

# Entwicklung von EGF-beladenen Ca-Alginat-Inserten zur kausalen Behandlung des „trockenen“ Auges

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. med.)

der Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen-, Ohrenkrankheiten,

Kopf- und Halschirurgie

der Medizinischen Fakultät der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald

2003



vorgelegt von

Christoph Koelwel

aus Regensburg

2003

Aus der Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen-, Ohrenkrankheiten,  
Kopf- und Halschirurgie  
(Direktor Univ.- Prof. Dr Werner Hosemann)  
der Medizinischen Fakultät der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald

Thema:

Entwicklung von EGF-beladenen Ca-Alginat-Inserten zur kausalen Behandlung  
des „trockenen“ Auges

Inaugural - Dissertation

zur

Erlangung des akademischen

Grades

Doktor der Naturwissenschaften in der Medizin  
(Dr. rer. med.)

der

Medizinischen Fakultät

der

Ernst-Moritz-Arndt-Universität

Greifswald

2003

vorgelegt von:  
Christoph, Koelwel  
geb. am: 15.01.1973  
in: Regensburg

Dekan: Prof. Dr. Heyo K. Kroemer

1. Gutachter: Prof. Dr. Tost

2. Gutachter: Prof. Dr. Göpferich

Ort, Raum: Greifswald, Löfflerstr. 23e, Hörsaal des Institutes für Pathologie

Tag der Disputation: 12. Mai 2003

<b>1. EINLEITUNG.....</b>	<b>3</b>
1.1. KERATOCONJUNCTIVITIS SICCA .....	3
1.2. THERAPIE.....	4
1.2.1. Aktuelle Therapie.....	4
1.2.2. Kausale Therapie mit EGF-Depot-Arzneiformen.....	5
1.3. ZIEL DER ARBEIT.....	6
1.4. EGF.....	7
1.5. ALGINATE.....	10
<b>2. MATERIALIEN UND METHODEN .....</b>	<b>12</b>
2.1. MATERIALIEN .....	12
2.1.1. Alginate .....	12
2.1.2. Cellulose.....	12
2.1.3. Fließmittel für die HPLC-Analytik .....	12
2.1.4. EGF.....	12
2.1.5. Chemikalien.....	13
2.2. METHODEN .....	13
2.2.1. Insertherstellung .....	13
2.2.1.1. Insertherstellung (allgemein) .....	13
2.2.1.2. Herstellung steriler Inserte.....	14
2.2.2. Quervernetzung von Alginaten .....	15
2.2.3. Analytik.....	15
2.2.3.1. Quantitative EGF Bestimmung .....	15
2.2.3.2. HPLC-MS.....	16
2.2.3.3. Gezielte Oxidation von EGF.....	17
2.2.3.4. Trennung von Alginat und EGF.....	17
2.2.4. Adsorption von EGF .....	19
2.2.4.1. Adsorptionsminderung durch Silanisieren.....	19
2.2.4.2. Adsorptionsminderung durch BSA Zugabe.....	20
2.2.5. Stabilität von EGF .....	20
2.2.6. EGF Freisetzung in-vitro .....	22
2.2.7. Parameter der EGF-Freisetzung .....	23
2.2.7.1. Variation der Alginatzusammensetzung.....	23
2.2.7.2. Calciumgehalt des Inserts.....	23
2.2.7.3. Zusatz von Porenbildnern.....	23
2.2.8. In-vitro-Erosion von HEC-Alginat-Inserten.....	24
2.2.9. Insertverträglichkeit und in-vivo-Erosion.....	24
2.2.10. Klinische Pilotstudie mit EGF beladenen Inserten.....	25
2.2.10.1. Teilnahme Kriterien .....	25
2.2.10.2. Studienablauf .....	26
2.2.10.3. Subjektive Bewertungskriterien .....	27
2.2.10.3.1. Visuelle Befindlichkeitsskala .....	27
2.2.10.3.2. Fragebogen.....	27
2.2.10.4. Objektive Bewertungskriterien .....	28
2.2.10.4.1. Veränderungen des Visus.....	28
2.2.10.4.2. Break up time (BUT).....	28
2.2.10.4.3. Schirmer-Test .....	28
2.2.10.4.4. Nebenwirkungen.....	29

<b>3. ERGEBNISSE UND DISKUSSION.....</b>	<b>30</b>
3.1. INSERTHERSTELLUNG .....	30
3.1.1. <i>Quervernetzung von Alginat</i> .....	30
3.2. ANALYTIK VON EGF .....	31
3.2.1. <i>Quantitative und qualitative Analyse durch HPLC</i> .....	31
3.2.2. <i>Quantitative und qualitative Analyse durch HPLC-MS</i> .....	32
3.2.3. <i>Gezielte Oxidation von EGF</i> .....	34
3.2.4. <i>Trennung von EGF und Alginat</i> .....	35
3.3. ADSORPTION VON EGF.....	37
3.3.1. <i>Adsorptionsminderung durch Silanisieren</i> .....	37
3.3.2. <i>Adsorptionsminderung durch BSA Zugabe</i> .....	39
3.4. STABILITÄT VON EGF .....	40
3.5. BEEINFLUSSUNGSMÖGLICHKEITEN DER EGF-FREISETZUNG.....	42
3.5.1. <i>Variation der Alginatzusammensetzung</i> .....	42
3.5.2. <i>Erhöhung des Calciumgehalts im Insert</i> .....	45
3.5.3. <i>Zusatz von Porenbildnern</i> .....	47
3.6. IN-VITRO-EROSION VON HYDROXYETHYLLULOSE-ALGINAT-INSERTEN.....	48
3.7. INSERTVERTRÄGLICHKEIT.....	50
3.8. IN VIVO EROSION VON HEC-ALGINAT-INSERTEN .....	52
3.9. KLINISCHE PILOTSTUDIE MIT EGF BELADENEN INSERTEN .....	53
3.9.1. <i>Subjektive Bewertungskriterin</i> .....	53
3.9.1.1. <i>Visuelle Befindlichkeitsskala</i> .....	53
3.9.1.2. <i>Fragebogen</i> .....	54
3.9.2. <i>Objektive Bewertungskriterien</i> .....	56
3.9.2.1. <i>Break up time (BUT)</i> .....	56
3.9.2.2. <i>Schirmertest</i> .....	56
3.9.2.3. <i>Veränderungen des Visus</i> .....	57
3.9.2.4. <i>Nebenwirkungen</i> .....	57
3.9.3. <i>Beurteilung</i> .....	57
3.9.4. <i>Befundbesserung durch EGF</i> .....	57
<b>4. ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>59</b>
<b>5. LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>61</b>

### 1 Einleitung

#### 1.1 Keratoconjunctivitis sicca

Keratoconjunctivitis sicca („trockenes Auge“) ist eine Erkrankung, deren Häufigkeit in den letzten Jahren deutlich zugenommen hat. Bei ca. 20% der Gesamtbevölkerung wird ein trockenes Auge diagnostiziert, wobei allein in Deutschland ca. 25 Millionen Menschen von dieser Erkrankung betroffen sind [1]. Die Lebensqualität der Betroffenen ist durch subjektive Symptome wie „Brennen“, „Kratzen“, „Fremdkörpergefühl“, „Rötung der Augen“ und „Visusminderung“ zum Teil erheblich eingeschränkt. In schweren Fällen kann die Hornhaut ulzerieren und perforieren und damit zur Erblindung führen [2] (Abb. 1).

Die Bezeichnung „Trockenes Auge“ ist ein historischer Begriff, der sich für einen sehr komplexen Krankheitsprozeß der Augenoberfläche eingebürgert hat. Fälschlicherweise wird auch heute noch oft die Meinung vertreten, die Erkrankung beruhe lediglich auf einer Austrocknung der Hornhautoberfläche durch mangelnde Tränenproduktion. Diese Vorstellung trifft jedoch nicht zu. Beim „Trockenen Auge“ handelt es sich vielmehr um eine Erkrankung der Augenoberfläche, die auf Störungen der natürlichen Funktionen und der Schutzmechanismen des äußeren Auges zurückgeht [3]. Der instabile Tränenfilm ist lediglich ein Symptom, dessen Ursachen jedoch vielfältig sind [4]. Da die Augenoberfläche und der präokuläre Tränenfilm eine Einheit bilden, gehen Erkrankungen der Augenoberfläche mit Tränenfilmveränderungen einher. Eine gesunde Epitheloberfläche ist für einen stabilen Tränenfilm Voraussetzung, weil die unmittelbar auf der Corneaoberfläche liegende Muzinschicht des Tränenfilms mit den feinen Mikrovilli der Epithelzellen verwoben ist. Durch diese Muzine, die nach neueren Erkenntnissen von den cornealen Epithelzellen selbst gebildet werden, wird die Corneaoberfläche hydrophil, so daß sich die wässrige Phase des Tränenfilms auf ihr verbreiten kann [3;5]. Demnach spielen die Epithelzellen der Hornhaut eine bedeutende Rolle bei der Benetzung der Augenoberfläche. Neben der Produktion der Muzine spielt die Intaktheit des Epithelzellverbandes eine wichtige Rolle. Beide Aspekte werden durch Wachstumsfaktoren, insbesondere vom epidermalen Wachstumsfaktor (EGF) kontrolliert [6], welcher v.a. in der Tränendrüse und in den Basalzellen des Epithels gebildet wird [3;6]. Wie in einer Vielzahl von Tierexperimenten festgestellt [7-10], fördert EGF die Migration und Proliferation von Epithelzellen, die Synthese von

interepithelialen Verbindungsstrukturen wie Desmosomen, Hemidesmosomen, die Synthese von epithelialen Oberflächenproteinen wie Muzine und die Synthese von Basalmembranproteinen wie Hyaluronsäure, Kollagen VII, Fibronektin und Laminin. In Versuchen von Pflugfelder [11] und in Vorversuchen der Augenklinik des Regensburger Universitätsklinikums zeigte sich, daß bei Patienten mit der Diagnose eines „Trockenen Auges“ die Konzentrationsspiegel von EGF bzw. EGF mRNA in der Tränenflüssigkeit und in den cornealen Epithelzellen deutlich geringer sind als bei gesunden Menschen.

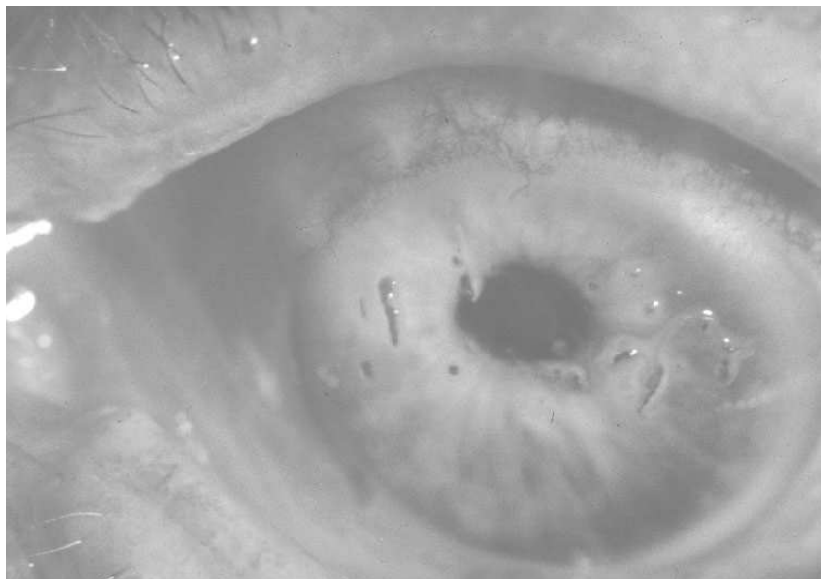


Abb. 1: Schwerer Fall von Keratoconjunctivitis sicca mit starker Rötung der Bindehaut; mit Bengalrosa angefärbte Hornhautfilamente als Zeichen der cornealen Oberflächenschädigung; tiefe Vaskularisation und Trübungen der Hornhaut.

## 1.2 Therapie

### 1.2.1 Aktuelle Therapie

Da bisher noch keine kausal wirkenden Medikamente zur Verfügung stehen, wird das trockene Auge bislang durch eine Substitutionstherapie mit Tränenersatzmitteln behandelt, die je nach Schweregrad in unterschiedlichen Viskositäten verabreicht werden. Die Palette der angewendeten Arzneiformen reicht hierbei von Augentropfen, die neben Tränenersatz und pflegenden Bestandteilen noch viskositätserhöhende Bestandteile enthalten können, bis hin zu lokal angewendeten Inserten, die zur Reizminderung Cellulosederivate wie z.B. Hydroxyethylcellulose freisetzen [12-17]. Die Verwendung von künstlichen Tränen hat jedoch auch offensichtliche Nachteile. Natürliche Tränen haben eine komplexe

Zusammensetzung aus Wasser, Salzen, Kohlenwasserstoffen, Proteinen und Fetten [18], die durch künstliche Tränen nicht vollständig ersetzt werden können. Darüber hinaus ist es nicht möglich, den dreischichtigen Aufbau des natürlichen Tränenfilms, mit der äußeren ca. 0,1 µm dicken Lipidschicht, der mittleren wäßrigen Schicht (ca. 8 µm) und der inneren Muzinschicht (0,8 µm) in künstlichen Tränen nachzubilden [13;16;17]. In hartnäckigen Fällen kann der temporäre oder sogar dauerhafte Verschuß der abführenden Tränenwege indiziert sein. So können die Tränenpünktchen vorübergehend mit kleinen Silikonstöpseln (punctum plugs) [19] oder dauerhaft durch Verödung [18] verschlossen werden, um die produzierten Tränen aufzustauen [20]. Das Ziel dieser palliativen Therapie ist es, die Unregelmäßigkeiten an der cornealen Epitheloberfläche auszugleichen, und damit die Beschwerden der Patienten zu lindern [2]. Dies läßt sich jedoch bei vielen Patienten nur unzureichend erzielen, so daß trotz einer Vielzahl von lokal applizierten Medikamenten die Patienten nicht beschwerdefrei werden.

### 1.2.2 Kausale Therapie mit EGF-Depot-Arzneiformen

Ein neuer Ansatz der Therapie wäre die lokale Applikation von EGF, um die Synthese der Muzine zu steigern, den Zusammenhalt der Epithelzellen untereinander zu verbessern [21] und so die Produktion eines intakten Tränenfilms zu fördern. Erste Versuche der Universitätsaugenklinik Regensburg mit EGF-Augentropfen zeigten bereits hoffnungsvolle Ergebnisse, es stellte sich aber heraus, daß für eine effektive EGF-Substitutionstherapie ein dem physiologischen EGF-Niveau ähnlicher Konzentrationspiegel über mehrere Stunden bzw. Tage am Auge nötig ist. Durch die Verwendung von EGF-haltigen Augentropfen ist dies nur sehr schwer zu verwirklichen, da nach der Tropfenapplikation EGF innerhalb weniger Sekunden über den Tränenkanal abfließt und sich somit der lokalen Wirkung entzieht. Mit einer erhöhten Tropffrequenz sinkt aber die Compliance beim Patienten. Eine echte Alternative hierzu stellt die Verwendung EGF-beladener Inserte dar, die im Bindehautsack appliziert, den Wachstumsfaktor kontrolliert über einen Zeitraum von einigen Stunden bis zu wenigen Tagen freisetzen.

## 1.3 Ziel der Arbeit

Ziel dieses Projekts ist also die Entwicklung von sterilen, gut verträglichen Inserten zur kontrollierten Freisetzung von EGF am Auge. Als Matrix zur kontrollierten Freisetzung von EGF eignen sich viele synthetische und natürlich vorkommende Polymere, jedoch nur wenige zeichnen sich durch eine hohe Verträglichkeit auf der Augenoberfläche aus. Alginate erfüllen diese Kriterien und finden deshalb schon in zahlreichen Ophthalmica Verwendung. Alginate werden aus Braunalgen, die bis zu 40 % des Gelbildners enthalten, gewonnen. Sie bestehen aus alternierend auftretenden Blöcken von Mannuronsäure und Gularonsäure (Abb. 2).

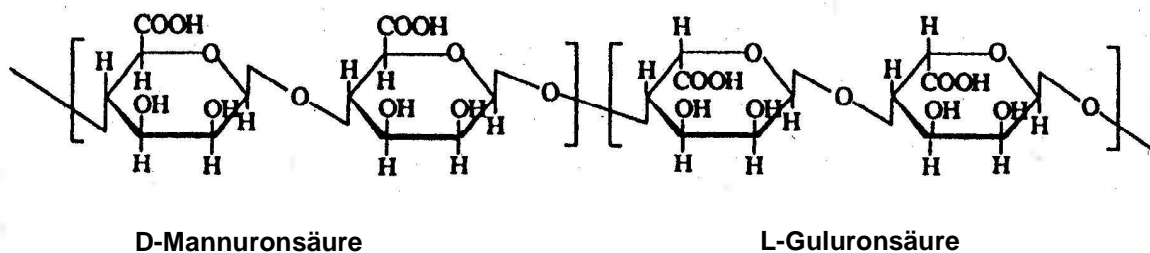


Abb. 2 : Ausschnitt aus einer Alginsäuremolekülkette

Je nach Art des verwendeten Alginate ändert sich die prozentuale Zusammensetzung an Gularonsäure bzw. Mannuronsäure, sowie die Kettenlänge, und damit das Molekulargewicht. Handelsübliche Natrium- und Kalium-Alginate sind wasserlöslich und eignen sich daher nicht zur Herstellung von Inserten mit kontrollierter Freisetzung. Bei Calciumzusatz zu Alginaten bilden Ca-Ionen Brücken zwischen benachbarten Polyguluronsäureketten [22]. Durch das Quervernetzen mit Calcium wird die Hydratisierbarkeit des Alginate stark reduziert, somit entstehen wasserunlösliche Alginatmatrices, welche Proteine wie EGF über einen längeren Zeitraum freisetzen können. Da die Quervernetzung nur über die Gularonsäureblöcke verläuft, können durch Variation des Gehaltes an Gularonsäure die Intensität der Quervernetzung, und somit die physikalischen Eigenschaften der Alginatmatrix beeinflusst werden. Ebenso ist es möglich, durch Variation des Molekulargewichts der verwendeten Alginate die Gelgerüstdichte und die Flexibilität der Molekülketten zu verändern, was wiederum Auswirkungen auf die Freisetzung des Wachstumsfaktors hat [23-25]. Durch Variation von Parametern wie Calciumgehalt, Molekulargewicht der Alginate oder Verhältnis von Mannuronsäure zu Gularonsäure sollen Inserte geschaffen werden, die für die unterschiedlichen Therapieformen die jeweils entsprechenden Freisetzungseigenschaften besitzen.

## 1.4 EGF

EGF wurde erstmals von Cohen 1962 aus den Speicheldrüsen ausgewachsener Mäuse isoliert [26]. 1975 wurde zum ersten Mal humaner epidermaler Wachstumsfaktor (EGF) von Gregory und Willshire aus menschlichem Urin isoliert [27]. Der epidermale Wachstumsfaktor, auch als Urogastron bekannt, kommt in fast allen Körperflüssigkeiten vor, vor allem jedoch im Speichel, den gastrointestinalen Sekreten, in der Amnionflüssigkeit sowie in der Tränenflüssigkeit. EGF findet sich auch in zellulären Bestandteilen wie den Thrombozyten wieder [28;29].

Der Epidermale Wachstumsfaktor ist ein Polypeptid mit stark mitogener Aktivität auf verschiedene Zelltypen in-vivo und in-vitro [30-32]. Humanes EGF ist ein relativ kleines Einzelketten-Polypeptid, das aus 53 Aminosäuren und drei Disulfidbrücken aufgebaut ist. Sein durchschnittliches Molekulargewicht beträgt 6216 Dalton [33]. Savage et al. entschlüsselten die Primärstruktur und die genaue Lage der drei intramolekularen Disulfidbrücken [34;35] (Abb. 3). Die Disulfidbrücken in EGF sind für die biologische Aktivität von großer Bedeutung [36]. Die Reduktion des Disulfids in Gegenwart von Mercaptoethanol und Harnstoff führt zu einer vollständigen Inaktivierung des Polypeptids. Entfernt man Mercaptoethanol und Harnstoff durch Dialyse, kann anschließend die Funktionalität durch Reoxidation mittels Luftsauerstoff nahezu vollständig wieder hergestellt werden.

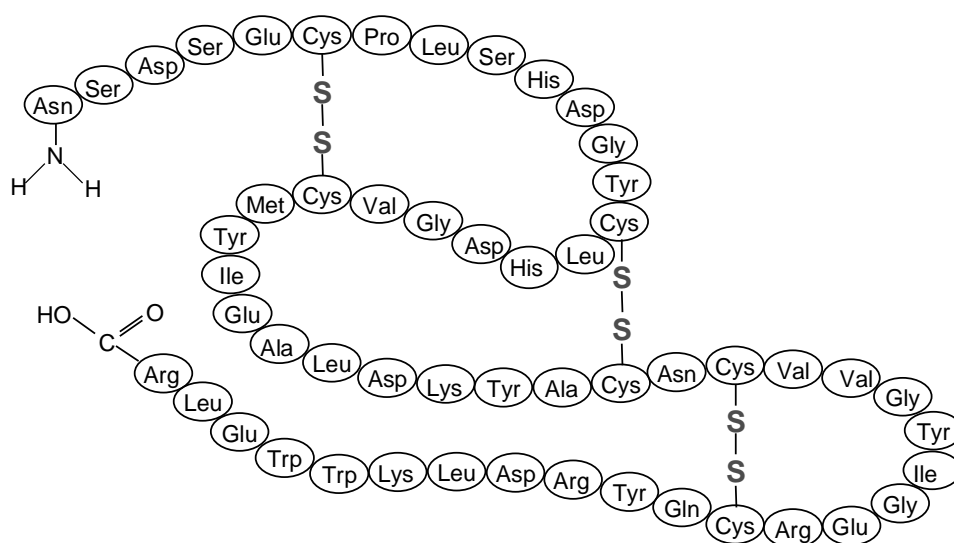


Abb.3 : Aminosäuresequenz des humanen EGF

Beim Menschen liegt das Gen, das für EGF codiert, auf dem Chromosom Nummer 4, Region 4q25-q27 [37;38]. Säugetiere synthetisieren EGF mit Hilfe eines Precursors (prepro-EGF). Dieser besteht aus 1217 Aminosäuren und hat ein durchschnittliches Molekulargewicht von 130.000 Dalton [39;39;40]. Industriell wird humanes EGF recombinant aus *Escherichia coli* gewonnen [41;42].

