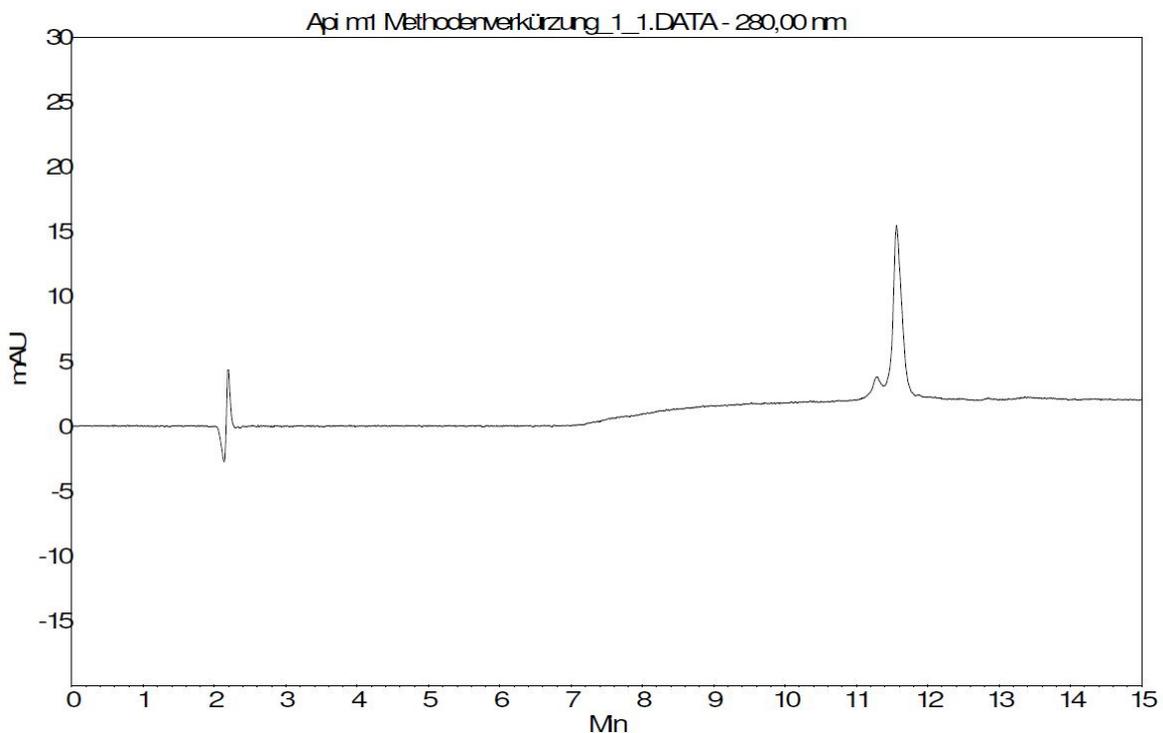


Abbildung 162: Chromatogramm einer Api m 1-haltigen PBS-Lösung (0,1 mg/ml), Wellenlänge = 280 nm, Säule: Phenomenex Jupiter® C18 (300 Å, 5 µm 100x4,6 mm), Temperatur = 25 °C, Absorption in Millivolt (mV), Flussrate = 0,75 ml/min, Eluent A: Acetonitril + 0,1 % TFA, Eluent B: Gereinigtes Wasser + 0,1 % TFA, Gradient (min, %A): (0; 5), (3; 5) (10,5; 52), (15,5; 80), (20; 100), (24; 5), (26; 5)

XVI. Methodenentwicklung der Fällung von Api m 1 mit org. Lösungsmitteln

Tabelle 59: Aufarbeitung von Api m 1 aus Mikroemulsion mit Hilfe von Methanol-Chloroform

Reihenfolge	Anweisung
1	20 µl Api m 1 in Mikroemulsion [1 mg/ml] + 180 µL PBS; 30 Sekunden bei 1800 rpm durchmischen (Vortex-Mischer)
2	600 µl Methanol und 200 µl Chloroform hinzugeben; 30 Sekunden bei 1800 rpm durchmischen (Vortex-Mischer)
3	5 Minuten zentrifugieren (9000 x g; RT); obere Phase verwerfen
4	600 µl Methanol zu Unterphase hinzufügen; 30 Sekunden durchmischen (Vortex-Mischer)
5	5 Minuten zentrifugieren (9000 x g; RT)
6	Überstand verwerfen; Restmethanol abdampfen lassen
7	Solubilisieren des entstandenen Pellets in 500 µl PBS

Tabelle 60: Aufarbeitung vom Api m 1 aus Mikroemulsion mit Hilfe von Aceton (Variante 1)

Reihenfolge	Anweisung
1	20 µl Api m 1 in ME [1 mg/ml] + 200 µl PBS; 30 Sekunden bei 1800 rpm durchmischen (Vortex-Mischer)
2	5 Minuten zentrifugieren (20.000 x g; RT)
3	1 ml Aceton (-20 °C) hinzufügen; durchmischen (Vortex-Mischer)
4	Inkubation bei -20 °C für 1 Stunde
5	5 Minuten zentrifugieren (9000 x g; RT)
6	Überstand verwerfen; 1 ml Aceton (-20 °C) hinzufügen; durchmischen (Vortex-Mischer)
7	5 Minuten zentrifugieren (9000 x g; RT)
8	Überstand verwerfen; Restaceton abdampfen lassen
9	Solubilisieren des entstandenen Pellets in 500 µl PBS

Tabelle 61: Aufarbeitung vom Api m 1 aus Mikroemulsion mit Hilfe von Aceton (Variante 2)

Reihenfolge	Anweisung
1	20 µl Api m 1 in ME [1 mg/ml]+ 150 µl PBS und 50 µl Ameisensäure; 30 s bei 1800 rpm durchmischen (Vortex-Mischer)
2	5 Minuten zentrifugieren (20.000 x g; RT)
3	1 ml Aceton (-20 °C) hinzufügen; durchmischen (Vortex-Mischer)
4	Inkubation bei -20 °C für 1 Stunde
5	5 Minuten zentrifugieren (9000 x g; RT)
6	Überstand verwerfen; 1 ml Aceton (-20 °C) hinzufügen; durchmischen (Vortex-Mischer)
7	5 Minuten zentrifugieren (9000 x g; RT)
8	Überstand verwerfen; Restaceton abdampfen lassen
9	Solubilisieren des entstandenen Pellets in 500 µl PBS

Tabelle 62: Aufarbeitung von Api m 1 aus Mikroemulsion mit Hilfe von Aceton (Untersuchung des pH-Einfluss)

Reihenfolge	Anweisung
1	20 µl Api m 1 in ME [1 mg/ml] + 200 µl PBS + 5 µl Ameisensäure (85 %), bzw. 5 µl Ammoniak (25 %); 30 Sekunden bei 1800 rpm durchmischen (Vortex-Mischer)
2	5 Minuten zentrifugieren (20.000 x g; RT)
3	1 ml Aceton (-20 °C) hinzufügen; durchmischen (Vortex-Mischer)
4	Inkubation bei -20 °C für 1 Stunde
5	5 Minuten zentrifugieren (9000 x g; RT)
6	Überstand verwerfen; 1 ml Aceton (-20 °C) hinzufügen; durchmischen (Vortex-Mischer)
7	5 Minuten zentrifugieren (9000 x g; RT)
8	Überstand verwerfen; Restaceton abdampfen lassen
9	Solubilisieren des entstandenen Pellets in 500 µl PBS

Tabelle 63: Aufarbeitung von Api m 1 aus Mikroemulsion mit Hilfe von Aceton (Untersuchung des Konzentrationseinfluss der Stammlösung mit 0,625 mg/ml)

Reihenfolge	Anweisung
1	32 µl Api m 1 in ME [0,625 mg/ml] + 320 µl PBS + 8 µl Ameisensäure (85 %) 30 Sekunden bei 1800 rpm durchmischen (Vortex-Mischer)
2	5 Minuten zentrifugieren (20.000 x g; RT)
3	1 ml Aceton (-20 °C) hinzufügen; durchmischen (Vortex-Mischer)
4	Inkubation bei -20 °C für 1 Stunde
5	5 Minuten zentrifugieren (9000 x g; RT)
6	Überstand verwerfen; 1 ml Aceton (-20 °C) hinzufügen; durchmischen (Vortex-Mischer)
7	5 Minuten zentrifugieren (9000 x g; RT)
8	Überstand verwerfen; Restaceton abdampfen lassen
9	Solubilisieren des entstandenen Pellets in 500 µl PBS

Tabelle 64: Aufarbeitung von Api m 1 aus Mikroemulsion mit Hilfe von Aceton (Untersuchung des Konzentrationseinfluss der Stammlösung mit 0,25 mg/ml)

Reihenfolge	Anweisung
1	20 µl Api m 1 in ME [0,25 mg/ml] + 200 µl PBS + 8 µl Ameisensäure (85 %) 30 Sekunden bei 1800 rpm durchmischen (Vortex-Mischer)
2	5 Minuten zentrifugieren (20.000 x g; RT)
3	1 ml Aceton (-20 °C) hinzufügen; durchmischen (Vortex-Mischer)
4	Inkubation bei -20 °C für 1 Stunde
5	5 Minuten zentrifugieren (9000 x g; RT)
6	Überstand verwerfen; 1 ml Aceton (-20 °C) hinzufügen; durchmischen (Vortex-Mischer)
7	5 Minuten zentrifugieren (9000 x g; RT)
8	Überstand verwerfen; Restaceton abdampfen lassen
9	Solubilisieren des entstandenen Pellets in 125 µl PBS