EGF bindet an den EGF-Rezeptor (EGFR) auf der Zellmembranoberfläche [43]. EGFR ist ein seit langem bekannter vielseitiger Signalüberträger, der im Laufe der Evolution kaum Veränderungen unterlegen war. Er steuert eine Vielzahl von zellulären Prozessen, wie z.B. Zelldifferenzierung, -proliferation, -wachstum und Apoptose. EGFR ist ein Glycoprotein mit einem Molekulargewicht von 170 000 Dalton und kommt auf fast allen Säugetierzellen vor [44]. Der extrazelluläre Anteil des EGFR ist durch zwei cysteinreiche Domänen gekennzeichnet, der zytoplasmatische Bereich durch eine phosphorylierbare Thyrosinkinasedomäne. (Abb. 4) EGFR gehört zur großen Familie der Zelloberflächenrezeptoren mit intrinsischer Proteintyrosinkinaseaktivität. Cohen demonstrierte als erster, daß EGFR als Antwort auf die Bindung von EGF an den Rezeptor phosphoryliert wird. Auf der Plasmamembran existiert der unstimulierte EGFR als Monomer. Die Stimulation am EGFR durch extrazelluläre Liganden führt zu einer Dimerisierung des Rezeptors, was dann die Autophosphorylierung der zytoplasmatischen Domäne nach sich zieht. Die Phosphorylierung initiiert eine Vielzahl von Signaltransduktionskaskaden. Für viele dieser Pfade ist der Mechanismus noch nicht geklärt. In Abbildung 5 sind die zwei bereits gut verstandenen Hauptsignaltransduktionswege, der PLC $\gamma$ -Pfad und der ras-Pfad, dargestellt [43;45-47].

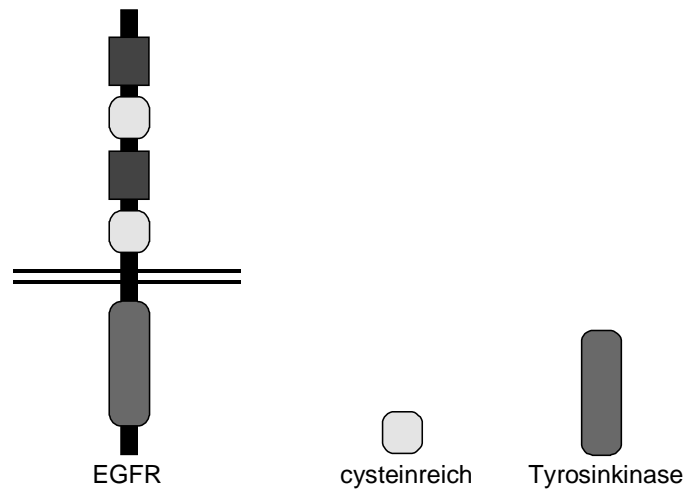
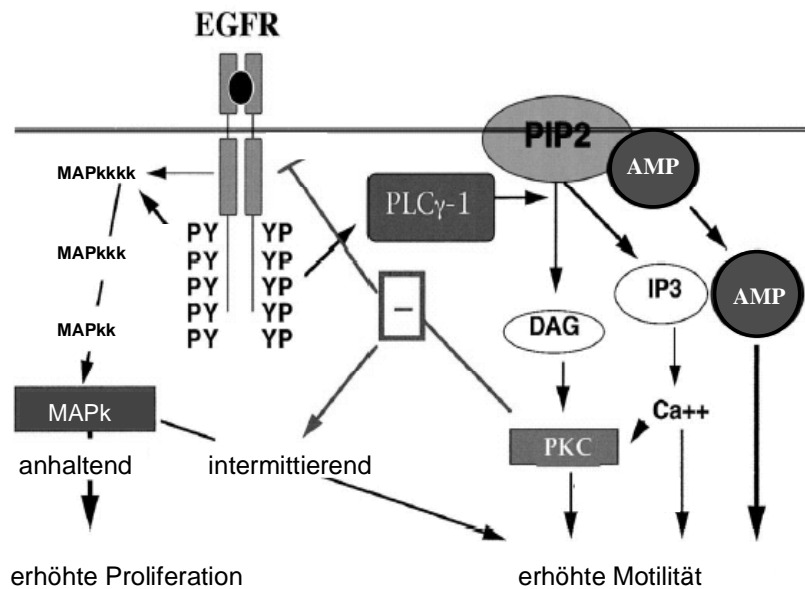


Abb. 4 : EGF-Rezeptormonomer mit cysteinreicher extrazellulärer Domäne und intrazellulärer Tyrosinkinase;



- |          |   |                    |                                 |
|----------|---|--------------------|---------------------------------|
| EGFR :   | EGF-Rezeptor  | PIP <sub>2</sub> : | Phosphatidylinositol-diphosphat |
| AMP :    | Adenosinmomophoshat                                     | IP3 :              | Inositoltriphosphat             |
| DAG :    | Diacylglycerol  | PKC :              | Proteinkinase C                 |
| PLCγ-1 : | Phospholipase C γ-1                                     |                    |                                 |
| MAPk     | : mitogen aktivierte Proteinkinase                      |                    |                                 |
| MAPkk    | : mitogen aktivierte Proteinkinase-kinase               |                    |                                 |
| MAPkkk   | : mitogen aktivierte Proteinkinase-kinase-kinase        |                    |                                 |
| MAPkkkk  | : mitogen aktivierte Proteinkinase-kinase-kinase-kinase |                    |                                 |

Abb. 5 :Schematische Darstellung der Signaltransduktionskaskaden, welche durch EGF aktiviert werden.

### 1.5 Alginat

Kommerziell erhältliche Alginat werden hauptsächlich aus drei verschiedenen Braunalgenspezies gewonnen: *Laminaria hyperborea*, *Ascophyllum nosodum* und *Macrocystis pyrifera* [48]. Bei all diesen Algenarten ist Alginat bezogen auf das Trockengewicht mit bis zu 40%(m/m) das häufigste Polysaccharid [49]. Alginat befindet sich in der Intrazellulärmatrix, wo es als gemischtes Salz von in Meerwasser vorkommenden Kationen wie  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Sr^{2+}$ ,  $Ba^{2+}$  und  $Na^+$  vorliegt. Natürliches Alginat liegt hauptsächlich als ein wasserunlösliches, durch  $Ca^{2+}$ -Ionen quervernetztes Gel vor [49]. Bakteriell hergestelltes Alginat kann aus *Azotobacter vinelandi* und verschiedenen *Pseudomonas* Spezies gewonnen werden [50].

Alginat gehören zu einer Familie von linearen, unverzweigten Polysacchariden. Diese sind aus alternierend auftretenden Blöcken von 1,4- $\beta$ -D-Mannuronsäure, 1,4- $\alpha$ -L Guluronsäure, sowie gemischten 1,4- $\beta$ -D-Mannuronsäure, 1,4- $\alpha$ -L Guluronsäure Blöcken aufgebaut. (Abb. 2) Die physikalischen Eigenschaften der Alginat werden durch das Verhältnis von Mannuronsäureblöcken zu Guluronsäureblöcken sowie durch das Molekulargewicht bestimmt. Die molekulare Zusammensetzung ist abhängig vom Organismus und der Art des Gewebes, aus dem die Alginat isoliert wurden. Alginat, die aus *L. hyperborea* gewonnen wurden, weisen die höchsten Konzentrationen an Guluronsäure auf, während Alginat von *A. nosodum* und *L. japonica* nur eine geringe Anzahl an Guluronsäureblöcken enthalten [51]. Die Viskosität von Alginatlösungen hängt hauptsächlich vom Molekulargewicht des verwendeten Alginats ab. Die Untersuchung von gereinigtem Alginat mittels Gelfiltrationschromatografie und Lichtstreuung zeigt eine breite Molekulargewichtsverteilung von 80 kDalton bis 260kDalton [23]. Im Rahmen dieser Arbeit wurden nur hochreine Alginat verwendet, da Verunreinigungen natürlicher Alginat mit Proteinen, Polysacchariden oder Schwermetallen zu einer Minderung der Biokompatibilität führen.

Quervernetzte, feste Alginatgele können durch Extrusion einer Natrium-Alginatlösung in eine Quervernetzungslösung, die zweiwertige Ionen wie z.B.  $Ca^{2+}$ ,  $Sr^{2+}$  oder  $Ba^{2+}$  enthält, hergestellt werden. Einwertige Kationen oder  $Mg^{2+}$  führen zu keiner Gelbildung [49], während  $Sr^{2+}$  und  $Ba^{2+}$  zu stärkeren Gelen führen als  $Ca^{2+}$  [52]. Andere zweiwertige Kationen wie  $Pb^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ , und  $Mn^{2+}$  führen auch zu einer Quervernetzung, jedoch ist ihre Verwendung aufgrund der hohen

## Einleitung

Toxizität eingeschränkt. Die Gelierung und die Quervernetzung werden hauptsächlich durch den Austausch der Na-Ionen an den  $\alpha$ -L-Guluronsäure Blöcken durch zweiwertige Ionen erreicht. Der Austausch führt über eine Stapelung der Guluronsäuregruppen zur charakteristischen Eierschachtelstruktur, wie sie in Abb. 6 dargestellt ist [53]. Jede einzelne Alginatkette kann Verbindung mit vielen anderen Alginatketten eingehen und somit zur Ausbildung eines Gelgerüstes führen. Die so entstandenen Gelgerüste sind sehr fest und zwar in Wasser quellbar, jedoch nicht mehr löslich. Durch Zugabe von EDTA, Phosphaten oder anderer  $\text{Ca}^{2+}$ -Komplexierer läßt sich Calcium aus den quervernetzten Alginaten wieder herauslösen und somit die wasserunlösliche Gelgerüststruktur weitgehend zerstören. Die so behandelten Alginatgele sind wieder wasserlöslich.

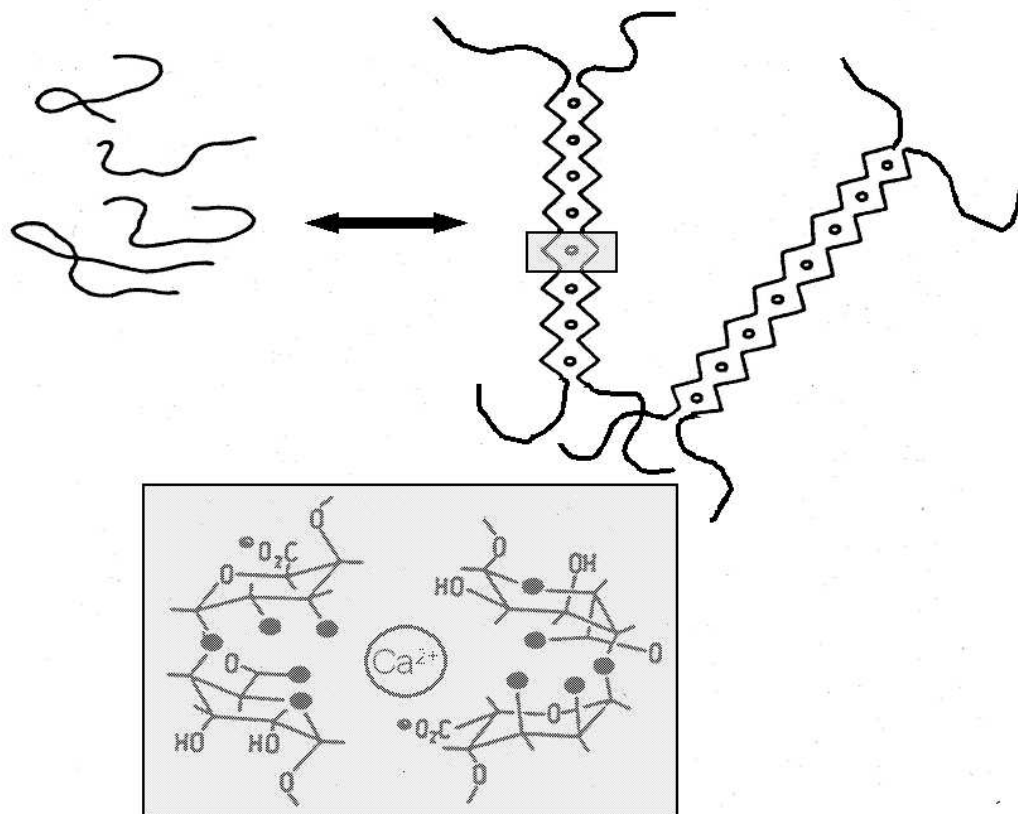


Abb. 6 : Schematische Darstellung der Eierschachtelstruktur der Polyguluronsäureblöcke, die durch Calciumionen quervernetzt werden. Der obere Teil der Darstellung zeigt den Übergang vom ungeordneten Zustand der Molekülketten zu einem geordneten bandartigen Zustand mit  $\text{Ca}^{2+}$ -Einlagerungen. Der untere Teil zeigt die vermutete Stereochemie der  $\text{Ca}^{2+}$ -Komplexierung. Die mit an der  $\text{Ca}^{2+}$ -Komplexierung beteiligten Sauerstoffatome sind als ausgefüllte Kreise dargestellt.

## 2 Materialien und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Alginate

Hochreine Alginate wurden von der Firma Pronova Biomedical (Oslo, Norwegen) bezogen.

Alginatbezeichnung	LVG	MVG	LVM	MVM
Viskosität 2% (m/m) in H <sub>2</sub> O, [mPa s]	118	287	148	200
Molekulargewicht [g/mol]	189 000	231 000	209 000	226 000
Guluronsäuregehalt [%]	73	73	38	38
pH einer 2% (m/m) aq. Lösung	8,0	5,7	8,5	8,9
Batch no.	611-256-07	701-256-08	210-241-02	210-242-01

#### 2.1.2 Cellulose

Hydroxyethylcellulose (HEC) mit der Bezeichnung Natrosol 250 HX wurde von der Firma Synopharm (Barsbüttel, Deutschland) bezogen. Die Viskosität 2%iger (m/m) Gele, beträgt 9000 mPa s. Charge: 0106A213

#### 2.1.3 Fließmittel für die HPLC-Analytik

Als Fließmittelbestandteile kamen bei den HPLC-Untersuchungen zum Einsatz:

Substanz	Hersteller	Charge
Acetonitril in HPLC qualität	Baker (Deventer, Netherlands)	0025010004 ; 0105710023 9916510002 ; 0125510009 0032210002 ; 0118510008
1-Propanol p.a.	Merck (Darmstadt, Deutschland)	K28589597 104
Trifluoressigsäure (TFA)	Sigma-Aldrich (Seelze, Deutschland)	00600

#### 2.1.4 EGF

Der verwendete rekombinante, humane epidermale Wachstumsfaktor (EGF) wurde bei der Firma Biomol (Hamburg, Deutschland) eingekauft. (Charge: 2539; 2540; 2543) Das Lyophilisat wurde mit Aqua ad iniectabilia auf Konzentrationen von 100 µg/ml und 10 µg/ml verdünnt. Aliquote zu 1050 µl wurden in 1,5 ml Reagiergefäße abgefüllt und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

### 2.1.5 Chemikalien

- 0,1N HCL, Ch.Nr.:31045878, Fa. Roth, Karlsruhe, Germany
- 0,1N NaOH, Ch.Nr.: 90362671, Fa. Merck, Darmstadt, Germany
- Aqua bidestillata ; wurde vor Gebrauch jeweils frisch hergestellt
- Aqua ad iniectabilia; Fa. Bayer AG (Leverkusen, Deutschland),  
Charge: BBGBX1
- Bovines Albumin (BSA), Fraktion V, Fa. Sigma Chemical (St. Louis, USA),  
Charge: 16H0354
- BSS-Puffer pH 7.4, Fa. Pharmacia & Upjohn (Gronningen, Niederlande),  
Charge: 2213712
- Calciumchlorid-dihydrat p.a. , Fa. Merck (Darmstadt, Deutschland),  
Charge: TA851182 049
- Sigmacote, Lot:129H4363, Fa. Sigma, St. Louis, USA
- Wasserstoffperoxid 35%, Ch.Nr.: K23380709, Fa. Merck, Darmstadt, Germany

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Insertherstellung

#### 2.2.1.1 Insertherstellung (allgemein)

Zur Herstellung der Inserte wurde 1%iges (m/m) Alginatgel, das durch Quellen des Alginats nach Zugabe von Aqua ad injectabilia entsteht, verwendet. Zur Bestimmung des Effekts von Calcium auf die Wirkstofffreisetzung wurden einigen Gelen unterschiedliche Mengen an Calciumchloriddihydrat vor der endgültigen Quervernetzung beigemischt. Die zugesetzte Menge an Calcium reichte nicht aus um vollständig quervernetzte, wasserunlösliche Gele herzustellen. Bei der Zugabe von Calcium ist es wichtig, daß das Calciumchlorid in kristalliner Form aufgestreut und nicht als fertige Lösung aufgegossen wird. Die Zugabe einer Calciumchloridlösung würde zur Bildung von sehr stark quervernetzten Gelklumpen führen, die die Ausbildung eines homogenen, klumpenfreien Gels ausschließen. Durch die Zugabe von Calcium in kristalliner Form wird der Quervernetzungsvorgang verlangsamt, so daß durch kräftiges Rühren nach der Calciumzugabe homogene Gele erhalten werden können. Zur Einarbeitung von EGF wurden 11,0 g des Gels in einem Becherglas unter ständigem Rühren durch einen Magnetrührer mit 1 ml EGF-Lösung (100 µg/ml) versetzt. Die gut homogenisierte EGF-Alginat-Lösung wird nun

quantitativ in eine zylindrische Teflonform ( Ø 40mm Tiefe 10mm, Fa. Feinmechanische Werkstatt der Uni Regensburg, Deutschland) gegeben, und anschließend in einem geschlossenen Ofen bei 30°C für zwei Tage getrocknet (Trockenschrank BvW 40, Fa. Memmert, Deutschland). Die so entstandenen Filme sind wasserlöslich, zerfallen bei Applikation am Auge sofort und setzen den Wirkstoff innerhalb weniger Minuten vollständig frei. Aus diesem Grund wurden die Filme durch Calcium quervernetzt. Zur Quervernetzung wurden die Filme für 60 Sekunden in eine 5%ige Lösung von Calciumchloriddihydrat in Aqua ad injectabilia getaucht. Es ist darauf zu achten, daß beide Seiten des Films gleichmäßig benetzt werden. Die Trocknung des Films erfolgte im Trockenschrank für 2 Stunden bei 30°C. Die Inserte können nun aus dem Film in gewünschter Größe ausgestanzt werden. Als geeignete Größe erscheinen für unsere Versuche ovale Inserte mit einer Länge und Breite von 5mm X 3mm.

### 2.2.1.2 Herstellung steriler Inserte

Die sterile Herstellung der Inserte erfolgte im Reinraum des Lehrstuhls in einer Laminar-Air-Flow-box (Hera Safe, Heraeus Instruments, Deutschland). Das Betreten des Reinraums erfolgte in steriler Kleidung. Da Alginatlösungen bei stark erhöhten Temperaturen, wie es beim Autoklavieren der Fall ist, zur Depolymerisation neigen [54], wurden sie mit Hilfe einer Druckabfüllanlage (Hochdrucksterilfilteranlage, Fa. Concept, Deutschland) mit integriertem Sterilfilter (0,2µm, Kleenpak, Tri Colmp KA1NFZP1, Fa Pall, Deutschland) sterilfiltriert. Die verwendete EGF Lösung wurde in einer sterilen 5ml-Spritze (Lot:280492; Fa. Dispomed Witt, Deutschland) aufgezogen und sterilfiltriert (Filter: Minisart 0,20µm, Charge: 16534 000853, Fa. Sartorius, Deutschland). Alle verwendeten Geräte wurden autoklaviert bzw. hitzesterilisiert. Die Trocknung der EGF-Alginat-Lösung erfolgte bei Raumtemperatur über drei Tage. Die Trocknung der Filme nach der Quervernetzung erfolgte ebenfalls bei Raumtemperatur. Die Trocknungsvorgänge erfolgten in der Laminar-Air-Flow-Box. Alle übrigen Arbeitsschritte entsprachen denen in Punkt 2.2.1.1.. Zur Überprüfung der Sterilität wurden die Inserte der Sterilitätsprüfung nach DAB 10 unterzogen. Die Sterilitätsprüfung wurde im Institut für medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Universität Regensburg durchgeführt.

### 2.2.2 Quervernetzung von Alginaten

Bei der einminütigen Quervernetzung der EGF-haltigen Filme werden zwischen 5% und 10% des eingesetzten EGF an die Calciumchloridlösung abgegeben. Deshalb sollte die Dauer der Quervernetzung so kurz wie möglich gehalten werden. Um festzustellen, wie weit der Grad der Quervernetzung von der Dauer der Behandlung abhängig ist, wurde der Calciumgehalt von LVG-Alginatfilmen in Abhängigkeit von der Quervernetzungsdauer bestimmt. Als Quervernetzungszeiten wurden 1, 2, 5, 15, 30, und 120 Minuten gewählt. Für jede Quervernetzungsdauer wurden 4 Filme eingesetzt. Als Quervernetzungsmedium diente eine 5%ige Calciumchloridlösung. Die Quervernetzung wurde wie in Punkt 2.2.1.1. beschrieben, durch eintauchen der Filme in eine Calciumchloridlösung und anschließendem Trocknen bei Raumtemperatur durchgeführt. Der Calciumgehalt der getrockneten Filme wurde in Zusammenarbeit mit dem Mikroanalytischen Laboratorium der Universität Regensburg mit Hilfe eines Atomabsorptionsspektrometers (Spectr AA 300, Fa. Varian, Nevada USA) bestimmt.

### 2.2.3 Analytik

#### 2.2.3.1 Quantitative EGF Bestimmung

Ein einfaches und günstig durchzuführendes Verfahren ist die EGF Analytik per HPLC [55]. Besonders geeignet hierfür ist die reverse phase chromatography. Für die Untersuchungen wurden 100µl Proben verwendet, die auf einer RP18-Säule (Supelcosil-318, Fa. Supelco (Länge 250mm, Durchmesser 4,6mm)) bei Raumtemperatur aufgetrennt wurden. Als HPLC-System diente das 10 AVP der Firma Shimadzu (Pumpe, LC-10AT; Autosampler, SIL-10Advp; Controller, SCL-10Avp; Degasser; Gastorr, Fa. Knauer, Berlin) Die Chromatogramme wurden durch einen Fluoreszenzdetektor (RF-551, Fa. Shimadzu, Deutschland) aufgenommen. Die Analysebedingungen sind in Tabelle 1 dargestellt. Unter diesen Bedingungen ist es möglich, noch 50 ng/ml EGF nachzuweisen.