XVII. Kalibriergerade von Api m 1

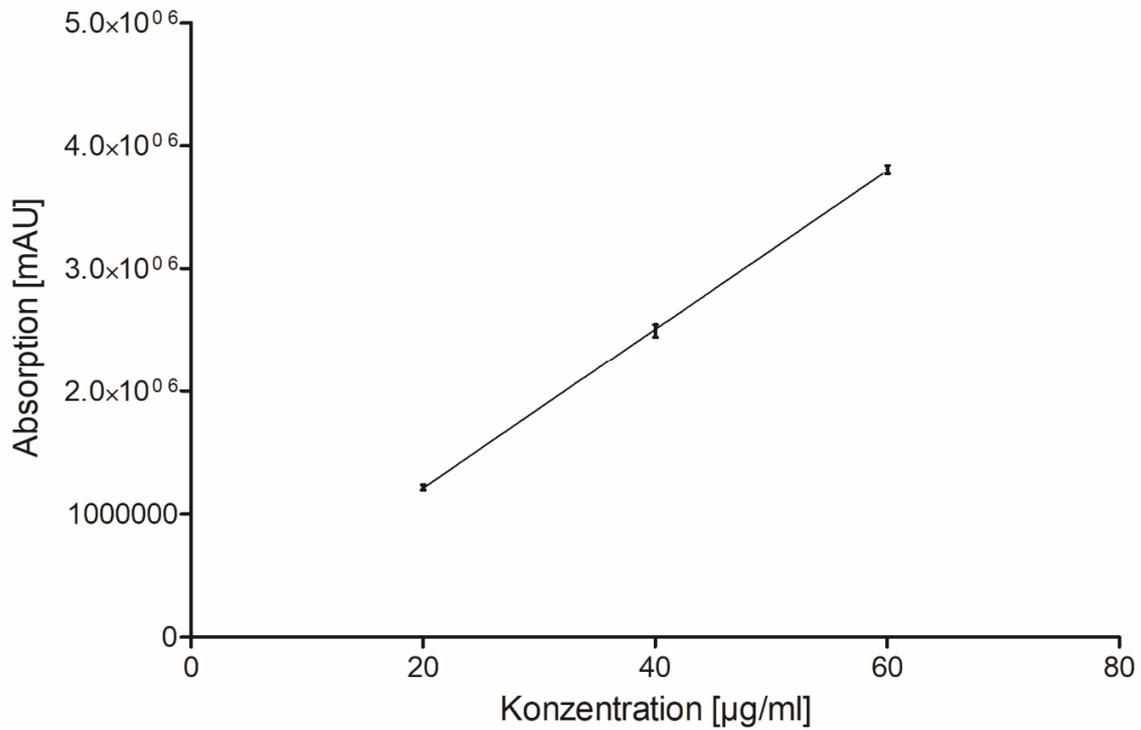


Abbildung 163: Kalibriergerade von Api m 1 in PBS (MW±SD, n=3); Analysiert mittels HPLC, Säule: Phenomenex Jupiter® C18 (300 Å, 5 µm 100x4,6 mm), Detektionswellenlänge = 220 nm, Temperatur = 25 °C, Absorption in Millivolt (mV), Flussrate = 0,75 ml/min, Eluent A: Acetonitril + 0,1 % TFA, Eluent B: Gereinigtes Wasser + 0,1 % TFA, Gradient (min, %A): (0; 5), (3; 5) (10,5; 52), (15,5; 80), (20; 100), (24; 5), (26; 5), Kalibriergleichung: Absorption = 64771*Konzentration-11741; Bestimmtheitsmaß: R² = 0,9991

XVIII. SDS-PAGE von Stabilitätsproben von Api m 1 in Mikroemulsion

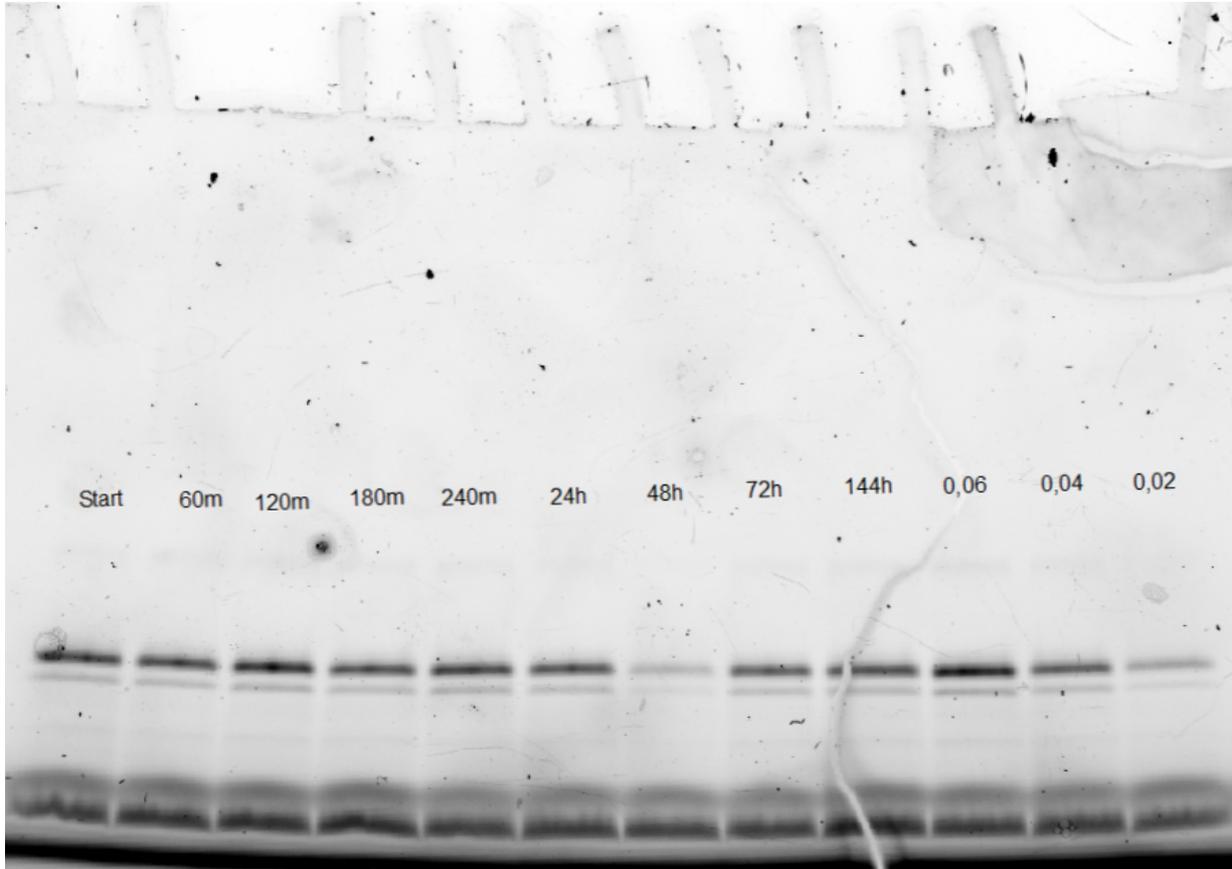


Abbildung 164: SDS-PAGE Analyse von Api m 1 in Mikroemulsion über einen Zeitraum von sechs Tagen (144h), Standards von Api m 1 in PBS (Konzentration 0,06, 0,04 und 0,02 mg/ml)

12 Literaturverzeichnis

- Aboofazeli, R.; Lawrence, C. B.; Wicks, S. R.; Lawrence, M. J. (1994): 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. In: *International Journal of Pharmaceutics* 111 (1), S. 63–72.
- Ahmed, E. M. (2015): Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review. In: *Journal of Advanced Research* 6 (2), S. 105–121.
- Akdis, M.; Verhagen, J.; Taylor, A.; Karamloo, F.; Karagiannidis, C.; Cramer, R. et al. (2004): Immune responses in healthy and allergic individuals are characterized by a fine balance between allergen-specific T regulatory 1 and T helper 2 cells. In: *The Journal of Experimental Medicine* 199 (11), S. 1567–1575.
- Ale, I.; Lachapelle, J.-M.; Maibach, H. I. (2009): Skin tolerability associated with transdermal drug delivery systems: an overview. In: *Advances in Therapy* 26 (10), S. 920–935.
- Alvarez-Román, R.; Naik, A.; Kalia, Y. N.; Fessi, H.; Guy, R. H. (2004): Visualization of skin penetration using confocal laser scanning microscopy. In: *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 58 (2), S. 301–316.
- Arakawa, T.; Timasheff, S. N. (1985): [3]Theory of protein solubility. In: *Methods in Enzymology : Diffraction Methods for Biological Macromolecules Part A*, Bd. 114: Academic Press, S. 49–77.
- Atkinson, P. J.; Grimson, M. J.; Heenan, R. K.; Howe, A. M.; Robinson, B. H. (1989): Structure of microemulsion-based organo-gels. In: *Journal of Chemical Society, Chemical Communications* (23), S. 1807.
- Atkinson, P. J.; Robinson, B. H.; Howe, A. M.; Heenan, R. K. (1991): Structure and stability of microemulsion-based organo-gels. In: *Journal of Chemical Society, Faraday Transactions* 87 (20), S. 3389.
- Augst, A. D.; Kong, H. J.; Mooney, D. J. (2006): Alginate hydrogels as biomaterials. In: *Macromolecular Bioscience* 6 (8), S. 623–633.
- Bachhav, Y. G.; Patravale, V. B. (2009): Microemulsion based vaginal gel of fluconazole: Formulation, in vitro and in vivo evaluation. In: *International Journal of Pharmaceutics* 365 (1), S. 175–179.
- Barichello, J. M.; Morishita, M.; Takayama, K.; Nagai, T. (1999): Absorption of insulin from Pluronic F-127 gels following subcutaneous administration in rats. In: *International Journal of Pharmaceutics* 184 (2), S. 189–198.

Barritault, D.; Expert-Bezancon, A.; Guérin, M. F.; Hayes, D. (1976): The use of acetone precipitation in the isolation of ribosomal proteins. In: *European Journal of Biochemistry* 63 (1), S. 131–135.

Barry, B. W. (1991): Lipid-Protein-Partitioning theory of skin penetration enhancement. In: *Journal of Controlled Release* 15 (3), S. 237–248.

Barry, B. W. (2001): Novel mechanisms and devices to enable successful transdermal drug delivery. In: *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 14 (2), S. 101–114.

Benson, H. A. E. (2005): Transdermal drug delivery: penetration enhancement techniques. In: *Current Drug Delivery* 2 (1), S. 23–33.

Blasko-Begoihn, H.; Farwick, M.; Lersch, P.; MacZkiewitz, U.; Mecking, M.; Scheuermann, R.; Weitemeyer, C. (2006): Topical cosmetic formulations for regulating and improving the moisture content of the skin: Google Patents.

Bødtger, U.; Poulsen, L. K.; Jacobi, H. H.; Malling, H.-J. (2002): The safety and efficacy of subcutaneous birch pollen immunotherapy - a one-year, randomised, double-blind, placebo-controlled study. In: *Allergy* 57 (4), S. 297–305.

Bohn, S.; Bircher, A. J. (2001): Phenoxyethanol-induced urticaria. In: *Allergy* 56 (9), S. 922–923.

Bonifazi, F.; Jutel, M.; Biló, B. M.; Birnbaum, J.; Muller, U. (2005): Prevention and treatment of hymenoptera venom allergy: guidelines for clinical practice. In: *Allergy* 60 (12), S. 1459–1470.

Bonina, F. P.; Montenegro, L.; Scrofani, N.; Esposito, E.; Cortesi, R.; Menegatti, E.; Nastruzzi, C. (1995): Effects of phospholipid based formulations on in vitro and in vivo percutaneous absorption of methyl nicotinate. In: *Journal of Controlled Release* 34 (1), S. 53–63.

Brown, M. B.; Jones, S. A. (2005): Hyaluronic acid: a unique topical vehicle for the localized delivery of drugs to the skin. In: *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology : JEADV* 19 (3), S. 308–318.

Brown, M. B.; Martin, G. P.; Jones, S. A.; Akomeah, F. K. (2006): Dermal and transdermal drug delivery systems: current and future prospects. In: *Drug Delivery* 13 (3), S. 175–187.

Burton, O. T.; Logsdon, S. L.; Zhou, J. S.; Medina-Tamayo, J.; Abdel-Gadir, A.; Rivas, M. N. et al. (2014): Oral immunotherapy induces IgG antibodies that act through FcγRIIb to suppress IgE-mediated hypersensitivity. In: *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 134 (6), 1310-1317. e6.

Caddeo, C.; Manconi, M.; Valenti, D.; Maccioni, A. M.; Fadda, A. M.; Sinico, C. (2012): The Role of Labrasol® in the Enhancement of the Cutaneous Bioavailability of Minoxidil

in Phospholipid Vesicles. In: *Research Journal of Pharmacy and Technology* 5 (12), S. 1563–1569.

Candi, E.; Schmidt, R.; Melino, G. (2005): The cornified envelope: a model of cell death in the skin. In: *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 6 (4), S. 328–340.

Casas, J. A.; Garca-Ochoa, F. (1999): Viscosity of solutions of xanthan/locust bean gum mixtures. In: *Journal of the Science of Food Agriculture*. 79 (1), S. 25–31.

Chang, J. Y.; Oh, Y.-K.; Choi, H.-G.; Kim, Y. B.; Kim, C.-K. (2002): Rheological evaluation of thermosensitive and mucoadhesive vaginal gels in physiological conditions. In: *International Journal of Pharmaceutics* 241 (1), S. 155–163.

Chen, H.; Chang, X.; Du, D.; Li, J.; Xu, H.; Yang, X. (2006): Microemulsion-based hydrogel formulation of ibuprofen for topical delivery. In: *International Journal of Pharmaceutics* 315 (1), S. 52–58.

Cho, K. Y.; Chung, T. W.; Kim, B. C.; Kim, M. K.; Lee, J. H.; Wee, W. R.; Cho, C. S. (2003): Release of ciprofloxacin from poloxamer-graft-hyaluronic acid hydrogels in vitro. In: *International Journal of Pharmaceutics* 260 (1), S. 83–91.

Choi, H.-G.; Jung, J.-H.; Ryu, J.-M.; Yoon, S.-J.; Oh, Y.-K.; Kim, C.-K. (1998): Development of in situ-gelling and mucoadhesive acetaminophen liquid suppository. In: *International Journal of Pharmaceutics* 165 (1), S. 33–44.

Choi, H.-G.; Lee, M.-K.; Kim, M.-H.; Kim, C.-K. (1999): Effect of additives on the physicochemical properties of liquid suppository bases. In: *International Journal of Pharmaceutics* 190 (1), S. 13–19.

Cohn, E. J.; Strong, L. E. (1946): Preparation and properties of serum and plasma proteins; a system for the separation into fractions of the protein and lipoprotein components of biological tissues and fluids. In: *Journal of the American Chemical Society* 68, S. 459–475.

Corrigan, C. J.; Kettner, J.; Doemer, C.; Cromwell, O.; Narkus, A. (2005): Efficacy and safety of preseasonal-specific immunotherapy with an aluminium-adsorbed six-grass pollen allergoid. In: *Allergy* 60 (6), S. 801–807.

Crowell, A. M. J.; Wall, M. J.; Doucette, A. A. (2013): Maximizing recovery of water-soluble proteins through acetone precipitation. In: *Analytica Chimica Acta* 796, S. 48–54.

Danielsson, I.; Lindmann, B. (1981): The definition of microemulsion. In: *Colloids and Surfaces*, S. 391–392.

Dennis, E. A.; Cao, J.; Hsu, Y.-H.; Magrioti, V.; Kokotos, G. (2011): Phospholipase A2 enzymes: physical structure, biological function, disease implication, chemical inhibition, and therapeutic intervention. In: *Chemical Reviews* 111 (10), S. 6130–6185.

Devi, D. R.; Sandhya, P.; Hari, B. VedhaN (2013): Poloxamer: a novel functional molecule for drug delivery and gene therapy. In: *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* 5 (8), S. 159.

Di Meglio, P.; Perera, G. K.; Nestle, F. O. (2011): The Multitasking Organ: Recent Insights into Skin Immune Function. In: *Immunity* 35 (6), S. 857–869.

Diembeck, W.; Beck, H.; Benech-Kieffer, F.; Courtellemont, P.; Dupuis, J.; Lovell, W. et al. (1999): Test guidelines for in vitro assessment of dermal absorption and percutaneous penetration of cosmetic ingredients. In: *Food and Chemical Toxicology* 37 (2-3), S. 191–205.

Dirschka, T.; Lear, J. T. (2014): Sequential treatment of multiple actinic keratoses with solaraze and actikerall. In: *Case Reports in Dermatology* 6 (2), S. 164–168.

Djekic, L.; Primorac, M. (2008): The influence of cosurfactants and oils on the formation of pharmaceutical microemulsions based on PEG-8 caprylic/capric glycerides. In: *International Journal of Pharmaceutics* 352 (1), S. 231–239.

Döring, C. G. (2017): Entwicklung und Optimierung einer Aufarbeitung von Api m 1 aus einer Mikroemulsion. Bachelorthesis. Technische Hochschule Mittelhessen, Gießen.

Dreher, F.; Walde, P.; Walther, P.; Wehrli, E. (1997): Interaction of a lecithin microemulsion gel with human stratum corneum and its effect on transdermal transport. In: *Journal of Controlled Release* 45 (2), S. 131–140.

Dumortier, G.; Grossiord, J. L.; Agnely, F.; Chaumeil, J. C. (2006): A Review of Poloxamer 407 Pharmaceutical and Pharmacological Characteristics. In: *Pharmaceutical Research* 23 (12), S. 2709–2728.

Dumortier, G.; Grossiord, J. L.; Zuber, M.; Couarraze, G.; Chaumeil, J. C. (1991): Rheological study of a thermoreversible morphine gel. In: *Drug Development and Industrial Pharmacy* 17 (9), S. 1255–1265.

Effendy, I.; Maibach, H. I. (1995): Surfactants and experimental irritant contact dermatitis. In: *Contact Dermatitis* 33 (4), S. 217–225.

Eisenhardt, M.; Dobler, D.; Schlupp, P.; Schmidts, T.; Salzig, M.; Vilcinskas, A. et al. (2015): Development of an insect metalloproteinase inhibitor drug carrier system for application in chronic wound infections. In: *The Journal of Pharmacy and Pharmacology* 67 (11), S. 1481–1491.