Tab. 1: Chromatographiebedingungen zur quantitativen EGF Bestimmung

Eluenten	Fließmittel A: 450 ml Aqua bidest. 50 ml Acetonitril 5 ml 1-Propanol 0,5 ml TFA	Fließmittel B: 450 ml Acetonitril 50 ml Aqua bidest. 5 ml 1-Propanol 0,5 ml TFA
Gradient	0 min: 15% B in A 22 min 25% B in A 30 min Laufende	20 min: 25% B in A 23 min 15% B in A
Flußrate	1,0 ml / min	
Injektionsvolumen	100 µl	
Säule	Supelcosil-318, Fa. Supelco	
Floureszenzdetektion	$\lambda_{\text{ex}} = 276 \text{ nm}$ ; $\lambda_{\text{em}} = 337 \text{ nm}$	
UV-Detektion	$\lambda = 276 \text{ nm}$	

Die Daten wurden gesammelt und mit Hilfe der Class VP 5.03 Software der Firma Shimadzu ausgewertet .

### 2.2.3.2 HPLC-MS

Kombiniert man eine HPLC-Anlage mit einem Massenspektrometer, so ist es möglich, zuerst durch die HPLC-Anlage das Substanzgemisch nach seiner Lipophilie aufzutrennen, und gleich im Anschluß die relativen Molekülmassen der aufgetrennten Substanzen mit Hilfe der massenspektrometrischen Analyse zu bestimmen [56].

Bei der Herstellung der Inserte ist EGF chemischen und physikalischen Belastungen ausgesetzt, welche die Integrität und damit die biologische Wirksamkeit des EGF beeinflussen können. Eine schnelle und exakte Methode zur Beurteilung von eventuell auftretenden Degradationen und dadurch bedingtem Wirkverlust bietet die Analyse per HPLC-MS. Durch Bestimmung des Masseverlusts des EGF lassen sich Rückschlüsse auf die erfolgten Abbauvorgänge ziehen.

Für die Messung wurde eine Lösung verwendet, in der EGF aus einem LVG-Film freigesetzt wurde. Der Film wurde mit 50 µg EGF beladen. Die Freisetzung erfolgte über vier Tage bei 37°C in einem nicht verschlossenen 20 ml Rollrandglas. Als Freisetzungsmedium dienten 15 ml BSS-Puffer, der 0,1% BSA zur Minderung der Adsorption des EGF an die Rollrandgläser enthielt. Für die Analyse wurde 1 ml der Lösung entnommen und zur Abtrennung des Alginates dem Verfahren 2.2.3.4. unterzogen.

Für die HPLC-MS-Analyse wurde ein Hewlett-Packard 1100 HPLC-System, das einen Degasser, eine Pumpe, einen Autosampler, und einen UV-Detektor (alle Geräte von der Firma Hewlett-Packard, Deutschland) enthielt, mit einem TSQ 7000 Massenspektrometer (ThermoQuest , San José, CA, USA) kombiniert. Für die Untersuchungen wurden Bedingungen wie in Tab. 1 beschrieben gewählt.

### 2.2.3.3 Gezielte Oxidation von EGF

Bei längerem Kontakt von EGF-Lösungen mit Luftsauerstoff kann EGF an Methionin (Aminosäure 21) oxidiert werden [57], ohne dass sich die Bioaktivität von EGF ändert [58]. Zur gezielten Oxidation wurde, 1ml einer wässrigen EGF-Lösung mit einem Gehalt von 1 µg/ml mit 50 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 35% versetzt. Dies sollte dazu führen, daß nicht oxidiertes EGF vollständig in die oxidierte Form überführt wird. Als Referenz diente eine unbehandelte EGF-Lösung.

### 2.2.3.4 Trennung von Alginat und EGF

Eines der Hauptprobleme beim quantitativen Nachweis von EGF aus Alginatinserten sind Verunreinigungen der zu untersuchenden Probe mit Alginat. Alginate sind im Milieu des HPLC-Fließmittels nicht löslich und müssen daher vorher quantitativ ohne Verlust an EGF abgetrennt werden.

Zum Abtrennen des Alginats wurden drei verschiedene Methoden untersucht:

1. Saure Fällung: Wird der pH-Wert einer Alginatlösung mit 0,1 M HCL auf unter pH 4,6 abgesenkt, so fällt wasserunlösliche Alginsäure aus, welche bei 9000 g innerhalb von 15 Minuten abzentrifugiert (Zentrifuge GS 15R, Fa. Beckmann, Deutschland) werden kann [59].
2. Fällung durch CaCl<sub>2</sub>: Versetzt man eine Alginatlösung zu 5% mit CaCl<sub>2</sub>, so bilden die Ca<sup>2+</sup> Ionen mit den Gulurosäure-Anteilen des Alginats ionische Wechselwirkungen aus, was zur Quervernetzung der Alginatketten führt. Die Löslichkeit in Wasser nimmt dabei drastisch ab und es kommt zur Ausfällung von Ca<sup>2+</sup>-Alginat. Die Abtrennung des ausgefällten Ca-Alginats erfolgt durch 15 minütiges Abzentrifugieren bei 9000 g. (Tab. 2, Ansätze 2, 4, 6)
3. Fällung durch organische Lösungsmittel: Durch Zumischung von organischen Lösungsmitteln (wie z.B. Acetonitril) zu Alginatsolen können die Alginatmoleküle denaturiert werden. Hierdurch sinkt die Hydratisierbarkeit des Alginats so stark, daß Alginat ausfällt und anschließend abzentrifugiert werden kann (Tab. 2, Ansätze 1, 3, 5, 7).

Tab. 2: Ansätze zur Bestimmung der Effizienz der Trennverfahren

<b>Ansatz</b>	<b>Alginat</b>	<b>BSS-Puffer</b>	<b>Acetonitril</b>	<b>CaCl<sub>2</sub>-Lösung</b>	<b>EGF</b>	<b>zentrifugieren</b>
1	2,0 ml	-	1,0 ml	-	-	Ja
2	2,0 ml	-	-	1,0 ml	-	Ja
3	-	1,8 ml	1,0 ml	-	0,2 ml	Ja
4	-	1,8 ml	-	1,0 ml	0,2 ml	Ja
5	1,8 ml	-	1,0 ml	-	0,2 ml	Ja
6	1,8 ml	-	-	1,0 ml	0,2 ml	Ja
7	-	1,8 ml	1,0 ml	-	0,2 ml	Nein

Als Alginat diente bei diesem Versuch eine 1%ige (m/m) Lösung des Alginats LVM in Aqua ad injectabilia. Die CaCl<sub>2</sub>-Lösung wurde durch Lösen von 5,0g CaCl<sub>2</sub>x2H<sub>2</sub>O in 100 ml BSS-Puffer hergestellt. Der Gehalt der verwendeten wässrigen EGF-Lösung betrug 10 µg/ml. Alle Ansätze wurden in 15 ml Zentrifugenröhrchen (Fa. Corning, Deutschland) zubereitet. Um eine homogene Verteilung des Alginats zu erhalten, wurden alle Proben 15 Sekunden auf einem Reagenzglasschüttler (Reax, Fa. Heidolph, Deutschland) auf höchster Stufe geschüttelt. Die Abtrennung des Alginats bei den Ansätzen 1-6 erfolgte durch 15 minütiges Zentrifugieren (GS 15R, Fa. Beckmann, Deutschland) bei 9000 g. Ansatz 7 wurde nicht zentrifugiert. Alle Ansätze wurden dreifach angefertigt.

Bei dem vorangegangenen Versuch wurden sehr extreme Bedingungen simuliert, da in der Realität nie solch große Mengen des Alginats mit in Lösung gehen. Zur Quantifizierung des EGF-Verlusts bei Alginatabtrennung wurde in einem weiteren Versuch eine Alginatgelkonzentration von 1,25% (v/v) bei verschiedenen EGF-Konzentrationen verwendet, wie aus Versuchsschema Tab. 3 Ansätze 1-4 zu entnehmen ist.

Als Alginatlösung diente bei diesem Versuch wiederum eine 1%ige Lösung des Alginats LVM, gelöst in Aqua ad injectabilia. Der Gehalt der verwendeten wässrigen EGF-Lösung beträgt 10 µg/ml. Alle Ansätze wurden in 15 ml Zentrifugenröhrchen zubereitet (n = 3). Um eine homogene Verteilung des Alginats zu erhalten, wurden alle Proben 15 Sekunden auf einem Reagenzglasschüttler auf höchster Stufe geschüttelt.

Tab. 3 : Ansätze zur Bestimmung des EGF Verlusts durch Alginateabtrennung

<b>Ansatz:</b>	<b>Zusammensetzung:</b>	<b>Referenz:</b>	<b>EGF-Gehalt:</b>
1	0,05 ml Alginat 1,95 ml BSS 1,00 ml EGF-Lösung 1,00 ml Acetonitril	2,00 ml BSS 1,00 ml EGF-Lösung 1,00 ml Acetonitril	2500 ng/ml
2	0,05 ml Alginat 2,45 ml BSS 0,50 ml EGF-Lösung 1,00 ml Acetonitril	2,50 ml BSS 0,50 ml EGF-Lösung 1,00 ml Acetonitril	1250 ng/ml
3	0,05 ml Alginat 2,70 ml BSS 0,25 ml EGF-Lösung 1,00 ml Acetonitril	2,75 ml BSS 0,25 ml EGF-Lösung 1,00 ml Acetonitril	625 ng/ml
4	0,05 ml Alginat 2,80 ml BSS 0,15 ml EGF-Lösung 1,00 ml Acetonitril	2,85 ml BSS 0,15 ml EGF-Lösung 1,00 ml Acetonitril	375 ng/ml

### 2.2.4 Adsorption von EGF

In Lösung neigt EGF sehr stark zur Adsorption an Oberflächen. Für eine reproduzierbare EGF-Analytik waren daher adsorptionshemmende Vorkehrungen nötig: Zum einen konnten die Oberflächen der verwendeten Gefäße silanisiert werden. D. h. durch Behandlung mit Sigmacote® (Lot:129H4363, Fa. Sigma, St. Louis, USA) wurden auf den Oberflächen langkettige Kohlenwasserstoffe angebracht und somit die Oberflächen hydrophobisiert, wodurch die Adsorptionstendenzen des hydrophilen EGF reduziert werden sollten. Zum anderen bestand die Möglichkeit, durch Zugabe von Proteinen mit noch stärker Adsorptionsneigung, wie bovinem Serum Albumin (BSA), die Oberflächen abzusättigen und somit die Adsorptionsmöglichkeiten des EGF zu vermindern.

#### 2.2.4.1 Adsorptionsminderung durch Silanisieren

Zur Silanisierung wurden die verwendeten Gefäße in Sigmacotelösung getaucht und bei Raumtemperatur getrocknet. Um einen Effekt der Silanisierung auf die Adsorption feststellen zu können, wurde EGF-Lösung mit der Konzentration 1 µg/ml über vier Stunden in silanisierten, nicht silanisierten und unterschiedlichen Medien in Rollrandgläsern inkubiert und anschließend vermessen. Um die gewünschte EGF-Konzentration zu erhalten, wurden 0.1 ml EGF-Aliquot (10 µg/ml) in 0.9 ml Lösungsmittel gegeben. Als Lösungsmittel diente Aqua bidest., das mittels 0,1N HCl auf pH 5,6 bzw. mittels 0,1N NaOH auf pH 10,8 eingestellt wurde. Des weiteren

wurden Tris-Puffer pH 7,4 und BSS pH 7,4 verwendet. Die durchgeführten Ansätze sind in Tab. 4 dargestellt.

Tab. 4: Ansätze zur Beurteilung der Adsorptionsminderung durch Silanisieren

Lösungsmittel	pH-Wert	Oberflächenbehandlung
H <sub>2</sub> O	5,6	nicht silanisiert
H <sub>2</sub> O	5,6	silanisiert
H <sub>2</sub> O	10,8	nicht silanisiert
H <sub>2</sub> O	10,8	silanisiert
Tris-Puffer	7,4	nicht silanisiert
Tris-Puffer	7,4	silanisiert
BSS-Puffer	7,4	nicht silanisiert
BSS-Puffer	7,4	silanisiert

### 2.2.4.2 Adsorptionsminderung durch BSA Zugabe

Zur Überprüfung der adsorptionshemmenden Wirkung von BSA wurde die Freisetzung aus EGF-beladenen Filmen in BSA-haltigem Freisetzungsmittel und in BSA-freiem Freisetzungsmittel bestimmt. BSA wurde in einer Konzentration von 0,1% (m/m) verwendet. Als EGF-Träger dienten MVG-Alginatfilme, die bei der Herstellung mit 1,5 mg Calciumchlorid pro Gramm 1% (m/m) Alginatgel versetzt wurden. Die EGF Beladung betrug 100 µg pro Film. Die Herstellung erfolgte entsprechend Punkt 2.2.1. Die Freisetzung wurde entsprechend Punkt 2.2.6. bestimmt.

### 2.2.5 Stabilität von EGF

Bei der Entwicklung einer neuen Arzneiform ist die Kenntnis der Stabilität sowie der Abbauprodukte des Wirkstoffs in der Zubereitung von essentieller Bedeutung. Vor jeder Neuzulassung von Arzneimittelzubereitungen müssen Langzeitstabilitätsprüfungen unter genau definierten Bedingungen durchgeführt werden, um die Stabilität der Formulierung über einen definierten Zeitraum gewährleisten zu können (ICH-Stabilitätsrichtlinien; ICH-Q1A 09.1994). Neben Langzeitstabilitätsuntersuchungen werden vor allem in der Frühphase der Formulierungsentwicklung zur Orientierung sogenannte Streßtests bei erhöhten Temperaturen durchgeführt, um in kürzerer Zeit Informationen über die Stabilität und Abbaumechanismen von Arzneistoffen zu erhalten [60]. Der Zusammenhang zwischen der Temperatur und der Geschwindigkeit des Abbaus (Reaktionsgeschwindigkeitskonstante) wurde über die Beziehung nach Arrhenius ausgewertet. (Gleichung 1)

$$k = A \cdot e^{\frac{-E_A}{RT}} \quad \text{Gleichung 1}$$

Dabei ist  $k$  die Reaktionsgeschwindigkeitskonstante,  $A$  die Stoßkonstante bzw. der Häufigkeitsfaktor,  $E_A$  die Aktivierungsenergie [J/mol],  $R$  die allgemeine Gaskonstante und  $T$  die absolute Temperatur [K]. Nach der Ermittlung der Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten bei mindestens vier Temperaturen zwischen 30°C und 80°C ist es durch Auftragung von  $\ln(k)$  gegen  $1000/T$  möglich, die Reaktionsgeschwindigkeitskonstante bei definierten Normalbedingungen zu ermitteln und Aussagen über Parameter wie Aktivierungsenergie, Halbwertszeit und Haltbarkeit zu treffen. Folgende Voraussetzungen müssen für die Gültigkeit der Arrhenius-Gleichung erfüllt sein [61]:

- Der Abbau muß temperaturabhängig sein.
- Der Mechanismus der Reaktion darf sich bei erhöhten Temperaturen nicht ändern.
- Das untersuchte System muß einphasig sein.

Die Gültigkeit der Arrheniusgleichung bei der Durchführung von isothermen Streßtests mit größeren Peptiden und Proteinen wird kritisch beurteilt. Diese Verbindungen zeigen häufig ein komplexes Abbauverhalten, wobei sich bei einigen Proteinen der Abbaumechanismus in Abhängigkeit von der Temperatur ändert [62]. Aus diesem Grund wird von einigen Autoren vorgeschlagen, beschleunigte Abbaustudien nur unterhalb der Entfaltungstemperatur von Proteinen durchzuführen, die häufig unterhalb von 40°C liegt [63]. Andererseits werden für größere Peptide wie Insulin [64], das ein ähnlich großes Molekulargewicht wie EGF aufweist, Inaktivierungskinetiken gefunden, die der Arrheniusbeziehung folgen.

Zur Bestimmung der thermischen Stabilität des EGF in Lösung wurde EGF Stammlösung mit BSS-Puffer auf eine Konzentration von 5 µg/ml verdünnt. Je ein Milliliter dieser Lösung wurde mit Hilfe von Minisart Sterilfiltern in HPLC Vials sterilfiltriert und mit Septen und Schraubkappe dicht verschlossen. Es wurden insgesamt 150 solcher Vials vorbereitet und in Gruppen à 30 Stück zur Inkubation in Trockenschränke überführt. Die Inkubationstemperaturen betragen 30°C, 37°C, 45°C, 55°C, 65°C. Zu den Meßzeitpunkten (Tab. 5) wurden je drei EGF-Proben aus

dem Trockenschrank entnommen und unverzüglich bei  $-80^{\circ}\text{C}$  (Ge frierschrank  $-80^{\circ}\text{C}$ , Typ: HFU586, Fa. Kendros, Deutschland) bis zur HPLC Vermessung eingefroren.

Tab. 5: Meßzeitpunkte des Stabilitätstests

Temp.	Ent.1	Ent.2	Ent.3	Ent.4	Ent.5	Ent.6	Ent.7	Ent.8	Ent.9	Ent.10
30°C	0	24Std	3Tage	8Tage	11Tage	15Tage	20Tage	37Tage	53Tage	60Tage
37°C	0	24Std	3Tage	8Tage	11Tage	15Tage	20Tage	37Tage	53Tage	60Tage
45°C	0	8Std	24Std	2Tage	4Tage	6Tage	11Tage	15Tage	20Tage	33 Tage
55°C	0	4Std	24Std	2Tage	3Tage	4Tage	5Tage	8Tage	11Tage	15 Tage
65°C	0	1Std	4Std	8Std	24Std	2Tage	3Tage	4Tage	5Tage	6Tage

Für die Auswertung der isothermen Stabilitätsuntersuchung wurde eine Abbaukinetik pseudo-erster Ordnung zu Grunde gelegt.

$$-\frac{dC}{dt} = k \cdot C \quad \text{Gleichung 2}$$

Die Reaktionsgeschwindigkeitskonstante  $k$  wurde aus der Steigung der sich bei der halblogarithmischen Auftragung des Restgehalts gegen die Zeit ergebenden Gerade ermittelt.

$$\ln C_t = \ln C_0 - kt \quad \text{Gleichung 3}$$

Bei Gültigkeit der Arrheniusgleichung (Gleichung 1) wurden durch Auftragen von  $\ln k$  gegen  $T$  Parameter wie Aktivierungsenergie ( $E_A$ ), Halbwertszeit ( $t_{50}$ ) Zeitpunkt des 90%igen Restgehalts ( $t_{90}$ ) sowie die Reaktionsgeschwindigkeitskonstante bei Raumtemperatur bestimmt.

### 2.2.6 EGF Freisetzung in-vitro

Für die Bestimmung der EGF-Freisetzung wurden kreisrunde LVG-Inserte mit einem Durchmesser von 4 cm, die nach Methode 2.2.1.1. hergestellt wurden, verwendet. Die EGF-Beladung entsprach 100  $\mu\text{g}$  EGF pro Insert. Zur besseren Handhabung wurden die Inserte in vier gleichgroße Segmente zerteilt. Als Freisetzungszellen dienten dicht verschließbare 20 ml Rollrandgläser. Als Freisetzungsmidium diente 10,0 ml BSS-Puffer (pH 7,4), der zur Minderung der starken Adsorptionstendenzen des EGF mit 0,1% (m/m) BSA versetzt war. Die Inkubation erfolgte im

Trockenschrank bei 37°C. Zu den Meßzeitpunkten wurden 200 µl Medium entnommen, in 1,5 ml Reagiergefäße (Fa. Ependorff, Deutschland) überführt und unverzüglich bis zur Aufarbeitung bei -80°C eingefroren. Vor der HPLC-Analyse wurde, um eventuell gelöstes Alginat abzutrennen, die Probe mit 50 µl Acetonitril versetzt, gut durchmischt und 15 Minuten bei 9000 g zentrifugiert. Aus dem Überstand wurden nun vorsichtig 150 µl in Microvials überführt und der Analyse zugeführt. Bei der Quervernetzung der Alginatfilme lösten sich bereits zwischen 6% und 10% des verwendeten EGF aus den Filmen. Bei der Bestimmung wurde deshalb der EGF-Gehalt nach der Quervernetzung als 100%-Wert angesehen.

### 2.2.7 Parameter der EGF-Freisetzung

#### 2.2.7.1 Variation der Alginatzusammensetzung

Da die EGF-Freisetzungsgeschwindigkeit von der Dichte der Alginatmatrix abhängig ist, und diese durch die physikalischen Eigenschaften der Alginat, wie das Molekulargewicht und das Verhältnis der Mannuronsäureblöcke zu Guronsäureblöcken bestimmt ist, wurde die EGF-Freisetzung aus folgenden vier Alginaten bestimmt: LVG; MVG; LVM; MVM. Die Herstellung der Inserte wurde wie in Punkt 2.2.1.1. beschrieben durchgeführt. Die Freisetzung erfolgte wie in Punkt 2.2.6. beschrieben.

#### 2.2.7.2 Calciumgehalt des Inserts

Zur Erhöhung der Quervernetzungsgüte wurde ein Insert mit erhöhtem Calciumchloridgehalt erstellt. Es wurden hierbei vor der Quervernetzung des getrockneten Inserts in das Alginatgel MVG 1,5 mg  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  pro Gramm verwendetes Gel eingearbeitet. Die Herstellung erfolgte wie in Punkt 2.2.1.1. beschrieben. Die Freisetzung wurde wie in Punkt 2.2.6. beschrieben durchgeführt.

#### 2.2.7.3 Zusatz von Porenbildnern

Eine weitere Möglichkeit das EGF-Freisetzungsverhalten zu modifizieren, ist durch den Zusatz wasserlöslicher Substanzen wie Hydroxyethylcellulose, die als Porenbildner dienen können, gegeben. Für diesen Versuch wurden Inserte mit einem Gehalt von 5% bzw. 10% Hydroxyethylcellulose verwendet. Die Cellulose wurde in Form eines 1%igen Gels in den entsprechenden Anteilen zu einer 1%igen Lösung

des Alginats LVG gegeben und eine 30 Sekunden auf einem Reagenzglasschüttler auf höchster Stufe (Reax, Fa. Heidolph, Deutschland) homogenisiert. Die weitere Vorgehensweise entsprach dem in Punkt 2.2.1.1. beschriebenen Verfahren. Die Freisetzung erfolgte wie in Punkt 2.2.6. beschrieben.