El Maghraby, G. M. (2008): Transdermal delivery of hydrocortisone from eucalyptus oil microemulsion: Effects of cosurfactants. In: *International Journal of Pharmaceutics* 355 (1), S. 285–292.

Epp, A.; Hobusch, J.; Bartsch, Y. C.; Petry, J.; Lilienthal, G.-M.; Koeleman, C. A. M. et al. (2018): Sialylation of IgG antibodies inhibits IgG-mediated allergic reactions. In: *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 141 (1), 399-402.e8.

Escobar-Chávez, J. J.; López-Cervantes, M.; Naik, Aarti; Kalia, Yogeshvar; Quintanar-Guerrero, D.; Ganem-Quintanar, A. (2006): Applications of thermo-reversible pluronic F-127 gels in pharmaceutical formulations. In: *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences* 9 (3), S. 339–358.

Faergemann, J.; Fredriksson, T. (1980): The antimycotic activity in vitro of five diols. In: *Medical Mycology* 18 (4), S. 287–293.

Faergemann, J.; Hedner, T.; Larsson, P. (2005): The in vitro activity of pentane-1, 5-diol against aerobic bacteria. A new antimicrobial agent for topical usage? In: *Acta Dermato-Venereologica* 1 (1), S. 1.

Fan, W.; Kinnunen, T.; Niinimäki, A.; Hannuksela, M. (1991): Skin reactions to glycols used in dermatological and cosmetic vehicles. In: *Dermatitis* 2 (3), S. 181–183.

Feist, P.; Hummon, A. B. (2015): Proteomic challenges: sample preparation techniques for microgram-quantity protein analysis from biological samples. In: *International Journal of Molecular Sciences* 16 (2), S. 3537–3563.

Ferro, M.; Seigneurin-Berny, D.; Rolland, N.; Chapel, A.; Salvi, D.; Garin, J.; Joyard, J. (2000): Organic solvent extraction as a versatile procedure to identify hydrophobic chloroplast membrane proteins. In: *Electrophoresis* 21 (16), S. 3517–3526.

Ferry, J. D.; Ferry, J. D. (1980): *Viscoelastic properties of polymers*: John Wiley & Sons.

Fouad, S. A.; Basalious, E. B.; El-Nabarawi, M. A.; Tayel, S. A. (2013): Microemulsion and poloxamer microemulsion-based gel for sustained transdermal delivery of diclofenac epolamine using in-skin drug depot: In vitro/in vivo evaluation. In: *International Journal of Pharmaceutics* 453 (2), S. 569–578.

Fritsch, P. (2004): *Dermatologie Venerologie. • Grundlagen • Klinik • Atlas*. Berlin, Heidelberg, s.l.: Springer Berlin Heidelberg (Springer Lehrbuch).

Fritsch, P.; Schwarz, T. (2018): *Dermatologie Venerologie. Grundlagen. Klinik. Atlas. 3. vollständig überarbeitete Auflage*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.

Fujii, K.; Kawata, M.; Kobayashi, Y.; Okamoto, A.; Nishinari, K. (1996): Effects of the addition of hyaluronate segments with different chain lengths on the viscoelasticity of hyaluronic acid solutions. In: *Biopolymers* 38 (5), S. 583–591.

Ganji, F.; Vasheghani, F. S.; Vasheghani, F. E. (2010): Theoretical description of hydrogel swelling: a review. In: *Iranian Polymer Journal* 19 (5), S. 375–398.

Gannu, R.; Palem, C. R.; Yamsani, V. V.; Yamsani, S. K.; Yamsani, M. R. (2010): Enhanced bioavailability of lacidipine via microemulsion based transdermal gels: Formulation optimization, ex vivo and in vivo characterization. In: *International Journal of Pharmaceutics* 388 (1), S. 231–241.

García-Ochoa, F.; Casas, J.A. (1994): Apparent yield stress in xanthan gum solutions at low concentrations. In: *The Chemical Engineering Journal and the Biochemical Engineering Journal* 53 (3), B41-B46.

Gibbs, D. A.; Merrill, E. W.; Smith, K. A.; Balazs, E. A. (1968): Rheology of hyaluronic acid. In: *Biopolymers* 6 (6), S. 777–791.

Glenn, G. M.; Kenney, R. T. (2006): Mass Vaccination: Solutions in the Skin. In: Stanley A. Plotkin (Hg.): *Mass Vaccination: Global Aspects - Progress and Obstacles*. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag Berlin Heidelberg (Current Topics in Microbiology and Immunology, 304), S. 247–268.

Goebeler, M.; Hamm, H. (Hg.) (2017): *Basiswissen Dermatologie*. Berlin, Heidelberg, s.l.: Springer Berlin Heidelberg (Springer-Lehrbuch).

González, N.; Sumano, H. (2007): Design of two liquid Ibuprofen-poloxamer-limonene or menthol preparations for dermal administration. In: *Drug Delivery* 14 (5), S. 287–293.

Grampurohit, N.; Ravikumar, P.; Mallya, R. (2011): Microemulsions for topical use—a review. In: *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research* 45 (1), S. 100–107.

Gribbon, P.; Heng, B. C.; Hardingham, T. E. (2000): The analysis of intermolecular interactions in concentrated hyaluronan solutions suggest no evidence for chain–chain association. In: *Biochemical Journal* 350 (1), S. 329–335.

Gulrez, S. K. H.; Al-Assaf, S.; Phillips, G. O. (2011): Hydrogels: methods of preparation, characterisation and applications. In: *Progress in Molecular and Environmental Bioengineering - From Analysis and Modeling to Technology Applications*, S. 117–150.

Guo, P.; Li, N.; Fan, L.; Lu, J.; Liu, B.; Zhang, B. et al. (2019): Study of penetration mechanism of labrasol on rabbit cornea by Ussing chamber, RT-PCR assay, Western blot and immunohistochemistry. In: *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences* 14 (3), S. 329–339.

Hadgraft, J. (1979): The epidermal reservoir; A theoretical approach. In: *International Journal of Pharmaceutics* 2 (5), S. 265–274.

Hadgraft, J. (2001): Skin, the final frontier. In: *International Journal of Pharmaceutics* 224 (1-2), S. 1–18.

Hadgraft, Jonathan; Guy, Richard H. (2003): *Transdermal drug delivery systems: revised and expanded*: CRC Press.

Haghi, G.; Hatami, A.; Mehran, M. (2013): Qualitative and quantitative evaluation of melittin in honeybee venom and drug products containing honeybee venom. In: *Journal of Apicultural Science* 57 (2), S. 37–44.

Hajjar, B.; Zier, K.-I.; Khalid, N.; Azarmi, S.; Löbenberg, R. (2018): Evaluation of a microemulsion-based gel formulation for topical drug delivery of diclofenac sodium. In: *Journal of Pharmaceutical Investigation* 48 (3), S. 351–362.

Hathout, R. M.; Nasr, M. (2013): Transdermal delivery of betahistine hydrochloride using microemulsions: Physical characterization, biophysical assessment, confocal imaging and permeation studies. In: *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 110, S. 254–260.

Hirshkowitz, M.; Whiton, K.; Albert, S. M.; Alessi, C.; Bruni, O.; DonCarlos, L. et al. (2015): National Sleep Foundation's sleep time duration recommendations: methodology and results summary. In: *Sleep Health* 1 (1), S. 40–43.

Hoar, T. P.; Schulmann, J. H. (1943): Transparent Water-in-Oil Dispersions: the Oleopathic Hydro-Micelle. In: *Nature* 152 (3847), S. 102–103.

Hoffman, A. S. (2012): Hydrogels for biomedical applications. In: *Advanced Drug Delivery Reviews* 64, S. 18–23.

Hoffman, D. R. (2006): Hymenoptera venom allergens. In: *Clinical Reviews in Allergy & Immunology* 30 (2), S. 109–128.

Hoppel, M.; Ettl, H.; Holper, E.; Valenta, C. (2014): Influence of the composition of monoacyl phosphatidylcholine based microemulsions on the dermal delivery of flufenamic acid. In: *International Journal of Pharmaceutics* 475 (1), S. 156–162.

Hylander, T.; Larsson, O.; Petersson-Westin, U.; Eriksson, M.; Kumlien G., Susanna; W., O.; Cardell, L.-O. (2016): Intralymphatic immunotherapy of pollen-induced rhinoconjunctivitis: a double-blind placebo-controlled trial. In: *Respiratory Research* 17 (1), S. 10.

ICH Guideline (2003): Stability testing of new drug substances and products. In: *Q1A (R2), current step 4*, S. 1–24.

ISO 22412 (2008): Particle Size Analysis–Dynamic Light Scattering (DLS): International Organization for Standardization Geneva.

Ita, K. (2017): Progress in the use of microemulsions for transdermal and dermal drug delivery. In: *Pharmaceutical Development and Technology* 22 (4), S. 467–475.

Jones, M. N. (1992): Surfactant interactions with biomembranes and proteins. In: *Chemical Society Reviews* 21 (2), S. 127–136.

Jones, S. M.; Burks, A. W.; Dupont, C. (2014): State of the art on food allergen immunotherapy. Oral, sublingual, and epicutaneous. In: *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 133 (2), S. 318–323.

Jones, S. M.; Sicherer, S. H.; Burks, A. W.; Leung, D. Y. M.; Lindblad, R. W.; Dawson, P. et al. (2017): Epicutaneous immunotherapy for the treatment of peanut allergy in children and young adults. In: *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 139 (4), 1242-1252. e9.

- Jutel, M.; Akdis, M.; Budak, F.; Aebischer-Casaulta, C.; Wrzyszczyk, M.; Blaser, K.; Akdis, C. A. (2003): IL-10 and TGF-beta cooperate in the regulatory T cell response to mucosal allergens in normal immunity and specific immunotherapy. In: *European Journal of Immunology* 33 (5), S. 1205–1214.
- Kahlweit, M.; Jen, J.; Busse, G. (1992): On the stability of microemulsions. II. In: *The Journal of Chemical Physics* 97 (9), S. 6917–6924.
- Kantaria, S.; Rees, G. D.; Lawrence, M. J. (1999): Gelatin-stabilised microemulsion-based organogels: rheology and application in iontophoretic transdermal drug delivery. In: *Journal of Controlled Release* 60 (2), S. 355–365.
- Karim, S.; Brown, M. B.; Ingham, S.; Martin, G. P.; Marriott, C. (1996): Rheological and molecular weight studies of hyaluronan. In: *European Journal of Pharmaceutical Sciences* Supplement 1; Supplement (4), S175.
- Katakam, M.; Ravis, W. R.; Banga, A. K. (1997): Controlled release of human growth hormone in rats following parenteral administration of poloxamer gels. In: *Journal of Controlled Release* 49 (1), S. 21–26.
- Kerscher, M.; Williams, S.; Trüeb, R. M. (2009): Funktionen und Aufbau der Haut. In: *Dermatokosmetik*, S. 1–26, 2. Auflage, Darmstadt, Steinkopff Verlag, 2008
- Kinnunen, T.; Koskella, M. (1991): Antibacterial and antifungal properties of propylene glycol, hexylene glycol, and 1,3-butylene glycol in vitro. In: *Acta Dermato-Venereologica* 71 (2), S. 148–150.
- Kiselman, C.; Dobler, D.; Schmidts, T.; Eicher, A. C.; Möbs, C.; Pfützner, W.; Runkel, F. (2018): Development of a skin-friendly microemulsion for dermal allergen-specific immunotherapy. In: *International Journal of Pharmaceutics* 550 (1), S. 463–469.
- Kobayashi, Y.; Okamoto, A.; Nishinari, K. (1994): Viscoelasticity of hyaluronic acid with different molecular weights. In: *Biorheology* 31 (3), S. 235–244.
- Kogan, A.; Garti, N. (2006): Microemulsions as transdermal drug delivery vehicles. In: *Advances in Colloid and Interface Science* 123-126, S. 369–385.
- Kokot, Z. J.; Matysiak, J. (2009): Simultaneous Determination of Major Constituents of Honeybee Venom by LC-DAD. In: *Chromatographia* 69 (11), S. 1401–1405.
- Kreilgaard, M. (2002): Influence of microemulsions on cutaneous drug delivery. In: *Advanced Drug Delivery Reviews* 54, S77-S98.
- Kumar, S.; Verma, A. K.; Das, M.; Dwivedi, P. D. (2012): Molecular mechanisms of IgE mediated food allergy. In: *International Immunopharmacology* 13 (4), S. 432–439.
- Kwak, M.-S.; Ahn, H.-J.; Song, K.-W. (2015): Rheological investigation of body cream and body lotion in actual application conditions. In: *Korea-Australia Rheology Journal* 27 (3), S. 241–251.

Lawrence, M. J. (1994): Surfactant systems. Their use in drug delivery. In: *Chemical Society Reviews* 23 (6), S. 417.

Lawrence, M. J.; Rees, G. D. (2012): Microemulsion-based media as novel drug delivery systems. In: *Advanced Drug Delivery Reviews* 64, S. 175–193.

Lee, F.; Chung, J. E.; Kurisawa, M. (2009): An injectable hyaluronic acid-tyramine hydrogel system for protein delivery. In: *Journal of Controlled Release: official journal of the Controlled Release Society* 134 (3), S. 186–193.

Leschke, M. (2006): A multifunctional ingredient for leave on cosmetics. In: *Cosmetic and Science Technology*, S. 186–193.

Lima, P. R. de; Brochetto-Braga, M. R. (2003): Hymenoptera venom review focusing on *Apis mellifera*. In: *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases* 9 (2).

Lopes, L. B. (2014): Overcoming the cutaneous barrier with microemulsions. In: *Pharmaceutics* 6 (1), S. 52–77.

Lottspeich, Friedrich; Engels, Joachim W. (Hg.) (2012): *Bioanalytik*, 3. Auflage, Berlin, Heidelberg: Springer Spektrum, 2012.

Lovell, C. R.; White, I. R.; Boyle, J. (1984): Contact dermatitis from phenoxyethanol in aqueous cream BP. In: *Contact Dermatitis* 11 (3), S. 187.

Luo, Y.; Kirker, K. R.; Prestwich, G. D. (2000): Cross-linked hyaluronic acid hydrogel films: new biomaterials for drug delivery. In: *Journal of Controlled Release* 69 (1), S. 169–184.

Maeder, U.; Bergmann, T.; Beer, S.; Burg, J. M.; Schmidts, T.; Runkel, F.; Fiebich, M. (2012): Spectrally resolved visualization of fluorescent dyes permeating into skin. In: *Imaging, Manipulation, and Analysis of Biomolecules, Cells, and Tissues X. SPIE BiOS*. San Francisco, California, USA, Saturday 21 January 2012: SPIE (SPIE Proceedings), S. 822523.

Maintz, L.; Bussmann, C.; Bieber, T.; Novak, N. (2009): Contribution of histamine metabolism to tachyphylaxis during the buildup phase of rush immunotherapy. In: *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 123 (3), S. 701.

Makatsori, M.; Calderon, M. A. (2014): Anaphylaxis: still a ghost behind allergen immunotherapy. In: *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology* 14 (4), S. 316–322.

Mayol, L.; Quaglia, F.; Borzacchiello, A.; Ambrosio, L.; La Rotonda, M. I. (2008): A novel poloxamers/hyaluronic acid in situ forming hydrogel for drug delivery: rheological, mucoadhesive and in vitro release properties. In: *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 70 (1), S. 199–206.

Mehta, T. (2018): Formulation, Characterization, and Ex vivo Evaluation of Microemulsion Based Gel of Nicotinamide. In: *Asian Journal of Pharmaceutics* 12 (01).

Menon, G. K.; Bommannan, D. B.; Elias, P. M. (1994): High-frequency sonophoresis: permeation pathways and structural basis for enhanced permeability. In: *Skin Pharmacology and Physiology* 7 (3), S. 130–139.

Meyer, B. K.; Ni, A.; Hu, B.; Shi, L. (2007): Antimicrobial preservative use in parenteral products. Past and present. In: *Journal of Pharmaceutical Sciences* 96 (12), S. 3155–3167.

Mezger, T. (2016): Das Rheologie Handbuch. Für Anwender von Rotations- und Oszillations-Rheometern. 5., vollständig überarbeitete Auflage. Hannover: Vincentz (Farbe und Lack Bibliothek), 2016.

Mishra, A.; Panola, R.; Rana, A. C. (2014): Microemulsions: as drug delivery system. In: *International Journal of Innovation Sciences and Reseach* 3 (4), S. 467–474.

Möbs, C.; Müller, J.; Rudzio, A.; Pickert, J.; Blank, S.; Jakob, T. et al. (2015): Decline of Ves v 5-specific blocking capacity in wasp venom-allergic patients after stopping allergen immunotherapy. In: *Allergy* 70 (6), S. 715–719.

Möbs, C.; Slotosch, C.; Löffler, H.; Jakob, T.; Hertl, M.; Pfützner, W. (2010): Birch pollen immunotherapy leads to differential induction of regulatory T cells and delayed helper T cell immune deviation. In: *The Journal of Immunology* 184 (4), S. 2194–2203.

Moll, H. (2013): The immune functions of epidermal Langerhans cells, Reprint der 1. Auflage, Belin, Heidelberg, Springer Science & Business Media, 2013.

Mondoulet, L.; Dioszeghy, V.; Ligouis, M.; Dhelft, V.; Dupont, C.; Benhamou, P.-H. (2010): Epicutaneous immunotherapy on intact skin using a new delivery system in a murine model of allergy. In: *Clinical & Experimental Allergy* 40 (4), S. 659–667.

Mortz, C. G.; Otkjaer, A.; Andersen, K. E. (2009): Allergic contact dermatitis to ethylhexylglycerin and pentylene glycol. In: *Contact Dermatitis* 61 (3), S. 180.

Nagarajan, R.; Ruckenstein, E. (2000): Molecular Theory of Microemulsions. In: *Langmuir* 16 (16), S. 6400–6415.

Niessen, C. M. (2007): Tight Junctions/Adherens Junctions: Basic Structure and Function. In: *Journal of Investigative Dermatology* 127 (11), S. 2525–2532.

Novak, N.; Mete, N.; Bussmann, C.; Maintz, L.; Bieber, T.; Akdis, M. et al. (2012): Early suppression of basophil activation during allergen-specific immunotherapy by histamine receptor 2. In: *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 130 (5), 1153-1158.

Ongpipattanakul, B.; Burnette, R. R.; Potts, R. O.; Francoeur, M. L. (1991): Evidence that oleic acid exists in a separate phase within stratum corneum lipids. In: *Pharmaceutical Research* 8 (3), S. 350–354.