### 2.2.8 In-vitro-Erosion von HEC-Alginat-Inserten

Um vorab, ohne klinische Studie, das potentielle Abbauverhalten Hydroxyethylcellulosehaltiger Ca-Alginat-Filme einschätzen zu können, wurde die in-vitro-Erosionsgeschwindigkeit bestimmt. Hierzu wurden Ca-Alginat-Filme mit Hydroxyethylcellulosegehalten von 1%; 5%, 10% und 30% (m/m) durch Mischung entsprechender Mengen von einprozentigem Hydroxyethylcellulosegel mit einprozentigem LVG –Alginatgel hergestellt. Die weitere Verfahrensweise der Filmherstellung entsprach der von reinen Alginatfilmen.

Es wurden pro Hydroxyethylcellulosekonzentration vier Ansätze zubereitet. Jeder dieser Filme wurde mit einer Schere in sechs gleich große Segmente zerteilt, gewogen, und jedes Segment in ein 20 ml Rollrandglas (Rollrandgläser, Fa. Münsterstädter Glaswerke, Deutschland) gegeben, das mit 10 ml BSS-Puffer als Erosionsmedium gefüllt war. Jedem Filmsegment wurde eine Inkubationszeit zugeordnet. Die Inkubationszeiten betragen 13,5; 38; 62; 107; 133; 174 Stunden. Die Inkubation wurde in einem Schüttelwasserbad auf Stufe 3 bei 37°C durchgeführt (Typ1086, Fa. GFL, Deutschland). Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Filmsegmente über mindestens 24 Stunden bei 37°C getrocknet. Das Gewicht der getrockneten Filme wurde erneut bestimmt. Die statistische Bewertung der Ergebnisse erfolgte durch eine einfaktorielle Anova (Statistikprogramm, SPSS für Windows, Version 10.0.7, Fa. SPSS Inc.)

### 2.2.9 Insertverträglichkeit und in-vivo-Erosion

Um die objektive und subjektive Verträglichkeit der Inserte zu untersuchen, wurden EGF-freie, sterile Inserte 18 gesunden Probanden in den Bindehautsack des linken Auges appliziert, wo sie bis zu 3 Tagen verweilten. Der hierzu beim Zentrum für Klinische Studien der Universität Regensburg eingereichte und genehmigte Ethikantrag „ Toleranzstudie eines Placebo-Inserts zur Anwendung an der Augenoberfläche“ ist unter Antragsnummer 02/107 zu finden.

Um beurteilen zu können, ob die Inserte während der Applikationszeit erodieren, wurden sie vor dem Einsetzen gewogen. Nach der Entnahme wurden die Inserte zur Entfernung von wasserlöslichen Ablagerungen wie Schleime, Proteine, Salze und Staub, in BSS gewaschen, bei 37°C für 24 Stunden getrocknet und rückgewogen. Zum Einsatz kamen Inserte mit einem Hydroxyethylcellulosegehalt (HEC) von 5% (m/m) und 30% (m/m). Jeder Proband mußte sein subjektives Schmerzempfinden und Fremdkörpergefühl bei der Insertapplikation und während der Verweildauer des Inserts in einer Tabelle dokumentieren (Hierbei entsprachen Werte von 0 keiner Schmerzempfindung, Werte von 10 sehr starkem Schmerzempfinden). Objektive Kriterien für Unverträglichkeit, wie Irritationen der Bindehaut oder Hornhauterosionen, wurden durch einen Augenarzt festgestellt.

Der Versuchsaufbau ist in Tab. 6 dargestellt.

Tab. 6: Versuchsaufbau zur Insertverträglichkeit und in-vivo-Erosion

Teilnehmerzahl	Konzentration	Verweildauer
3	5% HEC	1Tag
3	5% HEC	2Tage
3	5% HEC	3Tage
3	30% HEC	1Tag
3	30% HEC	2Tage
3	30% HEC	3Tage

### 2.2.10 Klinische Pilotstudie mit EGF beladenen Inserten

Um vorab die Effektivität EGF-beladener Alginatinserte zur Behandlung der Keratoconjunctivitis sicca abschätzen zu können, wurden die Inserte in einer kleinen Pilotstudie bei 10 Patienten mit der Diagnose einer primären Keratoconjunctivitis sicca angewendet. Ein positives Votum des Zentrums für Klinische Studien der Universität Regensburg für die Studie „Lokale Applikation von EGF zur Therapie der Konjunctivitis sicca“, Antragsnummer 99/16 liegt vor.

#### 2.2.10.1 Teilnahmekriterien

Einschlußkriterien:

Probanden beiderlei Geschlechts und jeder Rasse waren zur Teilnahme an dieser Studie geeignet, wenn die im Folgenden genannten Anforderungen erfüllt waren:

- mind. 18 Jahre alt
- der Proband in der Lage und gewillt war, eine schriftliche Einverständniserklärung nach gründlicher Aufklärung abzugeben.

Ausschlusskriterien:

allgemein: rheumatische Grunderkrankungen, Autoimmunerkrankungen, Diabetes mellitus, infektiöse systemische Erkrankungen, Schwangerschaft und Stillzeit, schwer reduzierter Allgemeinzustand, psychische Erkrankungen.

Medikamenteneinnahme:  $\beta$ -Blocker, Antihistaminika, Cyclosporin, Steroide und andere Immunsuppressiva, Neuroleptika, Antidepressiva

ophthalmologisch: Lidanomalien, starke Blepharitis, akute Infektionen des Auges, Traumata des Auges innerhalb der letzten 3 Monate, vaskularisierte Hornhaut, schwerwiegende Hornhauterkrankungen, allergische Konjunktivitis, Gebrauch von Augentropfen (außer Sicca).

### 2.2.10.2 Studienablauf

Die Inserte wurden vom Patienten selbst mit einer mitgegebenen stumpfen Plastikpinzette am Morgen der Studientage 1 und 3 in den Bindehautsack des Unterlides eingesetzt (Technik wurde vom betreuenden Arzt demonstriert). Die Inserte blieben 48 Stunden im Bindehautsack. Beim Einsetzen des jeweils nächsten Inserts wurde das "alte" entfernt. Während der ersten beiden Studientage verwendete der Patient seine normalen Augentropfen zur Behandlung des trockenen Auges wie gewohnt. Ab dem Tag 3 der Studie sollte der Patient nach Möglichkeit auf zusätzliche Augentropfen verzichten. Falls wegen starker Beschwerden doch zusätzlich Augentropfen benutzt wurden, wurde dies auf einem mitgelieferten Fragebogen vermerkt. Am Morgen des 5. Studientags wurde das letzte Insert entfernt. Ab dem Tag 5 der Studie wurde kein Insert mehr eingesetzt; ebenso sollte der Patient dann nach Möglichkeit auch weiterhin auf zusätzlichen Augentropfen verzichten. Dadurch sollte untersucht werden, wie lange der EGF bedingte Effekt anhält (Tab. 7).

Untersuchungen der Patienten in der Augenklinik waren vor Beginn der Studie sowie am Tag 4, 7, 10 und 14 vorgesehen. War der Patient nach Ablauf dieser Zeit weiterhin beschwerdefrei, waren weitere Untersuchungen am Tag 22 bzw. bei weiterer Beschwerdefreiheit am Tag 29 vorgesehen.

Tab. 7: Schematische Darstellung des Studienablaufs

Tage mit Insert				Tage ohne Insert				
1	2	3	4	5	6	7	14	21
Eigene AT			Keine AT mehr					

### 2.2.10.3 Subjektive Bewertungskriterien

#### 2.2.10.3.1 Visuelle Befindlichkeitsskala

Mit Hilfe der Gesichterskala in Abbildung 7 sollten die Patienten ihr subjektives Befinden bezüglich der Augenprobleme dokumentieren. In der Skala entspricht sehr gutes Befinden dem Gesicht Nummer eins, sehr schlechtes Befinden dem Gesicht Nummer neun [65]. Die visuelle Befindlichkeit wurde an den Tagen 0, 4, 7 und 14 bestimmt.

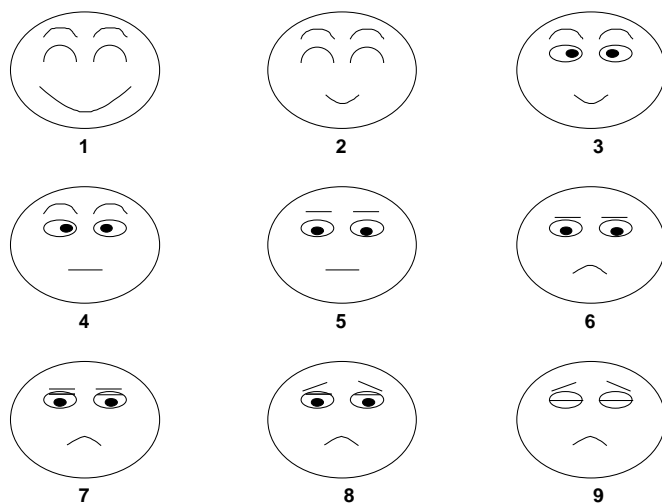


Abb. 7: Visuelle Befindlichkeitsskala

#### 2.2.10.3.2 Fragebogen

Den Patienten wurde zu Beginn der Studie ein Fragebogen ausgehändigt, auf dem sie ihre Bemerkungen während der Studie aufzeichnen konnten. Besonderes Augenmerk wurde hierbei auf Probleme beim Einsetzen der Inserte, auf die Verträglichkeit und auf Symptomveränderungen wie Brennen, Kratzen, Fremdkörpergefühl, Trockenheitsgefühl, Schmerzen, Lichtempfindlichkeit und erhöhtem Tränenfluß gelegt. Zur Bewertung dieser Symptome mußten die Patienten in einer Tabelle ihre Erfahrungen dokumentieren (Tab.7).

Tab.7: Bewertung von Brennen und erhöhtem Tränenfluß

Wert	Brennen / erhöhter Tränenfluß
5	Permanent
4	Häufig
3	Gelegentlich
2	Selten
1	Nie

### 2.2.10.4 Objektive Bewertungskriterien

#### 2.2.10.4.1 Veränderungen des Visus

Zu Beginn der Studie und zu allen Untersuchungszeitpunkten wurde der Visus der Patienten anhand standardisierter Zahlenreihen bestimmt, um etwaige entstandene Medientrübungen zu erkennen.

#### 2.2.10.4.2 Break up time (BUT)

Ein wichtiges Kriterium zur objektiven Beurteilung des Verlaufs der Keratoconjunctivitis sicca ist die Stabilität des Tränenfilms. Diese wurde über die Tränenfilmauflöszeit (BUT) an der Spaltlampe bestimmt. Dazu wurde ein Tropfen reinen Fluoreszeins in den Bindehautsack eingeträufelt und unter Vorschalten des Kobalt-Blaufilters der Zeitpunkt des ersten Aufreissens des Tränenfilms auf der Hornhautoberfläche beobachtet. Die Festlegung der Norm der physiologischen Benetzungsdauer ist schwierig (über 15 Sekunden), das Ergebnis kann nur im Rahmen der Gesamtbeurteilung des Krankheitsbilds gesehen werden [66]. Die BUT wurde bei den Patienten am Tag 0, 4, 7, 10, 14 bestimmt.

#### 2.2.10.4.3 Schirmer-Test

Beim primären trockenen Auge ist häufig die Tränensekretion vermindert. Zur Überprüfung der Tränensekretion wurde der Schirmer-Test durchgeführt :

Zuerst wurde überschüssige Tränenflüssigkeit abgetupft. Anschließend wurde ein 3,5 cm langer und 0,5 cm breiter Lackmuspapierstreifen abgeknickt und zwischen äußerem und mittlerem Drittel über die Unterlidkante gehängt. Bei intakter Tränenproduktion waren nach fünf Minuten mehr als 15 mm angefeuchtet [67].

### 2.2.10.4.4 Nebenwirkungen

Sowohl auf den Frage- als auch auf den Dokumentationsbögen war Platz für eventuell beobachtete Nebenwirkungen vorgesehen.

### 3 Ergebnisse und Diskussion

#### 3.1 Insertherstellung

Die nach der in Punkt 2.2.1.1. beschriebenen Methode hergestellten Inserte besitzen eine Länge und Breite von 5 mm X 3 mm und eine Oberfläche von ca. 13 mm<sup>2</sup>. Die durchschnittliche Dicke der Inserte beträgt 80-100 µm. Die transparenten, flexiblen, leicht opak schimmernden Inserte weisen homogenes Aussehen und eine glatte Oberflächenstruktur auf. (Abb. 8)

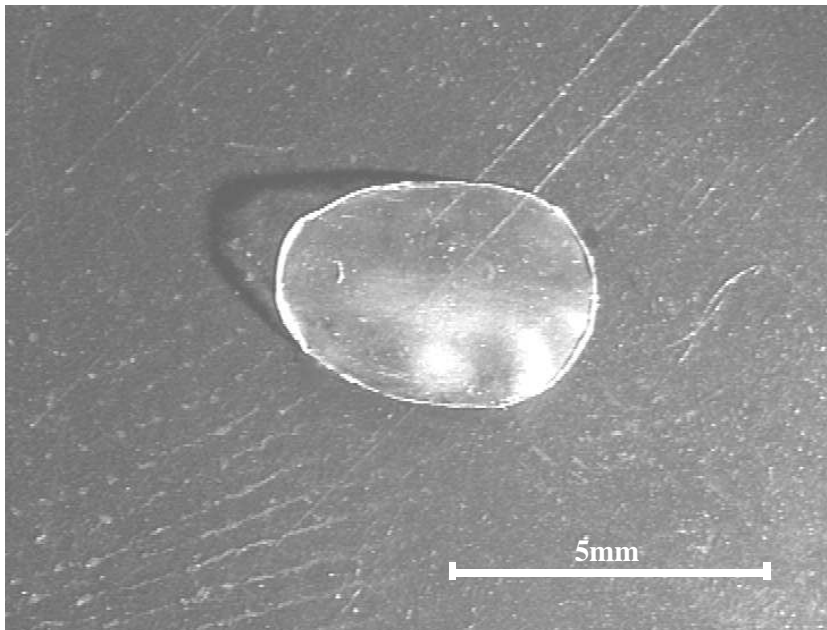


Abb. 8 : Darstellung eines Inserts, welches nach der in Punkt 2.2.1.1. beschriebenen Verfahrensweise hergestellt wurde.

##### 3.1.1 Quervernetzung von Alginat

Bei einer einminütigen Quervernetzung EGF-haltiger Alginatfilme wurden zwischen 5% und 10% des eingesetzten EGF freigesetzt. Um die EGF-Freisetzung zu minimieren, sollte die Quervernetzungsdauer so kurz wie möglich gehalten werden. Als Parameter der Güte der Quervernetzung in Abhängigkeit von der Quervernetzungsdauer wurde der Calciumgehalt von LVG-Alginatfilmen bestimmt. Als Quervernetzungszeiten wurden 1, 2, 5, 15, 30, und 120 Minuten gewählt. Die Ergebnisse der Bestimmung des Calciumgehalts in Abhängigkeit von der Quervernetzungszeit sind in Abbildung 9 grafisch dargestellt.

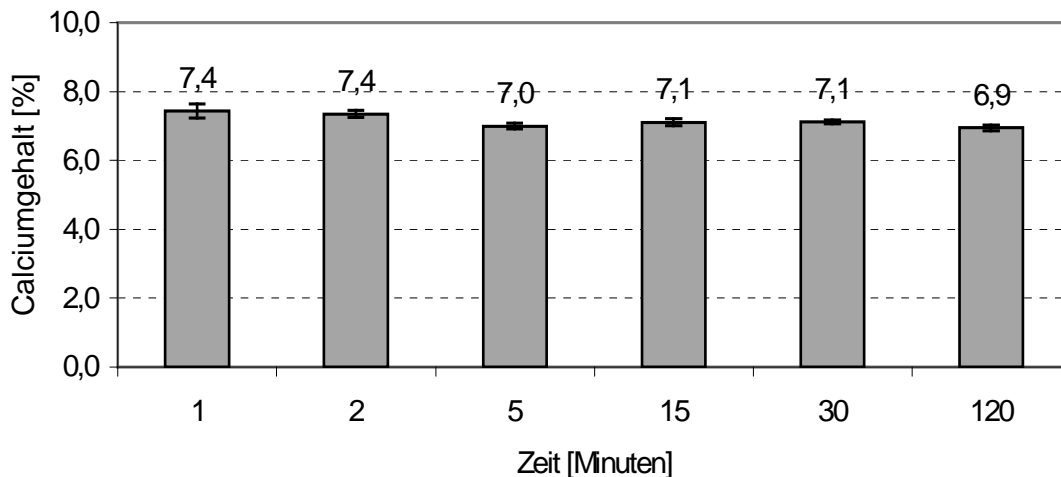


Abb. 9 : Darstellung des Calciumgehalts in % (m/m) in Abhängigkeit von der Quervernetzungsdauer

Wie das Balkendiagramm in Abb. 9 zeigt, ließ sich der Calciumgehalt der Alginatefilme durch längere Quervernetzungsdauer nicht steigern. Bereits nach einer Inkubation von einer Minute wiesen die Filme einen durchschnittlichen Calciumgehalt von 7,4% auf. Filme mit längeren Quervernetzungszeiten wiesen keine höheren Calciumkonzentrationen auf. Dieser Versuch bestätigt, daß ein Zeitraum von einer Minute genügt, ausreichend quervernetzte Filme herzustellen.

### 3.2 Analytik von EGF

#### 3.2.1 Quantitative und qualitative Analyse durch HPLC

Der quantitative und qualitative EGF-Nachweis erfolgte durch HPLC-Analytik. EGF wurde hierbei durch Fluoreszenz detektiert. Unter den angewendeten Bedingungen wurde EGF nach ca. 20 Minuten eluiert. (Abb. 10)

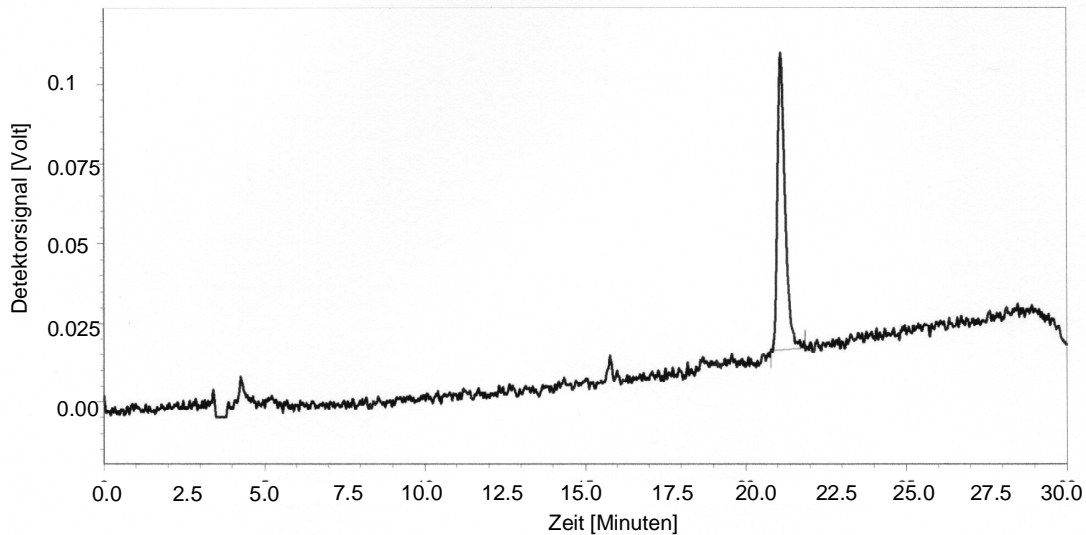


Abb. 10: Chromatogramm einer EGF-BSS-Lösung (500ng EGF/ml)

### 3.2.2 Quantitative und qualitative Analyse durch HPLC-MS

In Abb. 11 ist das Chromatogramm einer EGF-BSS-Lösung abgebildet. EGF wurde hierbei über vier Tage aus einem LVG-Film in einem offenem Gefäß freigesetzt. Dieser Versuch diente zur Beurteilung der Auswirkung von Sauerstoff auf EGF in wässriger Lösung.

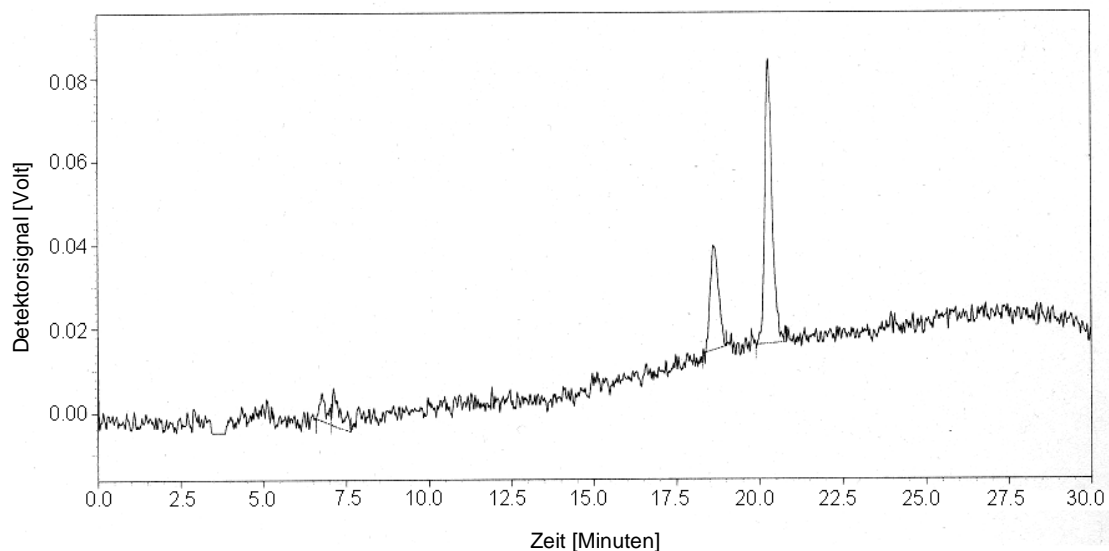


Abb.11: UV-Vis Chromatogramm des Freisetzungsmediums nach vier Tagen

Bei einer Retentionszeit von 18,00 und 20,06 Minuten ließen sich deutlich zwei Peaks erkennen. Bei der Vermessung mit Hilfe des Massenspektrometers ergab sich bei einer Retentionszeit von 18,00 Minuten eine Masse von 6232,4 Da (Abb. 12), bei einer Retentionszeit von 20,06 Minuten eine Masse von 6216,4 Da (Abb. 13).

## Ergebnisse und Diskussion

In den Massenspektren ließen sich unterschiedlich geladene EGF-Moleküle erkennen. Der Peak des vierfach positiv geladenen EGF war am stärksten ausgeprägt, so dass die ihm zugeordnete Masse für die Berechnung des Molekulargewichts verwendet wurde.

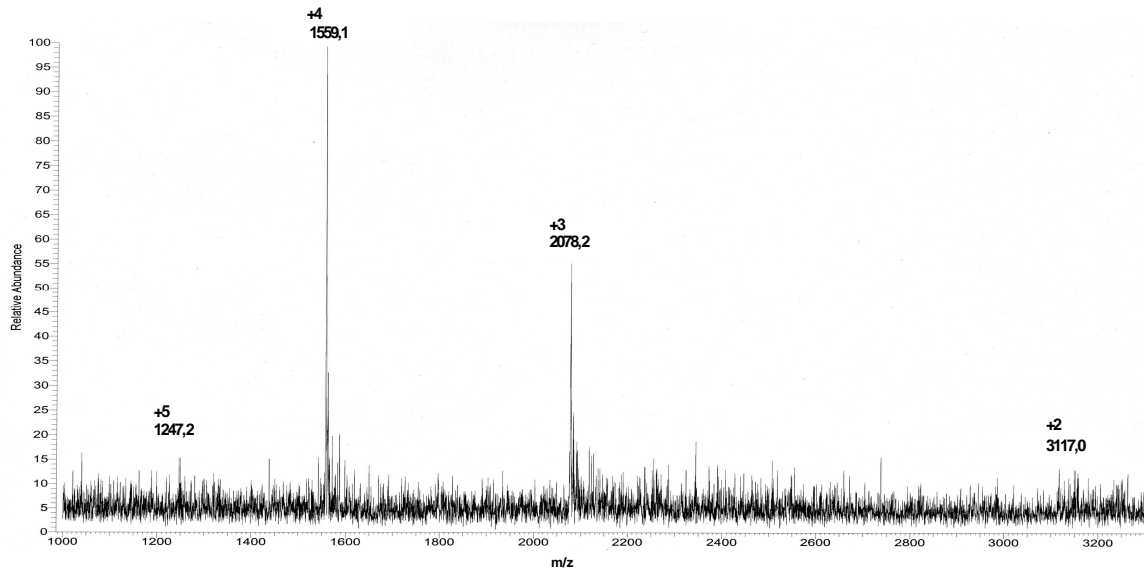


Abb. 12 : Massenspektrum des Peaks bei 18 Minuten

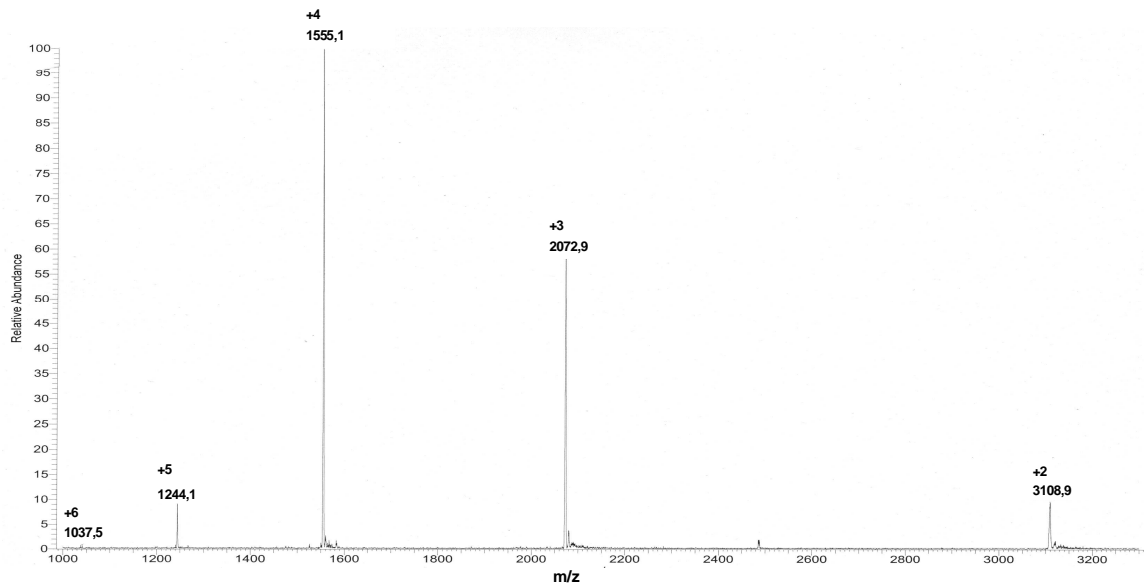


Abb. 13 : Massenspektrum des Peaks bei 20 Minuten

Addiert man die monoisotopische Masse aller 53 im EGF-Molekül enthaltenen Aminosäuren, so erhält man eine Masse von 6211,734 Da. Die durchschnittliche Masse aller Aminosäuren beträgt 6216,053 Da. Die experimentell ermittelte Masse des Signals bei 20,06 Minuten von 6216,4 Da entspricht der durchschnittlichen Masse

des EGF-Moleküls. Dies bestätigt die Annahme, daß es sich hierbei um reines unverändertes EGF handeln muß. Für das zweite Signal bei 18,00 Minuten läßt sich eine Masse von 6232,4 Da ermitteln. Die Masse dieses zweiten Signals ist um 16 Da erhöht. Dies entspricht genau der Masse eines Sauerstoffatoms. Es könnte sich also hier um ein Oxidationsprodukt von EGF handeln. Wie Nascimento 1988 bereits berichtete, besitzt humanes EGF einen Methioninrest und zwei Tryptophanreste, die oxidationsempfindlich sind [58;68]. Manning berichtete 1989, daß Methionin durch den in der Raumluft vorhandenen Sauerstoff zum Sulfoxid oxidiert werden kann [57]. Wurde beim Auflösen des EGF-Lyophilisats die EGF-Lösung z.B. durch Verwendung eines Vortex-Mischers sehr stark geschert, also hoher mechanischer Belastung ausgesetzt, so wurde die Retentionszeit von 20 Minuten auf ca. 5 Minuten verkürzt. Bei der massenspektrometrischen Analyse zeigte sich jedoch keine Veränderung der Masse. Die Veränderung der Retentionszeit könnte also durch eine Veränderung der Tertiärstruktur bedingt sein. Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde deshalb versucht, die mechanischen Belastungen auf EGF zu minimieren.

### 3.2.3 Gezielte Oxidation von EGF

Um die Ergebnisse, die in 3.2.2 erhalten wurden zu bestätigen, wurde EGF gezielt oxidiert. In Abbildung 14 sind zwei Chromatogramme übereinandergelegt dargestellt. Das Chromatogramm, das durch eine durchgezogene Linie dargestellt ist, stellt eine unbehandelte EGF-Lösung dar. Man kann bei der Retentionszeit von 20,06 Minuten den Peak von reinem EGF erkennen. Bei der Retentionszeit 18,00 Minuten läßt sich lediglich ein kleines Signal erkennen. Die EGF-Lösung, die mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> versetzt wurde, wird durch das gepunktete Chromatogramm dargestellt. Der Peak bei 20,06 Minuten ist hier nicht mehr vorhanden, jedoch läßt sich nun bei der Retentionszeit von 18,00 Minuten ein deutlicher Peak erkennen.

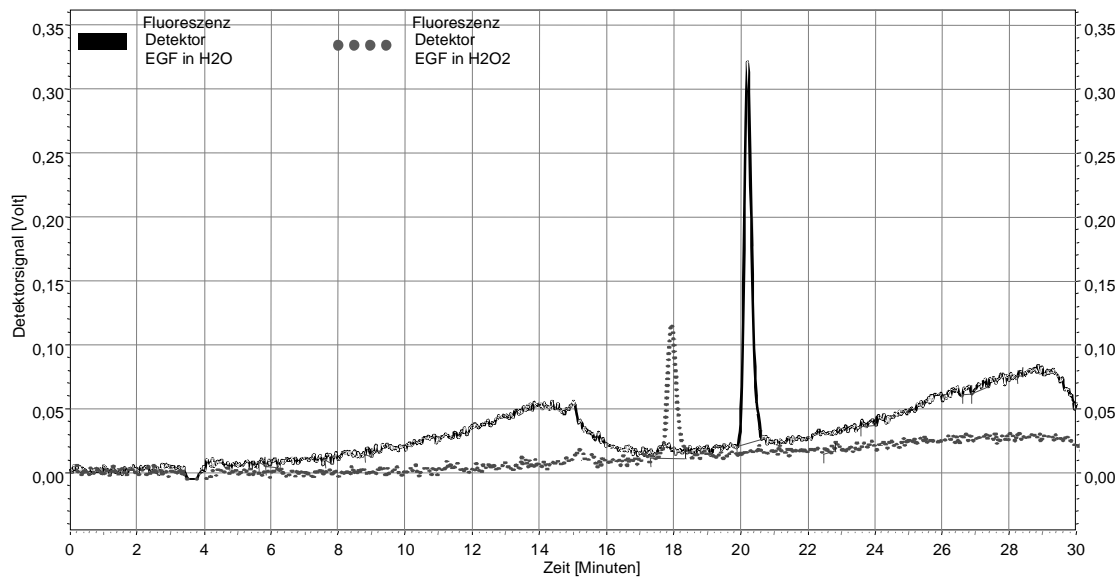


Abb. 15 : Chromatogramme von oxidiertem (18 Min.) und nicht oxidiertem (20 Min.) EGF

Dieser Versuch bestätigt die Ergebnisse der HPLC-MS-Analyse. Wie Abb. 15 zeigt, läßt sich EGF zu 100% in die oxidierte Form überführen. Durch die Versuche von Nascimento konnte mittels Aminosäureanalyse gezeigt werden, daß durch Zugabe von Wasserstoffperoxid nur Aminosäure 21 (Methionin), oxidiert wird und Methioninsulfoxid bildet. Diese oxidierte Form des EGF zeigt die gleiche biologische Aktivität wie nicht oxidiertes EGF [58]. Da sich die Anwesenheit des oxidierten EGF störend auf die quantitative Auswertung durch HPLC auswirkt, wurde versucht, den Kontakt von EGF-Lösungen mit Sauerstoff zu minimieren und die Bildung des Sulfoxids zu verhindern.

### 3.2.4 Trennung von EGF und Alginate

Für die quantitative Bestimmung des EGF-Gehalts alginathaltiger EGF-Lösungen durch HPLC war es notwendig, Alginate quantitativ, mit möglichst geringem Verlust an EGF, abzutrennen. Hierzu wurden drei unterschiedliche Trennmethode untersucht.

1. Fällung durch Bildung von wasserunlöslicher Alginsäure im Säuren.
2. Fällung durch Komplexbilden mit CaCl<sub>2</sub>.
3. Fällung durch Zugabe organischer Lösungsmittel.

Die „saure Abtrennung“ des Alginats durch Absenken des pH-Wertes unter den isoelektrischen Punkt des Alginats hatte sich bereits bei der Durchführung von Vorversuchen als untauglich erwiesen, da es bei diesem Verfahren nicht möglich

war, das Alginat quantitativ abzutrennen. Die Alginatabtrennung durch Zugabe von Calciumchlorid bzw. Acetonitril erwiesen sich als weit besser geeignet.

Tab. 8: Ergebnisse der Alginatabtrennung

Ansatz	Zusammensetzung	EGF - Wiederfindungsrate in %
1	Alginat + Acetonitril	0
2	Alginat + CaCl <sub>2</sub>	0
3	BSS + EGF + Acetonitril	99,9
4	BSS + EGF + CaCl <sub>2</sub>	30,0
5	Alginat + EGF + Acetonitril	93,8
6	Alginat + EGF + CaCl <sub>2</sub>	30,4
7	BSS + EGF + Acetonitril	100,0

Wie aus Tab. 8 ersichtlich, führte die Zugabe von Acetonitril zu einer BSS-EGF-Lösung (Ansatz 7) zu keiner Reduktion des EGF-Gehalts. Die Zugabe einer CaCl<sub>2</sub>-Lösung zu einer BSS-EGF-Lösung führte zu einer Reduktion des EGF-Gehalts um ca. 70% (Ansatz 4). Bei dem im Versuch verwendeten pH-Wert von 7,4, also einem Wert oberhalb des isoelektrischen Punkts von EGF (pH 4,6) [59], liegt EGF negativ geladen vor. Ca<sup>2+</sup>-Ionen können hier mit dem Protein wasserunlösliche Komplexe bilden, die durch die verwendete Analytik nicht nachweisbar waren. Des Weiteren kann die hohe Ionenkonzentration zu Desolvationseffekten (Aussalzen von Proteinen) führen. Die Abtrennung des Alginats aus einer EGF-haltigen Lösung führte ebenso zu EGF-Verlusten von fast 70% (Ansatz 6). Aus diesen Ergebnissen ist ersichtlich, daß die Abtrennung von Alginat durch Bildung von wasserunlöslichem Ca-Alginat ungeeignet ist.

Die Abtrennung des Alginats durch Zugabe von organischen Lösungsmitteln wie Acetonitril zur Löslichkeitsreduzierung des Alginats führte hingegen trotz des hohen Alginatgehalts von 60% zu befriedigenden Ergebnissen. Es wurden durchschnittlich nur 6,2% des gelösten EGF abgetrennt.

Wie Ansatz 3 zeigt, führte auch die hohe mechanische Belastung von 9000 g beim Zentrifugieren zu keiner Verminderung des EGF-Gehalts.

In dem vorangegangenen Versuch wurden extreme Bedingungen simuliert, die nicht den realen Bedingungen der EGF-Freisetzung aus Alginatinserten entsprechen. Zur Ermittlung des potentiellen EGF-Verlusts durch Alginatabtrennung nach EGF-Freisetzung aus Alginatinserten wurden EGF-Alginat-Lösungen mit einem Alginatgehalt von 1,25% (m/m) verwendet.

## Ergebnisse und Diskussion

Tab. 9: EGF-Verluste durch Alginateabtrennung

<b>Ansatz:</b>	<b>Zusammensetzung:</b>	<b>EGF-Gehalt in ng/ml</b>	<b>Ø Wiederfindung [%]</b>
1	0,05 ml Alginat 1,95 ml BSS 1,00 ml EGF-Lösung 1,00 ml Acetonitril	2500	<b>95,2</b>
2	0,05 ml Alginat 2,45 ml BSS 0,50 ml EGF-Lösung 1,00 ml Acetonitril	1250	<b>100,8</b>
3	0,05 ml Alginat 2,70 ml BSS 0,25 ml EGF-Lösung 1,00 ml Acetonitril	625	<b>103,2</b>
4	0,05 ml Alginat 2,80 ml BSS 0,15 ml EGF-Lösung 1,00 ml Acetonitril	375	<b>102,2</b>

Aus der Tabelle 9 ist ersichtlich, daß auch geringe Mengen Alginat gut ohne nennenswerte EGF-Verluste abgetrennt werden konnten. Die Verwendung von unterschiedlich konzentrierten EGF-Lösungen hatte bei diesen Versuchsbedingungen keinen Einfluß auf den EGF-Verlust.

### 3.3 Adsorption von EGF

#### 3.3.1 Adsorptionsminderung durch Silanisieren

In diesem Versuch wurden zur Beurteilung der Wirkung von silanisierten bzw. nicht silanisierten Gefäßen auf die Adsorption von EGF an Gefäßwände von Rollrandgläsern die in Tab. 10 beschriebenen Ansätze angefertigt.

Tab. 10: Ansätze zur Beurteilung der Adsorptionsminderung durch Silanisieren

<b>Lösungsmittel</b>	<b>pH-Wert</b>	<b>Oberflächenbehandlung</b>
H <sub>2</sub> O	5,6	nicht silanisiert (NS)
H <sub>2</sub> O	5,6	silanisiert (S)
H <sub>2</sub> O	10,8	nicht silanisiert (NS)
H <sub>2</sub> O	10,8	silanisiert (S)
Tris-Puffer	7,4	nicht silanisiert (NS)
Tris-Puffer	7,4	silanisiert (S)
BSS-Puffer	7,4	nicht silanisiert (NS)

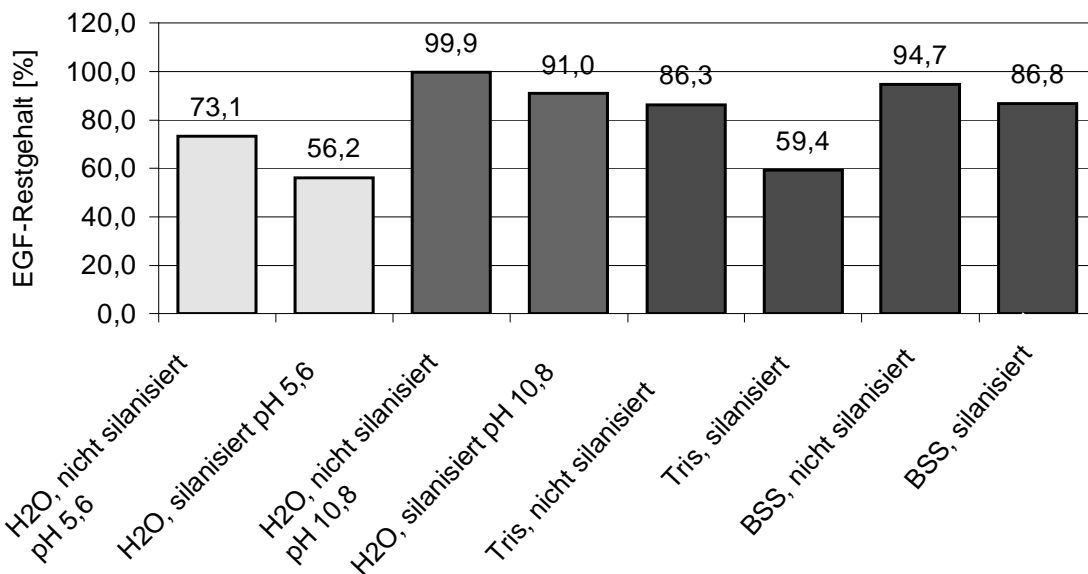


Abb. 16: Ergebnisse des Adsorptionsversuchs

Wie aus Abb. 16 ersichtlich, weist EGF-Lösung, die mit Wasser pH 5,6 verdünnt wurde, in nicht silanisierten Rollrandgläsern nach der Inkubation eine Minderung des Gehalts um 26,9% , in silanisierten Gefäßen einen Verlust von 43,8% auf. Bei der Verdünnung mit Wasser vom pH 10,8 findet man in den nicht silanisierten Gefäßen 99,9% der eingesetzten EGF Menge wieder, wohingegen in den silanisierten Gefäßen nur 91,0% EGF wiederzufinden sind. Man kann hier deutlich erkennen, daß die Tendenz des EGF im Sauren an Grenzflächen zu binden, sehr viel stärker ausgeprägt ist als im Alkalischen. Der Unterschied von silanisierten zu nicht silanisierten Gefäßen ist bei sauren pH-Werten stärker ausgeprägt. Bei einem pH-Wert von 5,6 beträgt er 16,9%, bei einem Wert von pH 10,8 hingegen nur 8,9%. Wird die EGF-Lösung mit Tris-Puffer pH 7,4 verdünnt so beträgt der EGF-Gehalt in nicht silanisierten Gefäßen 86,3%, in silanisierten Gefäßen 59,4%. Bei Verwendung von BSS pH 7,4 tritt bei nicht silanisierten Gefäßen ein adsorptionsbedingter EGF-Verlust von 5,3% auf, bei silanisierten Gefäßen ein Verlust von 13,2%. Auch bei Tris-Puffer und BSS-Puffer ist bei den silanisierten Rollrandgläsern die Adsorption stärker ausgeprägt als bei den unbehandelten Rollrandgläsern. BSS-Puffer eignet sich besser als Medium für Freisetzen, da in ihm die adsorptiven Tendenzen der mit Sigmacote behandelten und der unbehandelten Gläser weniger stark ausgeprägt sind.

Die Silanisierung bewirkt eine Lipophilisierung der Glasoberfläche, dadurch sollte die Adsorption des hydrophilen EGF verringert werden. Wie dieser Versuch gezeigt hat,

fürte die Oberflächenbehandlung mit Sigmacote zu einer Steigerung des adsorptionsbedingten EGF-Verlustes. In den weiteren Versuchen wurde deshalb auf die Silanisierung der verwendeten Gefäße verzichtet.

### 3.3.2 Adsorptionsminderung durch BSA Zugabe

Zur Überprüfung der adsorptionshemmenden Wirkung von BSA wurde die Freisetzung aus EGF-beladenen Filmen in BSA haltigem FreisetzungsmEDIUM und in BSA freiem FreisetzungsmEDIUM bestimmt. In Abbildung 17 sind die EGF-Freisetzungsglyphen von Filmen in BSA haltigem und BSA freiem FreisetzungsmEDIUM dargestellt.

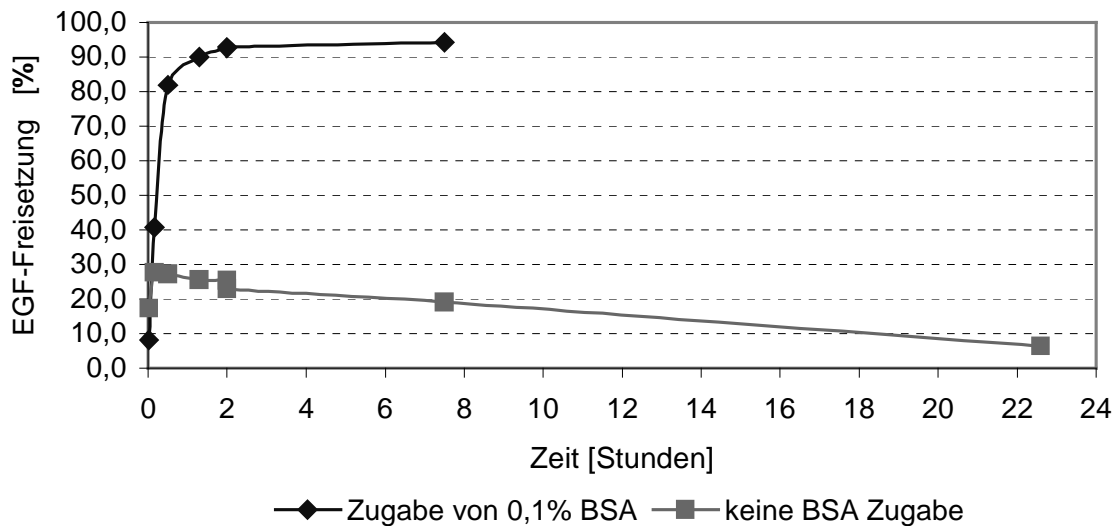


Abb. 17 : EGF-Freisetzung in BSA haltigem und BSA freiem Medium

Der Graph der Freisetzung in BSA freiem FreisetzungsmEDIUM zeigt ein Maximum bei ca. 10 Minuten. Bis zu diesem Zeitpunkt ließen sich maximal 27,8% des eingesetzten EGF im BSS-Puffer nachweisen. Nach Erreichen des Maximums fiel der EGF-Gehalt im Puffer konstant ab. Der Gehalt betrug am letzten Entnahmezeitpunkt nach 22,5 Stunden nur noch 6,4%. Der Graph der Freisetzung in FreisetzungsmEDIUM mit 0,1%igem BSA-Anteil erreicht sein Freisetzungsmaximum mit 94,2% nach 7,5 Stunden. Nach einer Inkubationsdauer von 78 Minuten waren jedoch schon 90,0 % des inkorporierten EGF freigesetzt. Im Gegensatz zu BSA-freiem Puffer ließ sich bei Verwendung von BSA-haltigem Puffer kein Absinken des EGF-Gehalts feststellen. Wie aus den beiden Freisetzungskurven ersichtlich, führte der Zusatz von 0,1% BSA zu einer Verdreifachung des im FreisetzungsmEDIUM meßbaren EGF. Diese Verdreifachung ist auf die deutlich verringerte Adsorption des

EGF zurückzuführen. Wie stark die Adsorptionstendenzen alleine schon im Freisetzungsgefäß bzw. an den Alginatfilmen ausgeprägt sind, lässt sich an der Freisetzung ohne BSA erkennen, bei der der Gehalt nach Erreichen des Freisetzungsmaximums innerhalb von 22 Stunden noch um 21,4% absank.