Osborne, D. W.; Ward, A. J.I.; O'Neill, K. J. (1991): Microemulsions as topical drug delivery vehicles: in-vitro transdermal studies of a model hydrophilic drug. In: *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 43 (6), S. 451–454.

Osborne, D. U.; Ward, A. J. I.; O'Neill, K. J. (1988): Microemulsions as topical drug delivery vehicles. I. Characterization of a model system. In: *Drug Development and Industrial Pharmacy* 14 (9), S. 1203–1219.

Otzen, D. (2011): Protein-surfactant interactions: a tale of many states. In: *Biochimica et Biophysica Acta* 1814 (5), S. 562–591.

Ownby, C. L.; Powell, J. R.; Jiang, M.-S.; Fletcher, J. E. (1997): Melittin and phospholipase A2 from bee (*Apis mellifera*) venom cause necrosis of murine skeletal muscle in vivo. In: *Toxicon* 35 (1), S. 67–80.

Pacakova, V.; Štulík, K.; Hau, Pham Thi; Jelinek, I.; Vinš, I.; Sýkora, D. (1995): Comparison of high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis for the determination of some bee venom components. In: *Journal of Chromatography A* 700 (1-2), S. 187–193.

Pande, A. H.; Qin, S.; Nemeč, K. N.; He, X.; Tatulian, S. A. (2006): Isoform-specific membrane insertion of secretory phospholipase A2 and functional implications. In: *Biochemistry* 45 (41), S. 12436–12447.

Patterson, J.; Siew, R.; Herring, S. W.; Lin, A. S. P.; Guldberg, R.; Stayton, P. S. (2010): Hyaluronic acid hydrogels with controlled degradation properties for oriented bone regeneration. In: *Biomaterials* 31 (26), S. 6772–6781.

Peira, E.; Carlotti, M. E.; Trotta, C.; Cavalli, R.; Trotta, M. (2008): Positively charged microemulsions for topical application. In: *International Journal of Pharmaceutics* 346 (1-2), S. 119–123.

Peira, E.; Scolari, P.; Gasco, M. R. (2001): Transdermal permeation of apomorphine through hairless mouse skin from microemulsions. In: *International Journal of Pharmaceutics* 226 (1-2), S. 47–51.

Pfaar, O.; Robinson, D. S.; Sager, A.; Emuzyte, R. (2010): Immunotherapy with depigmented-polymerized mixed tree pollen extract: a clinical trial and responder analysis. In: *Allergy* 65 (12), S. 1614–1621.

Pfaar, O.; Urry, Z.; Robinson, D. S.; Sager, A.; Richards, D.; Hawrylowicz, C. M. et al. (2012): A randomized placebo-controlled trial of rush preseasonal depigmented polymerized grass pollen immunotherapy. In: *Allergy* 67 (2), S. 272–279.

Pfaar, O.; Bachert, C.; Bufe, A.; Buhl, R.; Ebner, C.; Eng, P. et al. (2014): Leitlinie zur (allergen-) spezifischen Immuntherapie bei IgE-vermittelten allergischen Erkrankungen. In: *Allergo J* 23 (8), S. 28–67.

Pfützner, W. (2016): Allergenspezifische Immuntherapie: Aktueller Stand sowie neue Erkenntnisse und Entwicklungen. In: *Aktuelle Dermatologie* 42 (11), S. 454–465.

- Pillai, O.; Panchagnula, R. (2003): Transdermal delivery of insulin from poloxamer gel: ex vivo and in vivo skin permeation studies in rat using iontophoresis and chemical enhancers. In: *Journal of Controlled Release* 89 (1), S. 127–140.
- Prasad, Y. V. R.; Puthli, S. P.; Eaimtrakarn, S.; Ishida, M.; Yoshikawa, Y.; Shibata, N.; Takada, K. (2003): Enhanced intestinal absorption of vancomycin with Labrasol and d- α -tocopheryl PEG 1000 succinate in rats. In: *International Journal of Pharmaceutics* 250 (1), S. 181–190.
- Prausnitz, M. R.; Langer, R. (2008): Transdermal drug delivery. In: *Nature Biotechnology* 26 (11), S. 1261–1268.
- Prausnitz, M. R.; Mitragotri, S.; Langer, R. (2004): Current status and future potential of transdermal drug delivery. In: *Nature Reviews Drug Discovery* 3 (2), S. 115.
- Price, R. D.; Berry, M. G.; Navsaria, H. A. (2007): Hyaluronic acid: the scientific and clinical evidence. In: *Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery* 60 (10), S. 1110–1119.
- Proksch, E.; Brandner, J. M.; Jensen, J.-M. (2008): The skin: an indispensable barrier. In: *Experimental Dermatology* 17 (12), S. 1063–1072.
- Przybilla, B.; Ruëff, F. (2010): Hymenoptera venom allergy. In: *JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft* 8 (2), S. 114–129.
- Przybilla, Bernhard; Ruëff, F.; Walker, A.; R  wer, H.-C.; Aberer, W.; Bauer, C. P. et al. (2011): Diagnose und Therapie der Bienen- und Wespengiftallergie. In: *Allergo Journal* 20 (6), S. 318–339.
- Qiu, B.; Stefanos, S.; Ma, J.; Laloo, A.; Perry, B. A.; Leibowitz, M. J. et al. (2003): A hydrogel prepared by in situ cross-linking of a thiol-containing poly (ethylene glycol)-based copolymer: a new biomaterial for protein drug delivery. In: *Biomaterials* 24 (1), S. 11–18.
- Rhee, Y.-S.; Choi, J.-G.; Park, E.-S.; Chi, S.-C. (2001): Transdermal delivery of ketoprofen using microemulsions. In: *International Journal of Pharmaceutics* 228 (1-2), S. 161–170.
- Riess, J. G.; Krafft, M. P. (1997): Advanced fluorocarbon-based systems for oxygen and drug delivery, and diagnosis. In: *Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology* 25 (1-2), S. 43–52.
- Ring, J.; Beyer, K.; Biedermann, T.; Bircher, A.; Duda, D.; Fischer, J. et al. (2014): Leitlinie zu Akuttherapie und Management der Anaphylaxie. In: *Allergo Journal* 23 (3), S. 36–54.
- Robertson, O. H.; Appel, E. M.; Puck, T. T.; Lemon, H. M.; Ritter, M. H. (1948): A study of the bactericidal activity in vitro of certain glycols and closely related compounds. In: *The Journal of Infectious Diseases*, S. 124–137.
- Romani, N.; Holzmann, S.; Tripp, C. H.; Koch, F.; Stoitzner, P. (2003): Langerhans cells - dendritic cells of the epidermis. In: *Journal of Pathology, Microbiology and Immunologie* 111 (7-8), S. 725–740.

Romani, N.; Ratzinger, G.; Pfaller, K.; Salvenmoser, W.; Stössel, H.; Koch, F.; Stoitzner, P. (2001): Migration of dendritic cells into lymphatics—the Langerhans cell example: routes, regulation, and relevance. In: *International Review of Cytology*, Bd. 207: Elsevier, S. 237–270.

Rosiak, J. M.; Yoshii, F. (1999): Hydrogels and their medical applications. In: *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms* 151 (1-4), S. 56–64.

Ruckenstein, E.; Chi, J. C. (1975): Stability of microemulsions. In: *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 2* 71, S. 1690.

Rybak-Chmielewska, H.; Szczêsna, T. (2004): HPLC study of chemical composition of honeybee (*Apis mellifera* L.) venom. In: *Journal of Apicultural Science* 48 (2), S. 103–109.

Sahin, H.; Ozdemir, F. (2004): Effect of some hydrocolloids on the rheological properties of different formulated ketchups. In: *Food Hydrocolloids* 18 (6), S. 1015–1022.

Sandri, G.; Rossi, S.; Ferrari, F.; Bonferoni, M. C.; Zerrouk, N.; Caramella, C. (2004): Mucoadhesive and penetration enhancement properties of three grades of hyaluronic acid using porcine buccal and vaginal tissue, Caco-2 cell lines, and rat jejunum. In: *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 56 (9), S. 1083–1090.

Schäfer, T. (2009): Epidemiologie der Insektengiftallergie. In: *Allergo Journal* 18 (5), S. 353–358.

Schiebler, T. H.; Korf, H.-W. (2007): Anatomie: Histologie, Entwicklungsgeschichte, makroskopische und mikroskopische Anatomie, Topographie, 10. Auflage, Darmstadt, Steinkopff, 2017.

Schmalfuss, U.; Neubert, R.; Wohlrab, W. (1997): Modification of drug penetration into human skin using microemulsions. In: *Journal of Controlled Release* 46 (3), S. 279–285.

Schmidts, T.; Nocker, P.; Lavi, G.; Kuhlmann, J.; Czermak, P.; Runkel, F. (2009): Development of an alternative, time and cost saving method of creating pseudoternary diagrams using the example of a microemulsion. In: *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 340 (1-3), S. 187–192.

Schmolka, I. R. (1972): Artificial skin I. Preparation and properties of pluronic F-127 gels for treatment of burns. In: *Journal of Biomedical Materials Research* 6 (6), S. 571–582.

Schulman, J. H.; Stoeckenius, W.; Prince, L. M. (1959): Mechanism of formation and structure of micro emulsions by electron microscopy. In: *The Journal of Physical Chemistry* 63 (10), S. 1677–1680.