Für alle weiteren Freisetzungsversuche wurde, basierend auf diesen Ergebnissen, nur noch 0,1% BSA-haltiger BSS-Puffer verwendet.

### 3.4 Stabilität von EGF

Stabilitätsuntersuchungen mit EGF wurden in Form eines klassischen isothermen Streßtests bei fünf verschiedenen Temperaturen ( 30°C; 37°C; 45°C; 55°C; 65°C) durchgeführt.

Die Temperaturabhängigkeit des EGF-Abbaus war deutlich zu erkennen (Abb. 18). Je höher die Lagertemperatur der EGF-Lösung gewählt wurde, desto schneller erfolgte der Abbau von EGF. Bei einer Lagertemperatur von 30°C waren nach einer Inkubationszeit von 60 Tagen noch durchschnittlich 78,3% des eingesetzten EGF vorhanden. Bei 37°C waren nach 60 Tagen noch durchschnittlich 63,6% EGF nachweisbar. Die Inkubation bei 45°C erfolgte für 33 Tage. Nach diesem Zeitraum konnten noch im Durchschnitt 53,3% EGF detektiert werden. Nach 15 tägiger Inkubation bei 55°C wurden durchschnittlich 57% EGF nach gewiesen. Nach 6 Tagen bei 65°C wurden im Durchschnitt noch 37,6% des eingesetzten EGF wiedergefunden. (Abb. 18)

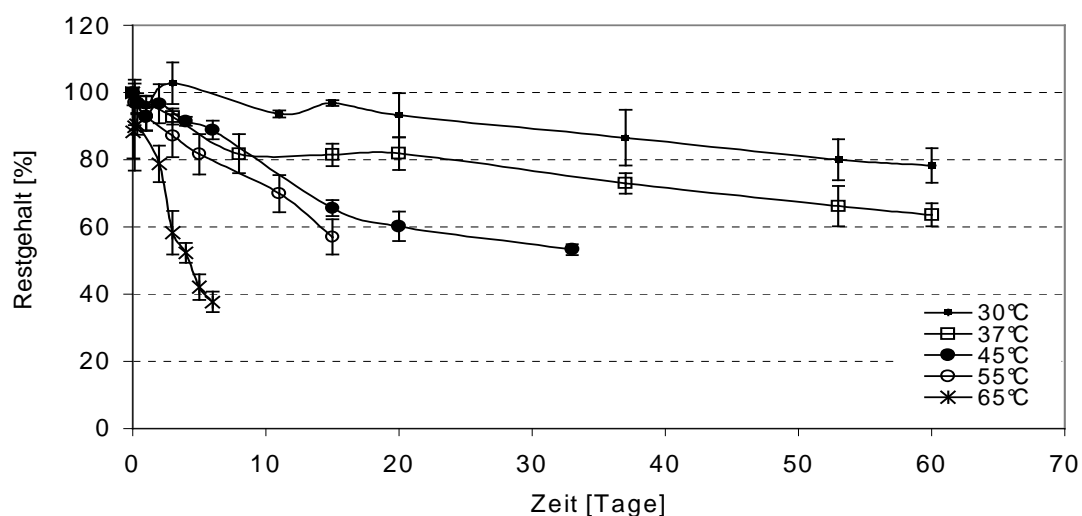


Abb. 18: Abbau von EGF bei verschiedenen Temperaturen

## Ergebnisse und Diskussion

Durch die Logarithmierung der Restgehalte und Auftragung gegen die Zeit war deutlich zu erkennen, daß die Abbaureaktion bei allen Temperaturen mit einer Kinetik pseudo-erster Ordnung beschrieben werden kann. (Abb. 19)

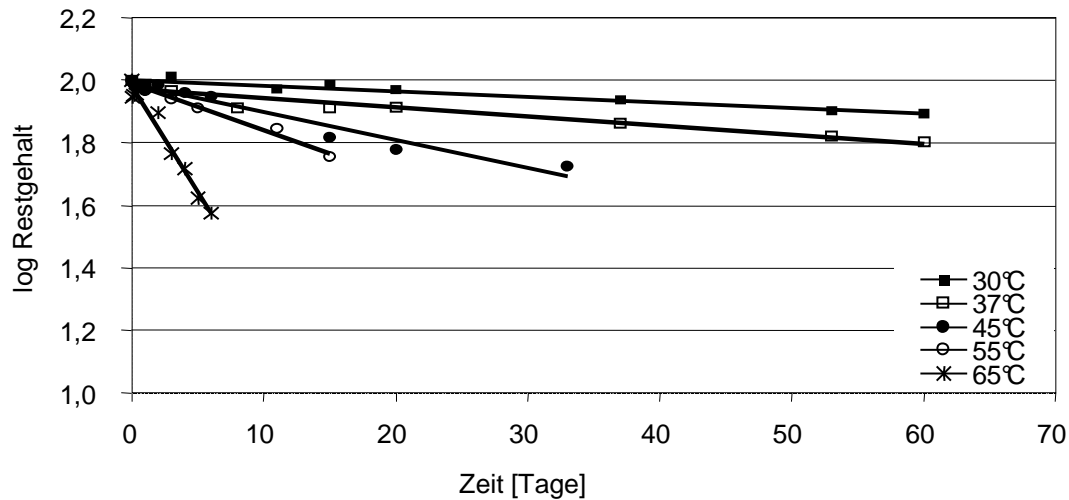


Abb. 19 : Semilogarithmische Auftragung des Restgehalts gegen die Zeit

Tab. 11: Ergebnisse aus Abb. 18

Temperatur	Geradengleichung	Korrelationskoeffizient	ln k
30°C	$y = -0,0018x + 2,00$	$R^2 = 0,9399$	-6,32
37°C	$y = -0,0029x + 1,97$	$R^2 = 0,9282$	-5,84
45°C	$y = -0,0089x + 1,99$	$R^2 = 0,9518$	-4,72
55°C	$y = -0,0149x + 1,99$	$R^2 = 0,9859$	-4,21
65°C	$y = -0,0675x + 1,98$	$R^2 = 0,976$	-2,70

Ausgehend von den Ergebnissen aus Abbildung 18 wurde angenommen, daß der Reaktionsmechanismus des Abbaus bei allen verwendeten Inkubationstemperaturen identisch ist. Abbildung 20 zeigt den Arrheniusplot für die erhaltenen Geschwindigkeitskonstanten.

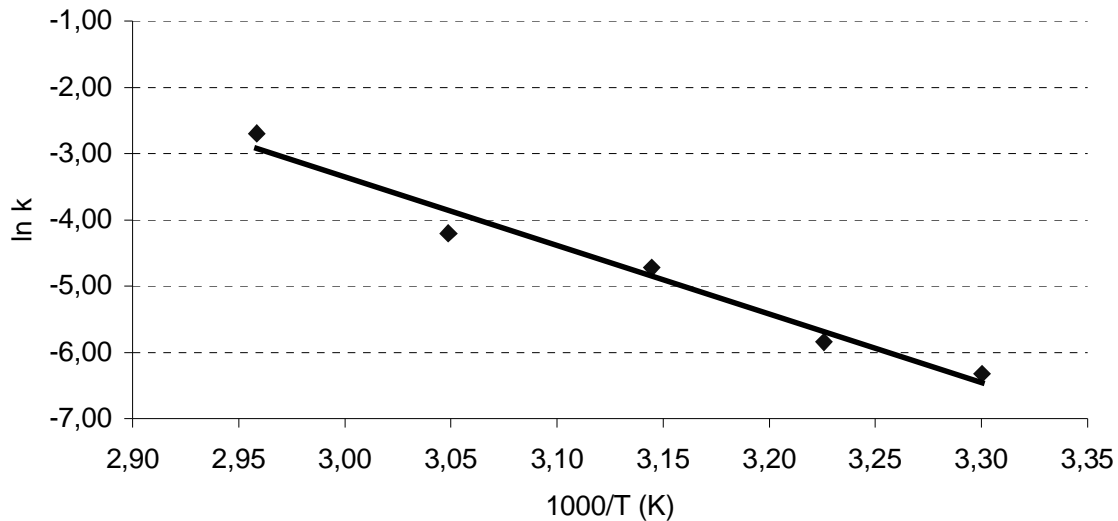


Abb. 20: Arrhenius-Plot: Abbau von EGF

Die Halbwertszeit bei Raumtemperatur, erhalten durch Extrapolation der Regressionsgeraden auf 21°C (294 K), beträgt 1260 Tage. Die pharmazeutische Haltbarkeit, [69] nach der noch 90% des Wirkstoffs vorhanden sein müssen, beträgt 191 Tage.

### 3.5 Beeinflussungsmöglichkeiten der EGF-Freisetzung

#### 3.5.1 Variation der Alginatzusammensetzung

Da die chemische Zusammensetzung der Alginat die Freisetzungskinetik von EGF beeinflusst, wurden in den EGF-Freisetzungsversuchen vier unterschiedliche Alginat verwendet.

In Abbildung 21 ist das EGF-Freisetzungsverhalten aus den vier verwendeten Alginaten dargestellt. Das Freisetzungsverhalten von Alginat LVM wurde vierfach bestimmt, das Freisetzungsverhalten der Alginat LVG, MVM und MVG wurde dreifach bestimmt.

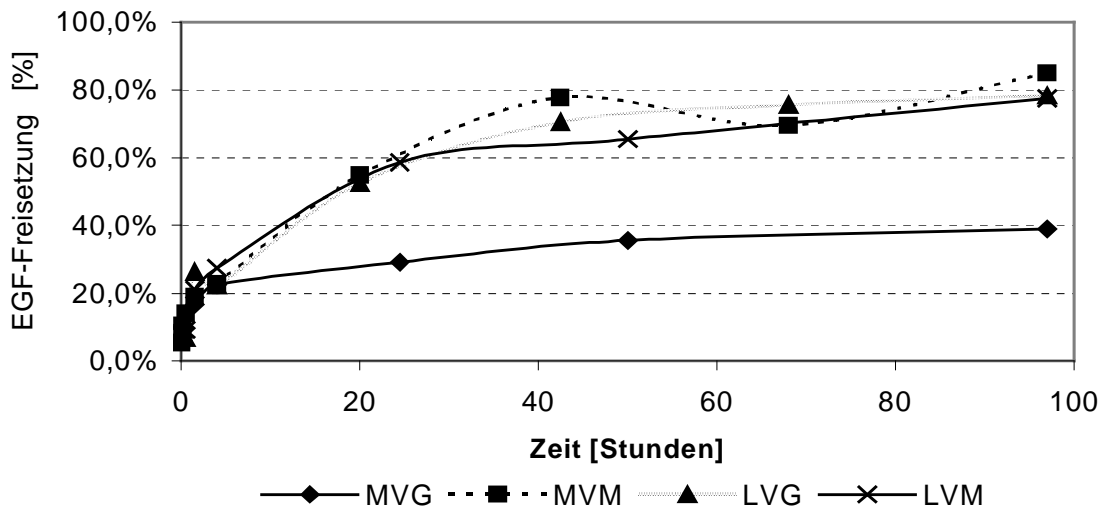


Abb. 21 : Freisetzungsverhalten der Alginate LVG, LVM, MVM und MVG; (n = 1)

Die EGF-Freisetzungen aus den Inserten der Alginate MVM, LVM und LVG besaßen eine nahezu identische Freisetzungskinetik. Innerhalb der ersten 1,5 Stunden wurden ca. 20% des inkorporierten EGF freigesetzt. Danach sank die Freisetzungsgeschwindigkeit leicht ab. Die maximal freigesetzte EGF-Menge lag bei dem LVM-Film bei 77,5%, bei dem LVG-Film bei 78,35% und bei dem MVM-Film bei 85% und wurde nach 97 Stunden Inkubation erreicht. Der Graph der EGF-Freisetzung aus MVG-Filmen weicht deutlich von den übrigen Freisetzungskurven ab. Bis zur Probennahme nach 1,5 Stunden setzte das System 16,6% EGF frei und setzte danach EGF deutlich verzögert frei. Nach 97 Stunden wurden lediglich 39,0% des inkorporierten EGF freigesetzt.

Die Ursache der abweichenden Freisetzung aus MVG Alginate wird in der Literatur sehr kontrovers diskutiert [24;70;71]. Übereinstimmung besteht jedoch in der Beurteilung der Flexibilität der Molekülketten in quervernetzten Hydrogelen. Die Flexibilität der quervernetzten Alginateketten im Gel ist von der chemischen Zusammensetzung abhängig: Am flexibelsten ist dabei ein Gemisch aus gleichen Anteilen Mannuron- und Gularonsäure, dann folgen Alginate mit überwiegendem Mannuronsäureanteil, und am starrsten sind Alginate mit sehr hohem Gularonsäureanteil [25]. Dies liegt an der Tatsache, dass eine Calciumquervernetzung der Alginate ausschließlich über die Gularonsäureblöcke erfolgt, d.h., je höher der Gehalt an Gularonsäuremonomeren ist, desto fester und spröder wird das entstehende Gel. Gele mit hohem Mannuronsäureanteil dagegen weisen eine deutlich höhere Elastizität auf [24;71].

Die Schlüsse, die daraus gezogen werden, sind jedoch höchst unterschiedlich. So hat Amsden in Diffusionsversuchen mit bovinem Serumalbumin in Ca-Alginatgelen gezeigt, daß die Diffusionsgeschwindigkeit von gelöstem Protein in Alginatgelen mit abnehmender Molekülkettenflexibilität, das heißt mit zunehmendem Guluronsäureanteil, abnimmt [24]. Der Autor ist der Ansicht, daß Gele mit größerer Molekülkettenflexibilität zu größeren Maßen aufquellen als weniger flexible Polymere. Der durchschnittliche Abstand der Molekülketten bei flexibleren Alginaten sei somit größer als bei unflexibleren, wodurch Proteine leichter durch das Gelgerüst diffundieren könnten. Darüber hinaus könnten die flexibleren Molekülketten beim Diffundieren des gelösten Proteins ausweichen und somit die Diffusion weniger behindern als unflexible Molekülketten [24;70;72].

Gombotz ist völlig anderer Ansicht: Gele, die aus Alginaten mit einem hohen Guluronsäureanteil von etwa 70% (m/m) bestehen, besäßen eine sehr hohe mechanische Festigkeit, neigten in nur sehr geringem Maß zum Schrumpfen und wiesen eine hohe Porosität auf. Durch diese Eigenschaften wäre die Proteindiffusionsrate höher als in Gelen mit niedrigerem Guluronsäureanteil. Allerdings weist Gombotz darauf hin, daß quervernetzte Alginatgele mit hohem Guluronsäureanteil nach einer vollständigen Trocknung, wie es bei unseren Inserten der Fall ist, nur im geringen Maße wieder aufquellen, was zu einer höheren Alginatdichte und somit zu einer reduzierten Porengröße führt. Durch das Trocknen erfahren also insbesondere die Filme mit hohem Guluronsäuregehalt eine Retardierung der Proteindiffusion [71].

In den Freisetzungsuntersuchungen dieser Arbeit werden die Aussagen von Amsden und Gombotz nur teilweise bestätigt: Wie die Freisetzung von EGF aus LVG zeigt, genügt ein hoher Gehalt an Guluronsäure alleine nicht, um die Freisetzung zu verzögern. Ebenso genügt die Verwendung von höher viskosen Alginaten wie MVM alleine auch nicht, um eine deutliche Retardierung der Proteindiffusion zu erreichen. Wie die Freisetzung aus Alginat MVG zeigt, führt nur das Zusammentreffen von hochviskosem Alginat mit einem hohen Anteil an Guluronsäureblöcken zu einer Reduzierung der Molekülkettenflexibilität, was in der Folge zu einer deutlich meßbaren Verzögerung der EGF-Freisetzung führt.

### 3.5.2 Erhöhung des Calciumgehalts im Insert

In Abbildung 22 ist der Verlauf der EGF-Freisetzung eines Inserts aus 1%iger MVG-Alginatlösung dargestellt, welche mit 1,5 mg Calciumchloriddihydrat pro Gramm Gel vor der endgültigen Quervernetzung vorbeladen worden war. Durch den Zusatz von Calcium sollte in diesem Versuch ebenso wie durch die Variation der Alginatzusammensetzung Einfluß auf die EGF-Freisetzung genommen werden. Auf der Abszisse wurde der zeitliche Verlauf, auf der Ordinate das freigesetzte EGF [%] aufgetragen.

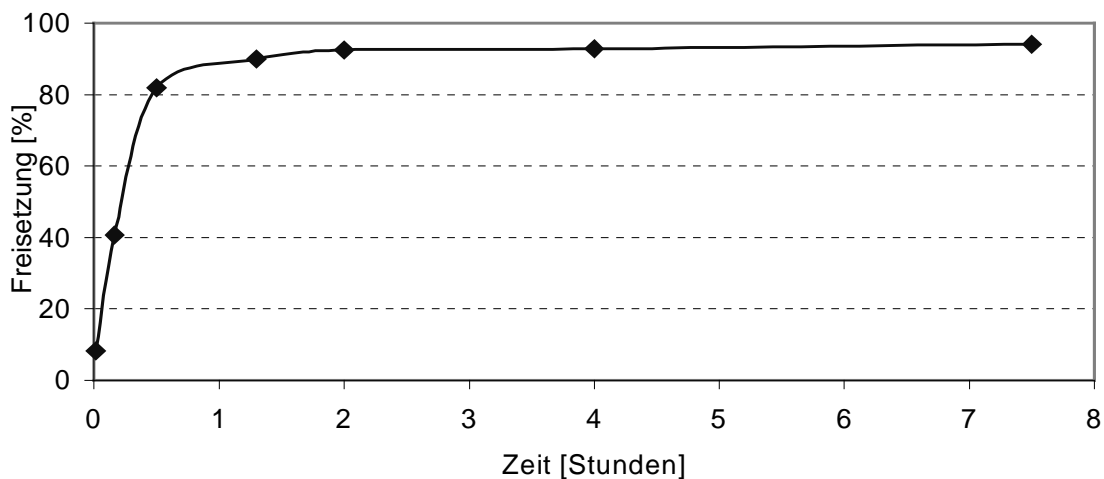


Abb. 22 : Freisetungsverhalten des Alginats MVG mit erhöhtem Calciumgehalt

Aus Abbildung 22 läßt sich erkennen, daß bereits nach 30 Minuten über 80% des EGF aus dem Insert freigesetzt wurden. Das Freisetzungsmaximum mit über 90% des EGF war nach ca. zwei Stunden erreicht. Es müßten aber Inserte mit einem hohen Calciumgehalt durch die Ausbildung eines besonders dichten und starren Alginatgerüsts EGF nur sehr langsam diffundieren lassen. Die dagegen nachgewiesene schnelle EGF-Freisetzung läßt sich durch die Beschaffenheit des Inserts erklären: Getrocknete Inserte ohne erhöhte Calciumgehalte sind relativ flexibel und besitzen eine sehr glatte homogene Oberfläche (Abb. 23 a). Inserte mit hohen Calciumgehalten hingegen sind sehr spröde und brüchig. Sie weisen eine sehr inhomogene Oberfläche mit zahlreichen Erhöhungen und Vertiefungen auf (Abb. 23 b). Wie Gombotz 1998 berichtete, kann die Trocknung von Alginaten mit sehr hohem Guluronsäureanteil und damit sehr stark quervernetzten Gelgerüst zur

Ausbildung von Rissen in der Matrixoberfläche führen [71]. All dies führt zu einer starken Vergrößerung der Oberfläche und somit zu der raschen Proteinfreisetzung.

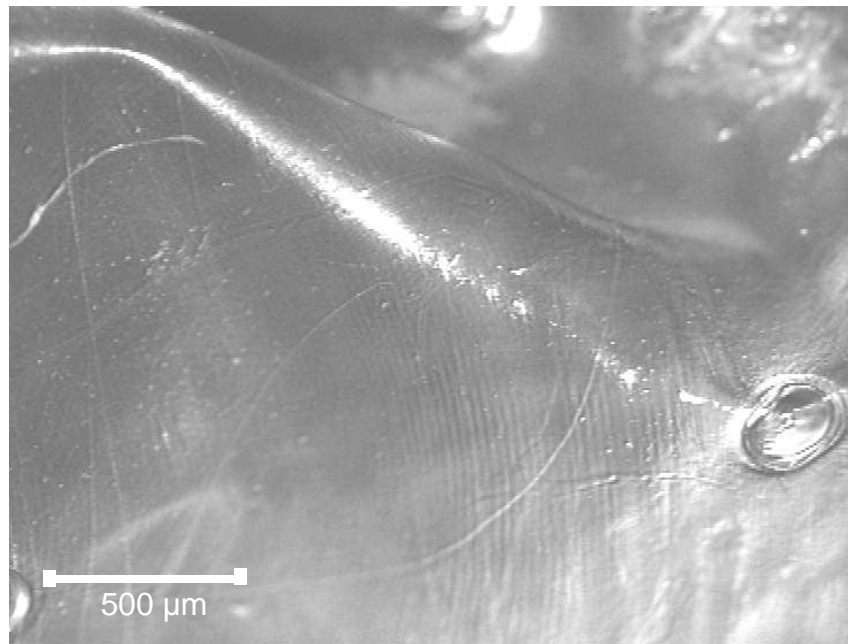


Abb. 23 a Lichtmikroskopische Aufnahme eines LVG-Inserts ohne Zusatz von Calcium zum Gel vor der Quervernetzung; Das Insert weist eine homogene und glatte Oberfläche auf.

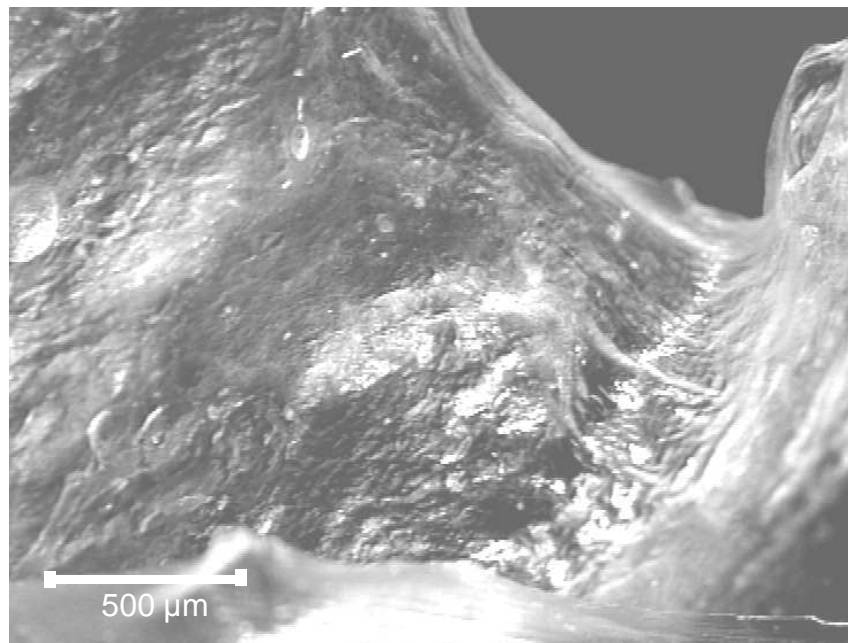


Abb. 23 b Lichtmikroskopische Aufnahme eines LVG-Inserts mit Zusatz von Calcium zum Gel vor der Quervernetzung; Das brüchige, spröde Insert weist eine inhomogene Oberfläche auf.

### 3.5.3 Zusatz von Porenbildnern

In Abbildung 24 ist das Freisetzungsverhalten von LVG-Inserten dargestellt, in die Konzentrationen von 5% bzw. 10% (m/m) Hydroxyethylcellulose eingearbeitet wurden. Dadurch sollte gezeigt werden, daß durch den Zusatz wasserlöslicher Polymere als Porenbildner das Freisetzungsverhalten gezielt verändert werden kann. Auf der Abszisse wurde der zeitliche Verlauf der Freisetzung, auf der Ordinate die prozentual freigesetzte Menge EGF aufgetragen.

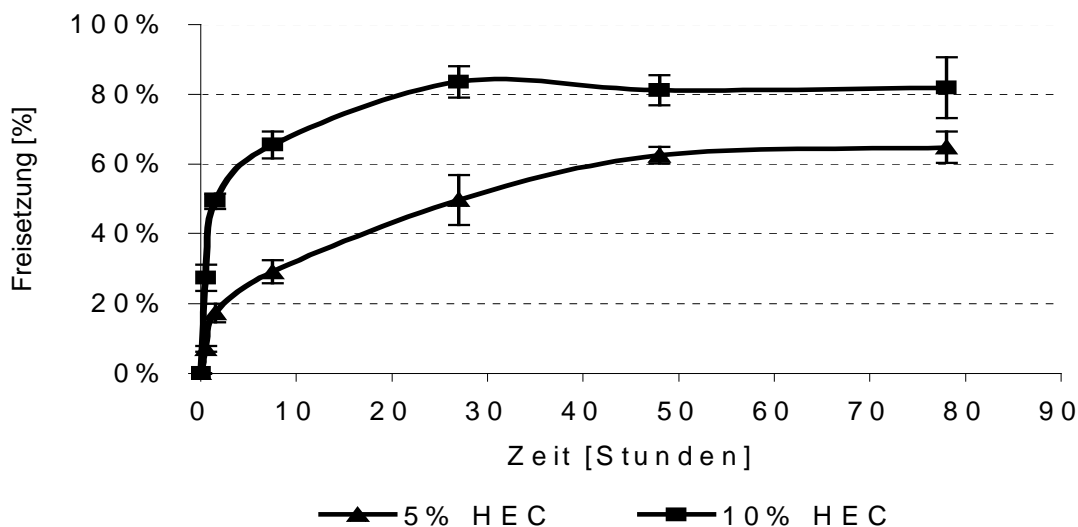


Abb. 24 EGF-Freisetzung aus Hydroxyethylcellulosehaltigen Alginatinserten

Inserte mit einem 5%igen Hydroxyethylcellulosegehalt gaben innerhalb der ersten vier Stunden ca. 1/3 der Gesamtfreisetzungsmenge ab. Danach wurde EGF für ca. 43 Stunden nahezu linear freigesetzt. Im Anschluß sank die Freisetzungsgeschwindigkeit und erreichte das Freisetzungsmaximum nach ca. 62 Stunden. Zu diesem Zeitpunkt waren etwa 65% des verwendeten EGF in die BSS-Lösung übergegangen. Inserte mit 10% Hydroxyethylcellulosegehalt gaben innerhalb der ersten fünf Stunden ca. 75% der Dosis ab. In den anschließenden 25 Stunden wurde EGF annähernd linear abgegeben. Danach verzögerte sich die Freisetzung. Die Maximalmenge von ca. 85% war nach 32 Stunden erreicht. Aus dem Diagramm läßt sich erkennen, daß die Erhöhung des Hydroxyethylcellulosegehalts von 5% auf 10% den Freisetzungszeitraum halbierte. Wie die in vitro Erosionsversuche von Punkt 3.6 zeigen, löste sich innerhalb weniger Stunden der komplette Anteil der inkorporierten Hydroxyethylcellulose aus den Inserten. Dadurch entstehen Poren und Kanäle in den Inserten, die zu einer stark vergrößerten Diffusionsoberfläche führen

und somit zu einer beschleunigten Freisetzung von EGF. Je höher also der Gehalt an Hydroxyethylcellulose, desto stärker kann sich ein Kapillarsystem ausprägen und somit die Proteinfreigabe beschleunigen.

### 3.6 In-vitro-Erosion von Hydroxyethylcellulose-Alginat-Inserten

Um vorab - ohne klinische Studie - das potentielle Erosionsverhalten der Inserte bestimmen zu können, wurde ein in vitro-Versuch durchgeführt. Es wurden LVG-Alginat-Filme mit unterschiedlichem Gehalt an HEC über eine Woche in BSS-Puffer bei 37°C inkubiert. Die Abbildungen 25 a-d zeigen den Gewichtsverlust der Filmsegmente in Prozent. Auf der x-Achse sind die Entnahmezeitpunkte aufgetragen. 13,5; 38; 62; 107; 133; 174 Stunden.

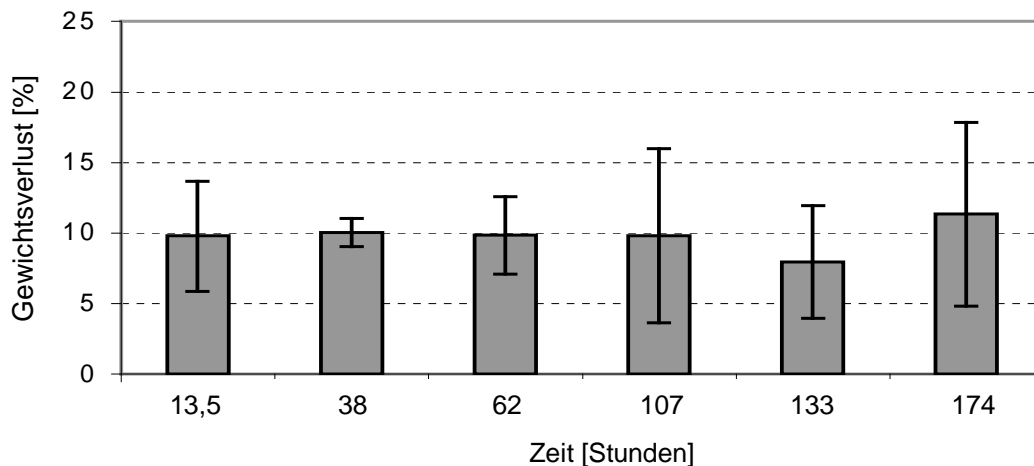


Abb. 25.a: Erosionsverhalten von LVG-Inserten mit 1%igem Hydroxyethylcellulosegehalt

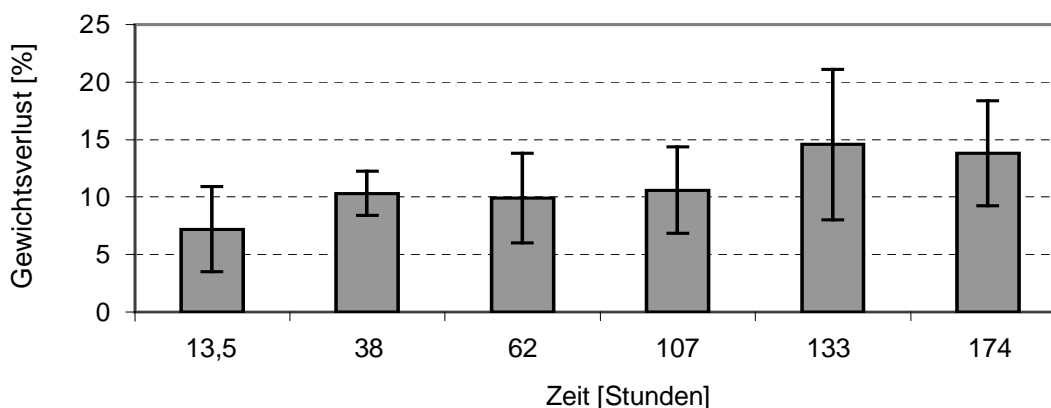


Abb. 25.b : Erosionsverhalten von LVG-Inserten mit 5%igem Hydroxyethylcellulosegehalt

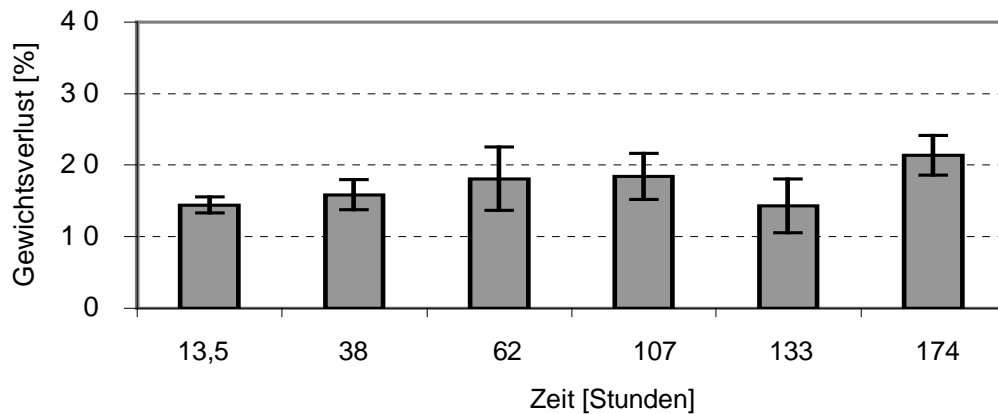


Abb. 25.c : Erosionsverhalten von LVG-Inserten mit 10%igem Hydroxyethylcellulosegehalt

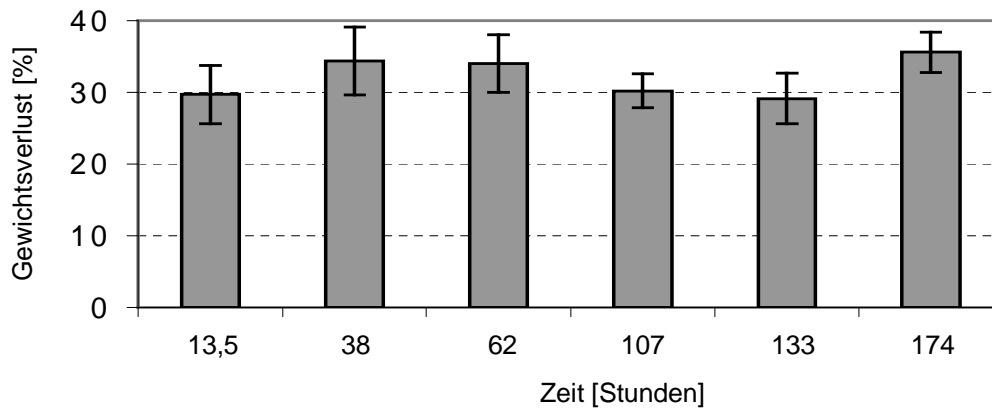


Abb. 25.d : Erosionsverhalten von LVG-Inserten mit 30%igem Hydroxyethylcellulosegehalt

Alle entnommenen Filmsegmente waren intakt und in ihrer Ausgangsform erhalten. Bereits nach 13,5 Stunden war der größte Teil der verwendeten HEC aus den Alginatefilmen herausgelöst. Innerhalb einer jeden Konzentrationsreihe blieb der jeweilige Gewichtsverlust statistisch signifikant konstant über die Zeit. Im einzelnen betrug der durchschnittliche Gewichtsverlust bei 1%igen HEC-Filmen 9,8%, bei 5%igen 11,1% und 10%ige Filme verloren durchschnittlich 17,1% an Gewicht. Die Filme mit einem 30%igen HEC-Gehalt wiesen einen durchschnittlichen Verlust von 32,1% auf. Der Gewichtsverlust war bedingt durch das Herauslösen der Hydroxyethylcellulose, nicht quervernetztem Alginat und  $\text{CaCl}_2$ -Kristallen auf der Oberfläche der Filme, die von der Quervernetzung herrührten. Geht man von der Annahme aus, daß Hydroxyethylcellulose annähernd vollständig aus dem Film herausgelöst wird, so ergibt sich bei den mit 1% Hydroxyethylcellulose beladenen Filmen ein nicht durch HEC bedingter Verlust von durchschnittlich 8,8%. Hierbei ist

das Gewicht der  $\text{CaCl}_2$ -Kristalle zu vernachlässigen, da sich die Masse der Kristalle erst in der zweiten Kommastelle bemerkbar machen würde. Der 8,8%ige Gewichtsverlust müßte demnach also durch nicht quervernetztes und damit herauslösbares Alginat bedingt sein. Da bei allen Filmen die gleiche Quervernetzungsmethode verwendet wurde, sollte auch bei allen Filmen das nach Abzug des jeweiligen HEC-Gewichts übrige Restgewicht, also der Anteil an herausgelöstem Alginat, in etwa identisch sein (Die sinkende Alginatkonzentration bei steigender HEC-Konzentration wurde hier vernachlässigt.). Bei 5%igen HEC-Alginatfilmen beträgt aber der nach Abzug des theoretischen Gewichts der HEC übrige Gewichtsverlust nur 6,1%, bei 30%igen HEC-Alginatfilmen sogar nur 2,1% im Durchschnitt. Eine mögliche Erklärung hierfür könnten HEC-Verluste bereits bei der Quervernetzung sein. Bei der späteren Wägung der quervernetzten Filme ginge man dann fälschlicherweise von einem zu hohen HEC-Gehalt aus. Dies würde im weiteren Verlauf zu der dann falschen Annahme führen, daß weniger gelöstes Alginat bei steigender HEC-Konzentration abgegeben worden wäre.

### 3.7 Insertverträglichkeit

Zur Beurteilung der objektiven und subjektiven Verträglichkeit der Inserte wurde 18 Freiwilligen jeweils ein Placeboinsert des Alginattyps LVG für ein, zwei oder drei Tage in den Bindehautsack des linken Auges appliziert. (Abb. 26)

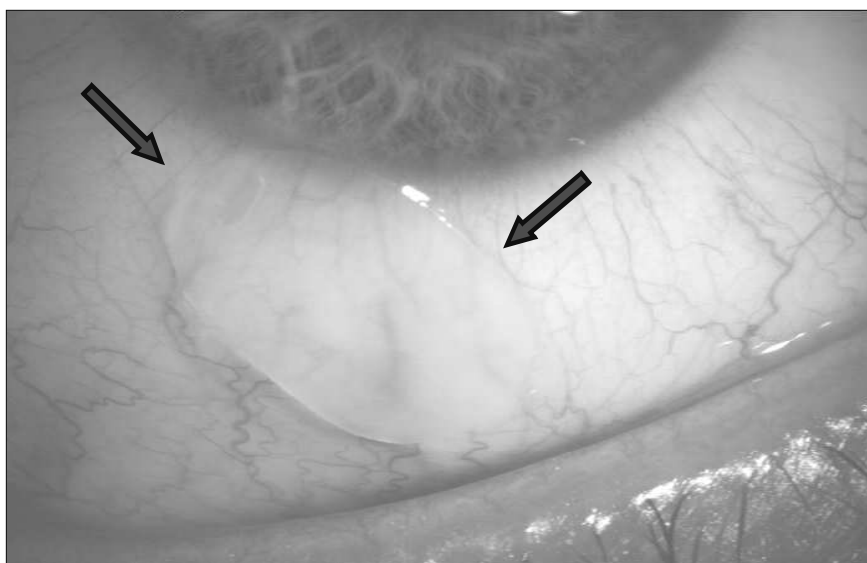


Abb.26 : in den Bindehautsack des linken Auges appliziertes Insert

Von den 18 Teilnehmern dieser Studie haben 11 das Insert die vorgeschriebene Zeit getragen, 4 Teilnehmer haben das Insert verloren. 3 Teilnehmer haben das Insert wegen Unverträglichkeit frühzeitig entfernt. Zwei der Probanden, welche das Insert aus Gründen der Unverträglichkeit frühzeitig entfernt hatten, hielten sich während der Versuchsdauer in Räumen auf, in denen sehr stark geraucht wurde. Bei Nichtrauchern löst Zigarettenrauch eine starke Reduktion der Tränenproduktion aus. Diese Tatsache könnte zu der Unverträglichkeitsreaktion geführt haben. Insgesamt berichteten 89% der Studienteilnehmer über ein vorhandenes Fremdkörpergefühl innerhalb der ersten 30 Minuten nach Insertapplikation. Im weiteren Verlauf trat das Fremdkörpergefühl nur bei Verrutschen des Inserts auf. Insbesondere empfanden die Studienteilnehmer ein Wandern des Inserts unter das Oberlid als sehr unangenehm. Keiner der Teilnehmer berichtete über weitere Nebenwirkungen.

Um die durchschnittlichen subjektiv empfundenen Schmerzen grafisch darzustellen, wurde das subjektive Schmerzempfinden auf der y-Achse und die Dauer der Applikation auf der x-Achse dargestellt. (Abb. 27)

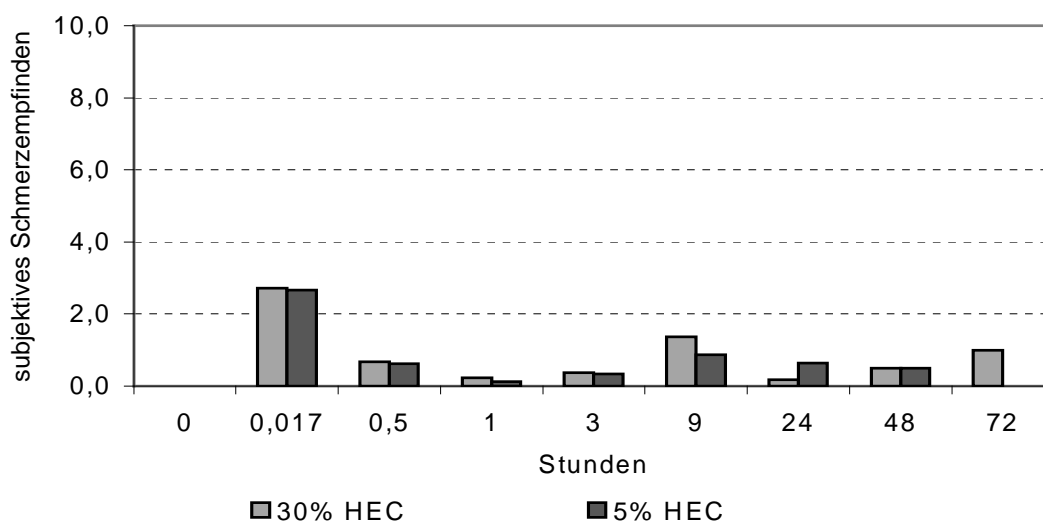


Abb. 27 : Darstellung des durchschnittlichen subjektiven Schmerzempfindens der 18 Probanden

Wie aus der Grafik zu erkennen, verursachten die Inserte direkt nach der Applikation durchschnittliche Schmerzen der Stärke drei. Die Probanden beschrieben diese als ein Brennen am Applikationsort. Die Inserte sind zum Zeitpunkt des Einsetzens nicht isoton. Das heißt, größere Mengen Calcium, die kristallin nach der Quervernetzung als Rest auf dem Insert vorliegen, gehen in Lösung und führen zu einem hypertonen Tränenfilm, der lokal zu einer Reizung führt. Des weiteren sind die trockenen Inserte

zum Zeitpunkt der Applikation relativ starr und unflexibel und werden deshalb als unangenehm und als Fremdkörper empfunden. Um dieses Brennen und den Fremdkörperreiz zu umgehen, wäre es daher sinnvoll, die Inserte vor Applikation für fünf Minuten in isotoner Kochsalzlösung zu spülen, um überschüssiges Calcium zu entfernen und um eine Vorquellung der Inserte zu erreichen, so daß sie sich gut an den Augapfel anschmiegen können.

Nach ca. 9 Stunden ist im Diagramm ein Anstieg der empfundenen Schmerzen zu erkennen. Dieser Anstieg war durch die drei Probanden bedingt, die den Versuch frühzeitig aufgrund von Unverträglichkeit beendet hatten. Im weiteren Verlauf wurde das Insert gut vertragen. Die Schwankungen der Schmerzkurve im Verlauf waren nur noch durch Verrutschen des Inserts bedingt.

### 3.8 In vivo Erosion von HEC-Alginat-Inserten

In Balkendiagramm Abb. 28 ist das in-vivo-Erosionsverhalten der Inserte dargestellt. Die schwarzen Balken dienen als Referenz und stellen das in vitro Insertgewicht mit einem Hydroxyethylcellulosegehalt von 5% bzw. 30% zu den Meßzeitpunkten 1Tag, 2Tage und 3Tage (1T, 2T, 3T) dar.