Schulten, V.; Tripple, V.; Aasbjerg, K.; Backer, V.; Lund, G.; Würtzen, P. A. et al. (2016): Distinct modulation of allergic T cell responses by subcutaneous vs. sublingual allergen-specific immunotherapy. In: *Clinical & Experimental Allergy* 46 (3), S. 439–448.

- Schuppe, M.; Kiselmann, C., Dobler, D.; Wacker, A.; Schmidt, O.; Runkel, F. et al. (2018): Epidermal allergen-specific immunotherapy in an Api m1-allergic mouse model (Abstract). In: *Allergo journal international* 27 (1), S. 25–39.
- Scriven, L. E. (1976): Equilibrium bicontinuous structure. In: *Nature* 263 (5573), S. 123–125.
- Senti, G.; Moos, S. von; Tay, F.; Graf, N.; Johansen, P.; Kündig, T. M. (2015): Determinants of efficacy and safety in epicutaneous allergen immunotherapy: summary of three clinical trials. In: *Allergy* 70 (6), S. 707–710.
- Senti, G.; Johansen, P.; Kündig, T. M. (2009): Intralymphatic immunotherapy. In: *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology* 9 (6), S. 537–543.
- Senti, G.; Moos, S. von; Tay, F.; Graf, N.; Sonderegger, T.; Johansen, P.; Kündig, T. M. (2012): Epicutaneous allergen-specific immunotherapy ameliorates grass pollen-induced rhinoconjunctivitis: A double-blind, placebo-controlled dose escalation study. In: *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 129 (1), S. 128–135.
- Seo, H. J.; Kim, J.-C. (2012): Effects of additives on phase transitions of Poloxamer 407/Poloxamer 188 mixture and release property of monoolein cubic phase containing the poloxamers. In: *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* 18 (1), S. 88–91.
- Seok, S. H.; Lee, S.-A.; Park, E.-S. (2018): Formulation of a microemulsion-based hydrogel containing celecoxib. In: *Journal of Drug Delivery Science and Technology* 43, S. 409–414.
- Seweryn, A. (2018): Interactions between surfactants and the skin - Theory and practice. In: *Advances in Colloid and Interface Science* 256, S. 242–255.
- Shafiq-un-Nabi, S.; Shakeel, F.; Talegaonkar, S.; Ali, J.; Baboota, S.; Ahuja, A. et al. (2007): Formulation development and optimization using nanoemulsion technique: a technical note. In: *American Association of Pharmaceutical Sciences PharmSciTech* 8 (2), E12-E17.
- Shamji, M. H.; Durham, S. R. (2011): Mechanisms of immunotherapy to aeroallergens. In: *Clinical & Experimental Allergy* 41 (9), S. 1235–1246.
- Shamji, M. H.; Durham, S. R. (2017): Mechanisms of allergen immunotherapy for inhaled allergens and predictive biomarkers. In: *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 140 (6), S. 1485–1498.
- Shawesh, A.; Kallioinen, S.; Antikainen, O.; Yliruusi, J. (2002): Influence of storage time and temperature on the stability of indomethacin Pluronic F-127 gels. In: *Die Pharmazie* 57 (10), S. 690–694.
- Sintov, A. C. (2015): Transdermal delivery of curcumin via microemulsion. In: *International Journal of Pharmaceutics* 481 (1-2), S. 97–103.

Sintov, A. C.; Greenberg, I. (2014): Comparative percutaneous permeation study using caffeine-loaded microemulsion showing low reliability of the frozen/thawed skin models. In: *International Journal of Pharmaceutics* 471 (1), S. 516–524.

Siqueira Leite, C. B.; Coelho, J. M.; Muehlmann, L. A.; Azevedo, R. B.; Sousa, M. H. (2018): Microemulsions as Platforms for Transdermal Delivery of Hydrophilic Drugs-A Review. In: *Current Nanoscience* 14 (3), S. 170–178.

Soni, M. G.; Carabin, I. G.; Burdock, G. A. (2005): Safety assessment of esters of p-hydroxybenzoic acid (parabens). In: *Food and Chemical Toxicology* 43 (7), S. 985–1015.

Spornitz, U. M. (2002): Anatomie und Physiologie. Lehrbuch und Atlas für Pflege- und Gesundheitsberufe. 3., vollständig überarbeitete Auflage. Berlin, Heidelberg, s.l.: Springer Berlin Heidelberg, 2002.

Stoffels, K. M. (2012): Modern and safe antimicrobial stabilization of cosmetic products. In: *Household & Personal Care Today* 7, S. 18–21.

Stratton, L. P.; Dong, A.; Manning, M. C.; Carpenter, J. F. (1997): Drug delivery matrix containing native protein precipitates suspended in a poloxamer gel. In: *Journal of Pharmaceutical Sciences* 86 (9), S. 1006–1010.

Sturm, G. J.; Varga, E.-M.; Roberts, G.; Mosbech, H.; Bilò, M. B.; Akdis, C. A. et al. (2018): EAACI guidelines on allergen immunotherapy. Hymenoptera venom allergy. In: *Allergy* 73 (4), S. 744–764.

Swiderek, K. M.; Klein, M. L.; Hefta, S. A.; Shively, J. E. (1995): Strategies for the removal of ionic and non-ionic detergents from protein and peptide mixtures for on-and off-line liquid chromatography mass spectrometry (LCMS). In: *Techniques in Protein Chemistry*, Bd. 6: Elsevier, S. 267–275.

Szókán, G.; Horvath, J.; Almas, M.; Saftics, G. Y.; Palocz, A. (1994): Liquid chromatographic analysis and separation of polypeptide components from honey bee venoms. In: *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* 17 (16), S. 3333–3349.

Tadros, T. F. (2013): Emulsion formation and stability. 1. Auflage, Weinheim:John Wiley & Sons, 2013.

Tashtoush, B. M.; Bennamani, A. N.; Al-Taani, B. M. (2013): Preparation and characterization of microemulsion formulations of nicotinic acid and its prodrugs for transdermal delivery. In: *Pharmaceutical Development and Technology* 18 (4), S. 834–843.

Thews, G.; Mutschler, E.; Vaupel, P.; Schaible, H.-G. (1999): Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen, 5. Auflage. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart, 1999.

- Todosijević, M. N.; Savić, M. M.; Batinić, B. B.; Marković, B. D.; Gašperlin, M.; Randelović, Danijela V. et al. (2015): Biocompatible microemulsions of a model NSAID for skin delivery: A decisive role of surfactants in skin penetration/irritation profiles and pharmacokinetic performance. In: *International Journal of Pharmaceutics* 496 (2), S. 931–941.
- Tokita, Y.; Okamoto, A. (1995): Hydrolytic degradation of hyaluronic acid. In: *Polymer Degradation and Stability* 48 (2), S. 269–273.
- Tokita, Y.; Okamoto, A. (1996): Degradation of hyaluronic acid—Kinetic study and thermodynamics. In: *European Polymer Journal* 32 (8), S. 1011–1014.
- Trotta, M.; Gasco; Caputo, O.; Sancin, P. (1994): Transcutaneous diffusion of haematoporphyrin in photodynamic therapy in vitro release from microemulsions. In: *STP Pharma Sciences* 4 (2), S. 150–154.
- Trotta, M.; Pattarino, F.; Gasco M. R. (1996): Influence of counter ions on the skin permeation of methotrexate from water-oil microemulsions. In: *Pharmaceutica Acta Helveticae* 71 (2), S. 135–140.
- Trotta, M.; Morel, S.; Gasco, M. R. (1997): Effect of oil phase composition on the skin permeation of felodipine from o/w microemulsions. In: *Die Pharmazie* 52 (1), S. 50–53.
- Tsukita, S.; Furuse, M.; Itoh, M. (2001): Multifunctional strands in tight junctions. In: *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2 (4), S. 285.
- Urlacher, B.; Noble, O. (1997): Xanthan gum. In: Imeson, A. P. (Hg.): *Thickening and Gelling Agents for Food*. 2. Auflage. Boston, MA: Springer US, S. 284–311, 1997.
- Validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1) (2005). International Conference on Harmonization, Geneva, Switzerland.
- van de Veen, W.; Wirz, O. F.; Globinska, A.; Akdis, M. (2017): Novel mechanisms in immune tolerance to allergens during natural allergen exposure and allergen-specific immunotherapy. In: *Current Opinion in Immunology* 48, S. 74–81.
- Voigt, R., Fahr, A. (2010): *Pharmazeutische Technologie: Für Studium und Beruf*, 11. Auflage. Stuttgart: Deutscher Apothekerverlag, 2010.
- Vollmar, A.; Dingermann, T.; Zündorf, I. (2013): *Immunologie. Grundlagen und Wirkstoffe*. 2. Auflage. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart, 2013.
- Vries, J. de (2006): Hydrocolloid gelling agents and their applications. In: Peter A. Williams und Glyn O. Phillips (Hg.): *Gums and stabilisers for the food industry* 13. Cambridge: Royal Society of Chemistry, S. 23–31, 2006.
- Walker, S. M.; Varney, V. A.; Gaga, M.; Jacobson, M. R.; Durham, S. R. (1995): Grass pollen immunotherapy. Efficacy and safety during a 4-year follow-up study. In: *Allergy* 50 (5), S. 405–413.

Wei, G.; Xu, H.; Ding, P. T.; Li, S. M.; Zheng, J. M. (2002): Thermosetting gels with modulated gelation temperature for ophthalmic use: the rheological and gamma scintigraphic studies. In: *Journal of Controlled Release* 83 (1), S. 65–74.

Welsh, E. J.; Rees, D. A.; Morris, E. R.; Madden, J. K. (1980): Competitive inhibition evidence for specific intermolecular interactions in hyaluronate solutions. In: *Journal of Molecular Biology* 138 (2), S. 375–382.

Wennerström, H.; Balogh, J.; Olsson, U. (2006): Interfacial tensions in microemulsions. In: *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 291 (1-3), S. 69–77.

Wikholm, H. A. (2000): Skin care compositions and use. U.S. Patent No. 6,096,326, U.S. Patent and Trademark Office

Williams, A. (2003): Transdermal and topical drug delivery: from theory to clinical practice. London: Pharmaceutical Press London, 2003.

Williams, A. C.; Barry, B. W. (2012): Penetration enhancers. In: *Advanced Drug Delivery Reviews* 64, S. 128–137.

Witten, M.; Malling, H.-J.; Blom, L.; Poulsen, B. C.; Poulsen, L. K. (2013): Is intralymphatic immunotherapy ready for clinical use in patients with grass pollen allergy? In: *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 132 (5), 1248-1252. e5.

Wolowczyk, L. (2018): Rheologische Charakterisierung Hyaluronsäure- und Poloxamer-basierter Hydrogele im Hinblick auf ihre Eignung zur dermalen Applikation. Bachelorthesis. Technische Hochschule Mittelhessen, Gießen.

Xuan, J.-J.; Balakrishnan, P.; Oh, D. H.; Yeo, W. H.; Park, S. M.; Yong, C. S.; Choi, H.-G. (2010): Rheological characterization and in vivo evaluation of thermosensitive poloxamer-based hydrogel for intramuscular injection of piroxicam. In: *International Journal of Pharmaceutics* 395 (1-2), S. 317–323.

Yao, M. L.; Patel, J. C. (2001): Rheological characterization of body lotions. In: *Applied Rheology* 11 (2), S. 70.

Yong, C. S.; Choi, J. S.; Quan, Q.-Z.; Rhee, J.-D.; Kim, C.-K.; Lim, S.-J. et al. (2001): Effect of sodium chloride on the gelation temperature, gel strength and bioadhesive force of poloxamer gels containing diclofenac sodium. In: *International Journal of Pharmaceutics* 226 (1-2), S. 195–205.

Zhang, J.; Michniak-Kohn, B. B. (2018): Investigation of microemulsion and microemulsion gel formulations for dermal delivery of clotrimazole. In: *International Journal of Pharmaceutics* 536 (1), S. 345–352.

Zhang, Y.-T.; Wu, Z.-H.; Zhang, K.; Zhao, J.-H.; Ye, B.-N.; Feng, N.-P. (2014): An In Vitro and In Vivo Comparison of Solid and Liquid–Oil Cores in Transdermal Aconitine Nanocarriers. In: *Journal of Pharmaceutical Sciences* 103 (11), S. 3602–3610.

Zhao, Z.; Ukidve, A.; Dasgupta, A.; Mitragotri, S. (2018): Transdermal immunomodulation: Principles, advances and perspectives. In: *Advanced Drug Delivery Reviews* 127, S. 3–19.

Zielen, S.; Kardos, P.; Madonini, E. (2010): Steroid-sparing effects with allergen-specific immunotherapy in children with asthma: a randomized controlled trial. In: *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 126 (5), S. 942–949.

13 Publikationsliste

Veröffentlichungen in Peer-Reviewed Journals

Kiselmann, C.; Dobler, D.; Schmidts, T.; Eicher, A. C.; Möbs, C.; Pfützner, W.; Runkel, F. (2018): Development of a skin-friendly microemulsion for dermal allergen-specific immunotherapy. In: *International journal of pharmaceutics* 550 (1-2), S. 463–469. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2018.09.002.

Schuppe, M, **Kiselmann, C**, Dobler, D, Wacker, A, Schmidt, O, Runkel, F, Schmidts, F, Pfützner, W, Möbs, C, 2018. Epidermal allergen-specific immunotherapy in an Api m1-allergic mouse model (Abstract). *Allergo journal international* 27 (1), 25–39.

Eicher, Anna-Carola; Dobler, Dorota; **Kiselmann, C.**; Schmidts, Thomas; Runkel, Frank (2019): Dermal delivery of therapeutic DNazymes via chitosan hydrogels. In: *International journal of pharmaceutics* 563, S. 208–216. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2019.04.005.

Pockrandt, D., **Sack, C.**, Kosiol, T., Li, Shu-Ming, 2014. A promiscuous prenyltransferase from *Aspergillus oryzae* catalyses C-prenylations of hydroxynaphthalenes in the presence of different prenyl donors. *Applied Microbiology and Biotechnology* Vol. 98 Number 11 June 2014

Konferenz-Poster

C. Sack, K. Abraham, D. Dobler, T. Schmidts, F. Runkel: Development of drug delivery systems for intradermal application of hymenoptera allergens, FIP Young Scientists Satellite Conference 2017, Uppsala, Schweden and 6th FIP Pharmaceutical Sciences World Congress 2017, Stockholm, Schweden

Pluteanu, F., Wolke, C., Bukowska, A., Kiess, T., Galla, D., Chilukoti, R.K., **Sack, C.**, Ivanova, T., Goette, A., Lendeckel, U., Kockskämper, J, 2013. Augmented endothelin-1 signaling in atrial myocardium from spontaneously hypertensive rats (Poster); DPG Treffen Heidelberg 2013

Pluteanu, F., Heß, J., Kiess, T., **Sack, C.**, Nikonova, Y., Plackic, J., Roderick, H.L., Kockskämper, J., 2012. Calcium Homeostasis in Left Atria of Hypertensive Rats (Poster). Biophysical Society 56th Annual Meeting San Diego, Feb 2012, LB217

Konferenz-Vorträge

C. Kiselmann, T. Schmidts, F. Runkel: Hydrophilic Ionic Liquids as Ingredients in Gel-Based Dermal Formulations, 15th International Conference on Pharmaceutical Formulations & Drug Delivery, Philadelphia, USA

Patentanmeldung

C. Kiselmann, T. Schmidts, F. Runkel, C. Zinecker, C. Möbs, W. Pfützner; „Mikroemulsion zur dermalen Hyposensibilisierung mit Allergenen“, Dokumenten Referenz-Nr. (DRN) 2018060616323200DE, 2018

14 Lebenslauf

Der Lebenslauf wurde aus der elektronischen Version der Arbeit entfernt.

15 Danksagung

Zuallererst möchte ich mich bei Prof Dr. Frank Runkel bedanken, der mich in seine Arbeitsgruppe am Institut für Bioverfahrenstechnik und Pharmazeutische Technologie an der Technischen Hochschule Mittelhessen aufgenommen und mir dieses spannende Thema überlassen hat. Lieber Frank, durch dein mir entgegengebrachtes Vertrauen und die vielen Freiheiten der vergangenen Jahre hast du mit zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen. Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Gerd Hamscher der sich als Zweitgutachter dieser Arbeit zur Verfügung stellte. Auch bei Prof. Dr. Wolfgang Pfützner und Prof. Dr. Cornelia Keck möchte ich mich herzlich für Ihre Teilnahme als Mitglieder der Prüfungskommission bedanken. Ebenso möchte ich mich bei Dr. Thomas Schmidts bedanken, der mir über die Jahre Vorgesetzter und Freund gleichermaßen war. Lieber Thomas, vielen Dank dafür. Ein großer Dank gilt Dr. Christina Zinecker, die mir in allen Belangen des Projektmanagements und der Erstellung wichtiger Zwischenberichte mit großer Geduld geholfen hat. Ein besonderer Dank gilt meiner Betreuerin Dr. Dorota Dobler, die mir über die gesamte Promotionszeit mit pragmatischem Rat und Tat zur Seite stand. Ebenso danke ich ihr für das Korrekturlesen dieser Arbeit. Weiterhin möchte ich Frau Dr. Peggy Schlupp danken, die mich wissenschaftlich und in der Lehre mit Rat und Tat unterstützt hat. Nicht genug danken kann ich meinen Doktorschwestern und –brüdern, vor allem Anna, David und Axel. Ihr habt nicht nur für wissenschaftlichen Austausch und Unterstützung gesorgt, sondern auch für den bei der Arbeit nötigen Spaß und seid mir über die Jahre gute Freunde geworden. Darüber hinaus danke ich allen weiteren Mitarbeitern der AG BPT, Michaela, Mona, Ilona, Sören und Sebastian – es war eine schöne Zeit mit euch. Allen Mitgliedern des Projektteams DitA möchte ich für die gute Zusammenarbeit und den unkomplizierten Wissensaustausch danken. Mein besonderer Dank gilt Kieron, der mich bei allen Fragen zur HPLC-Analytik unterstützte und Lars, der einfach alles weiß. Ich danke euch für die ergebnisreichen und schönen Labortage. Meinen Absolventen, Lisa und Christoph, danke ich für die erworbenen Ergebnisse und die sehr gute Zusammenarbeit.

Mein allergrößter Dank gilt meiner Familie, allen voran meinen Eltern Gabriele und Michael. Ohne eure unermüdliche Unterstützung wäre ich heute weder Apotheker noch wäre diese Arbeit entstanden. Im größten Maße danke ich meiner Ehefrau Irina, die vor allem im letzten Halbjahr meine Launen stoisch ertragen und mich stets unterstützt und wieder aufgebaut hat. Liebe Irina, ich danke dir für alles.