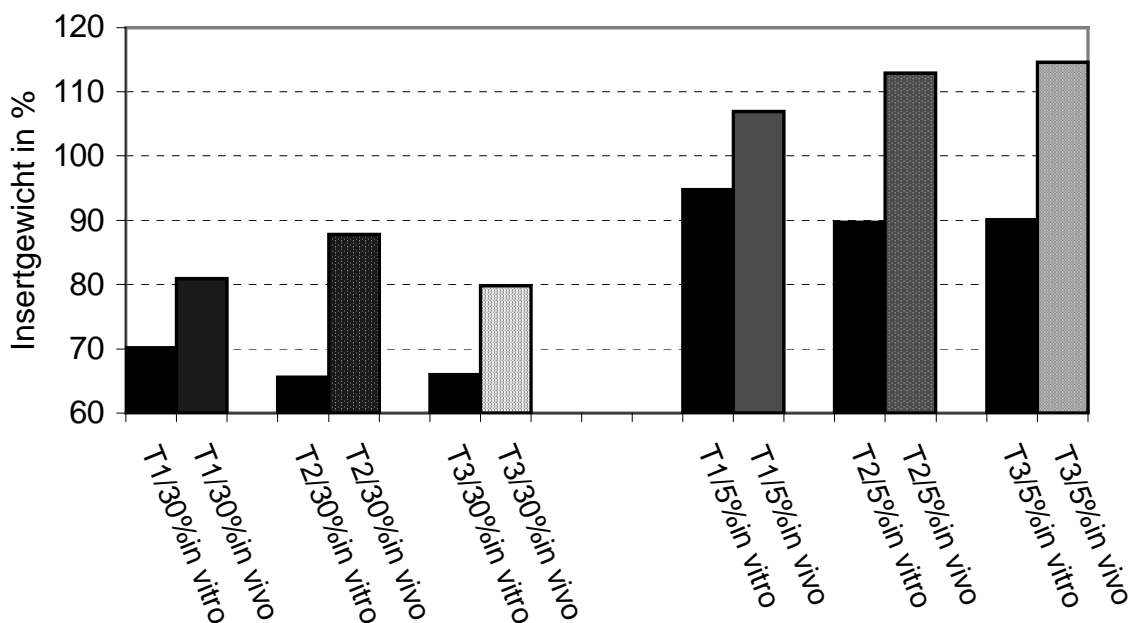


Abb. 28 : Erosionsverhalten der Inserte in vivo / in vitro; Die Inserte enthielten einen Zusatz von 30% bzw. 5% Hydroxyethylcellulose; T 1-3 ≈ Tag 1-3;  
 ■ ≈ Zusatz von 30% Hydroxyethylcellulose    ■ ≈ Zusatz von 5% Hydroxyethylcellulose

Inserte mit einem 30%igem Gehalt an Hydroxyethylcellulose verloren innerhalb von ein bis drei Tagen nach Applikation durchschnittlich ca. 17,2% ihres Ausgangsgewichts. Es war innerhalb der drei Meßzeitpunkte keine Tendenz in der Gewichtsveränderung festzustellen. Inserte mit einem Hydroxyethylcellulosegehalt von 5,0% wiesen nach einem Tag eine Gewichtszunahme von durchschnittlich 6,9% auf. Nach zweitägiger Applikation erhöhte sich das Gewicht um durchschnittlich 12,9% und nach drei Tagen um 14,6%. Man konnte innerhalb der drei Versuchstage eine deutliche Zunahme des Insertgewichtes feststellen. Die verwendeten Referenzinserte, bei denen das Auflöseverhalten in vitro bestimmt wurde, wiesen innerhalb des ersten Tages einen Gewichtsverlust auf, der der eingearbeiteten Masse an Hydroxyethylcellulose entsprach. Innerhalb des zweiten Tages nahm das Gewicht um weitere 5% ab. Am dritten Tag fand keine wesentliche Änderung des Gewichts mehr statt. Die Gewichtsabnahme am zweiten Tag ist vermutlich durch zusätzlich herausgelöstes Alginat bedingt. Auffällig ist, daß die 30% HEC in vivo-Inserte in Vergleich zu den 30% HEC in-vitro-Inserten einen um durchschnittlich 15,6% geringeren Gewichtsverlust aufwiesen. Die 5% HEC in-vivo-Inserte wiesen am ersten Tag nach Insertapplikation einen um 12,1% geringeren Gewichtsverlust auf. Nach zwei Tagen einen um 23,2% und nach drei Tagen einen um 24,5% geringeren Gewichtsverlust als die Referenzinserte auf. Da die Hydroxyethylcellulose sich sehr leicht aus den Inserten löst, kann angenommen werden, daß nach eintägiger Insertapplikation das Insert frei von HEC ist. Es handelte sich hier also nicht um einen geringeren Gewichtsverlust, sondern um eine nach Herauslösen der HEC und des Alginats stattfindende Gewichtszunahme. Dies erklärt auch die Gewichte der 5% HEC-Inserte von 106,9%, 112,9% und 114,6%. Die Gewichtszunahme ist vermutlich durch wasserunlösliche Substanzen bedingt, wie z.B. Proteine, Schleimstoffe, Salze und Staub, die sich sehr fest an die Inserte anlagern können.

### 3.9 Klinische Pilotstudie mit EGF beladenen Inserten

#### 3.9.1 Subjektive Bewertungskriterien

##### 3.9.1.1 Visuelle Befindlichkeitsskala

Mit Hilfe der visuellen Befindlichkeitsskala konnten die Patienten ihr Befinden im Verlauf der Studie dokumentieren. Hierbei entsprach ein Wert von 1 einem sehr guten Befinden, ein Wert von 9 einem sehr schlechten Befinden. Da es sich um eine

Pilotstudie mit nur 10 Patienten handelte, wurde auf eine statistische Auswertung verzichtet.

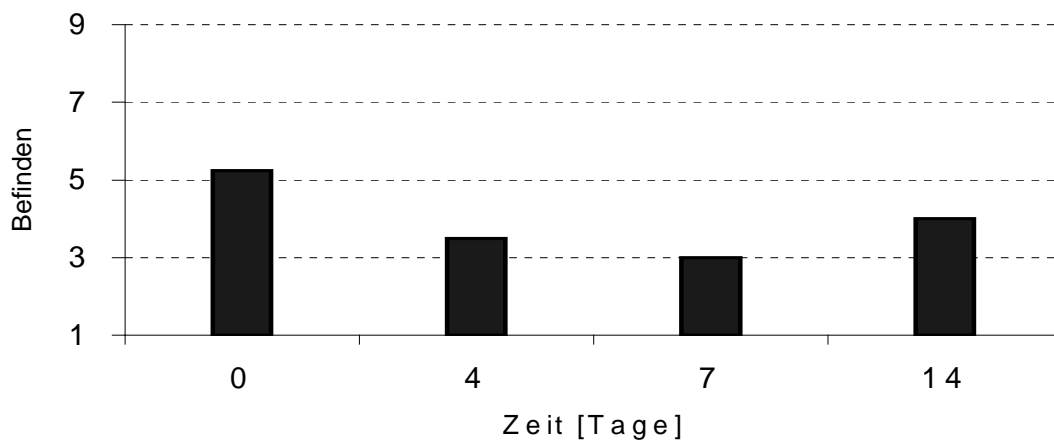


Abb. 29: Darstellung der visuellen Befindlichkeit im Studienverlauf

Zu Beginn der Studie gaben die Patienten durchschnittlich einen Wert von 5,3 für ihr subjektives Befinden an. Am vierten Studientag wurde ein durchschnittlicher Wert von 3,5 ermittelt, am siebten Studientag ein durchschnittlicher Wert von 3,0. Nach 14 Tagen ließ sich ein Wert von 4,0 feststellen. Aus dem Graphen in Abbildung 29 läßt sich während der ersten vier Versuchstage eine Steigerung des Wohlbefindens erkennen. Selbst nach Entfernen des letzten Inserts nahm das Wohlbefinden noch bis zu siebten Tag hin zu. Erst ab dem 8. Tag der Studie nahm das subjektive Wohlbefinden langsam ab. Es erreichte jedoch mit einem Wert von 4 nicht den Ausgangswert von 5,3.

### 3.9.1.2 Fragebogen

In dem die Studie begleitenden Fragebogen wurden die Patienten zu ihren Erfahrungen vor und während der Studie befragt. Alle Patienten konnten nach eigenen Angaben das Insert mühelos selbst applizieren. Zwei Patienten gaben an, beim Insertwechsel am Morgen des dritten Versuchstages das alte Insert nicht sofort wiedergefunden zu haben.

Die Verträglichkeit der Inserte wurde von 90% der Patienten als sehr gut empfunden. Ein Patient entfernte das Insert bereits nach drei Tagen frühzeitig aufgrund von Reizerscheinungen, die vermutlich durch ein Insert mit beschädigter Oberfläche hervorgerufen worden waren.

Zur Bewertung der Symptome wie Brennen, Kratzen, Fremdkörpergefühl, Trockenheitsgefühl, Schmerzen, Lichtempfindlichkeit und erhöhtem Tränenfluß wurden die Erfahrungen der Patienten in einer Tabelle dokumentiert. Hierbei wurde nicht die Stärke der Symptome beurteilt, sondern die Häufigkeit des Auftretens. Ein Wert von fünf entsprach permanentem Auftreten, ein Wert von eins einer Absenz der Symptome. Aus den Werten wurde ein Gesamt-Befundscore gebildet. (Abb. 30)

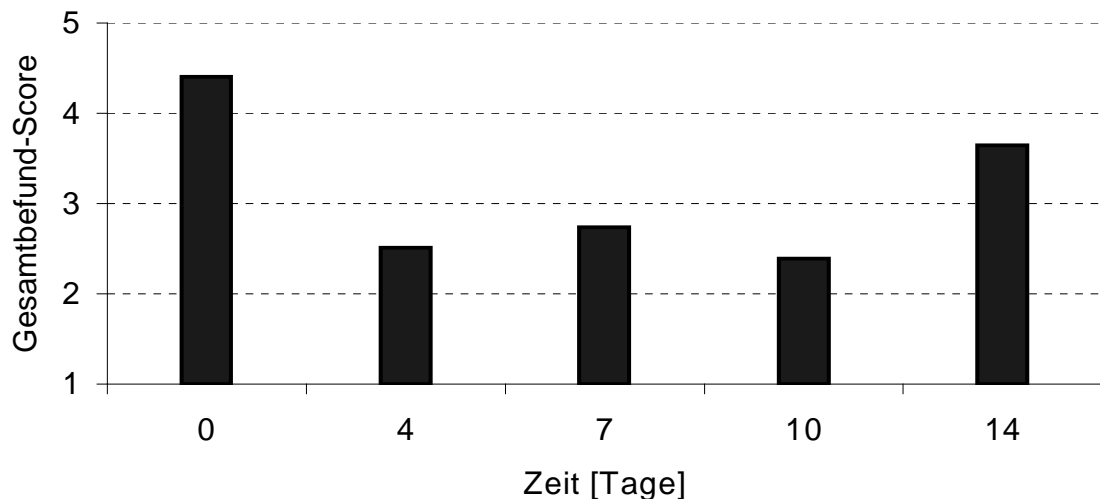


Abb. 30: Gesamt-Befundscore der Häufigkeit der Symptome im Studienverlauf (Brennen, Kratzen, Fremdkörpergefühl, Trockenheitsgefühl, Schmerzen, Lichtempfindlichkeit, erhöhter Tränenfluß); 1 = Minimum; 5 = max. Häufigkeit

Zu Beginn der Studie am Tag null wurde bei den Patienten ein Gesamt-Befundscore von 4,4 ermittelt. Nach vier Tagen betrug der Score 2,5, nach sieben Tagen 2,7, nach zehn Tagen 2,4 und am Versuchsende nach 14 Tagen 3,6. Aus Abbildung 30 ist ersichtlich, dass sich während der ersten vier Tage, also während des Tragens des Inserts, die Häufigkeit der Symptome deutlich reduzierte. Nach Absetzen der Inserte verminderte sich die Häufigkeit des Auftretens der beschriebenen Symptome nicht weiter, sondern stagnierte bis zum zehnten Versuchstag. Danach ließ die Wirkung der EGF-Inserte nach, die Häufigkeit der Symptome nahm wieder zu. Nicht nur der Gesamt-Befundscore zeigte dieses Verhalten, sondern auch jedes Symptom für sich. Als einzige Ausnahme erwies sich die Lichtempfindlichkeit, deren Wert sich während der ganzen Studie nicht veränderte.

### 3.9.2 Objektive Bewertungskriterien

#### 3.9.2.1 Break up time (BUT)

Die BUT ist ein wichtiges Kriterium zur objektiven Beurteilung der Stabilität des Tränenfilms. Die BUT eines gesunden Auges liegt oberhalb von 15 Sekunden. Die Bestimmung der BUT erfolgte am Tag 0, 4, 7, und 14.

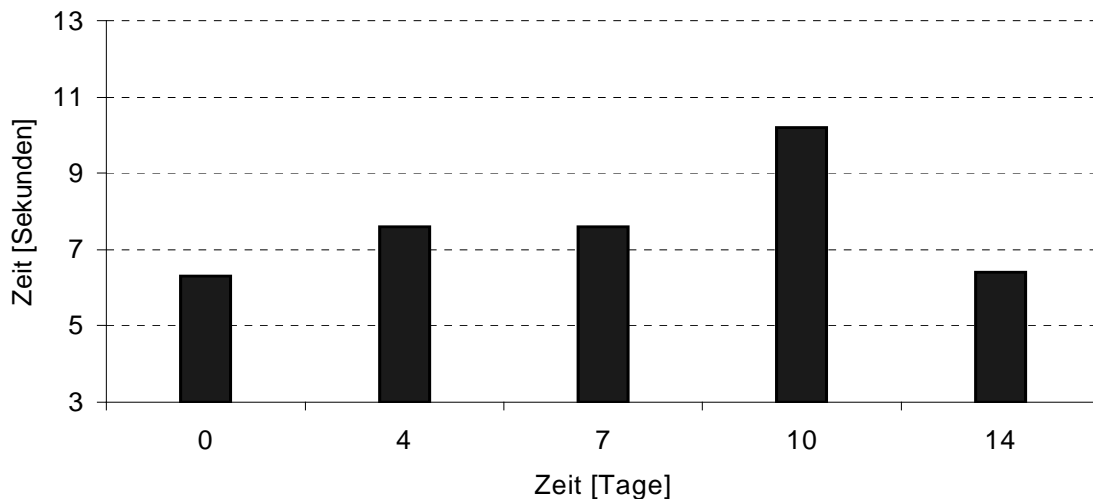


Abb. 31: Zeitlicher Verlauf der Änderung der break up time (BUT)

Zu Beginn der Studie betrug die durchschnittlich gemessene BUT 6,3 Sekunden. Am vierten bzw. am siebten Tag wurde eine BUT von 7,6 gemessen. Das Maximum im Studienverlauf wurde mit 10,2 Sekunden nach zehn Tagen erreicht. Bis zum Studienende nach 14 Tagen sank die BUT wieder auf 6,4 Sekunden. Wie aus Abb. 31 ersichtlich, ließ sich durch die Verwendung von EGF beladenen Alginatinserten eine Steigerung der Tränenfilmstabilitätszeit um über vier Sekunden erreichen. Der Effekt der Inserte hielt auch hier ca. zehn Tage an.

#### 3.9.2.2 Schirmertest

Da bei der primären Keratoconjunctivitis sicca die Tränensekretion vermindert ist, wurde zur Überprüfung der Tränensekretion der Schirmer-Test durchgeführt. Der Test wurde am Tag 0, 4, 7, 10 und 14 durchgeführt. Bei keinem der Patienten zeigte sich im Verlauf der Studie eine Veränderung der Testergebnisse. Wie zur erwarten hatten die verwendeten EGF-Alginat-Inserte keinen Einfluß auf die produzierte Tränenmenge.

### 3.9.2.3 Veränderungen des Visus

Im Verlauf der Studie wurde bei jedem Untersuchungstermin der Visus der Patienten bestimmt. Die Auswertung der Messwerte ergab keine objektive Veränderung der Sehschärfe.

### 3.9.2.4 Nebenwirkungen

Im Verlauf der Studie konnten, abgesehen von den beschriebenen Mißempfindungen, keine ernstesten Nebenwirkungen festgestellt werden.

### 3.9.3 Beurteilung

Wie die Ergebnisse dieser Pilotstudie zeigen, scheinen EGF-Inserte bei der Behandlung des „Trockenen Auges“ Wirkung zu zeigen. Die Inserte riefen dabei nicht nur eine subjektive Linderung der Beschwerden, sondern auch eine Verbesserung einiger objektiver Kriterien bis zu sechs Tage nach Entfernen des letzten Inserts hervor. Erst danach stellte sich langsam die Ausgangslage der Symptome wieder ein.

### 3.9.4 Befundbesserung durch EGF

Auf den Abbildungen 32.a und 32.b sieht man ein Auge vor und nach der Behandlung mit EGF-Inserten. Die Aufnahmen stammen aus Vorstudien bei einem Patienten mit rheumatologisch bedingtem Siccasyndrom, weshalb der Patient nicht in die Studie aufgenommen wurde. Die Aufnahmen zeigen jedoch den klinischen Effekt der EGF-Inserte sehr deutlich: In Abb 32.a lassen sich geschädigte Areale ausmachen wie z.B. Hornhautstippungen (Kreismarkierung) und die Mukusfilamente in der Bengalrosafärbung (Pfeilmarkierung). Diese Veränderungen sind nach der Behandlung mit EGF-Inserten nicht mehr zu erkennen (Abb. 32.b).

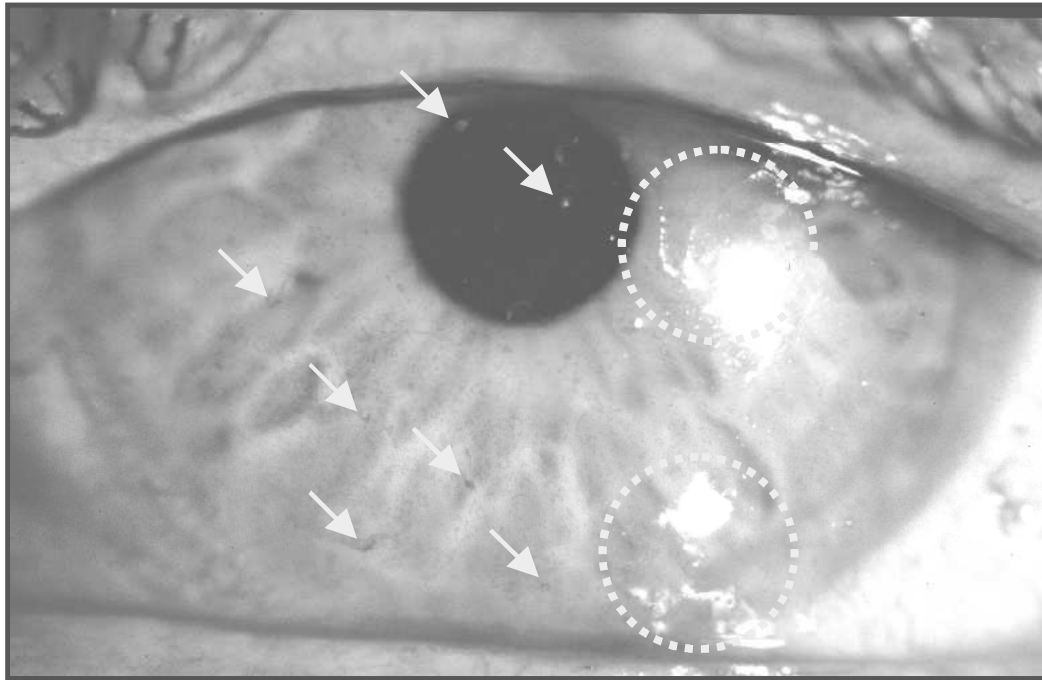


Abb. 32.a: rheumatologisch bedingtes Siccasyndrom vor EGF-Insert Behandlung: Hornhautstippung (Kreismarkierung) und Mukusfilamente in Bengalrosafärbung (Pfeilmarkierung) sind zu erkennen

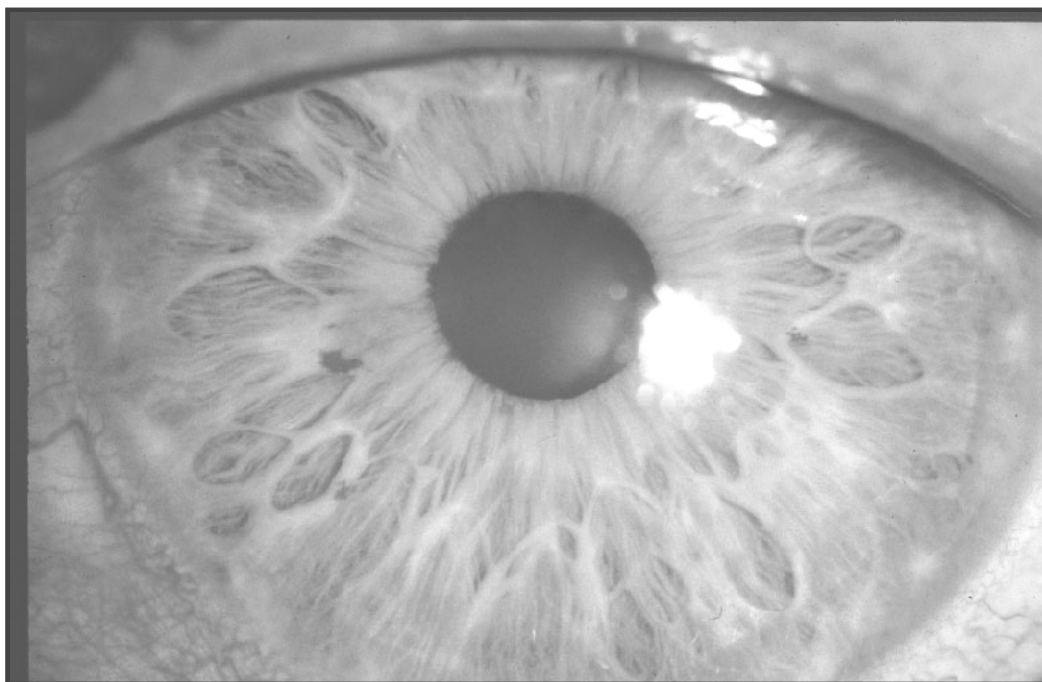


Abb. 32.b: rheumatologisch bedingtes Siccasyndrom nach EGF-Insert Behandlung: Es zeigt sich eine glatte Hornhautoberfläche

### 4 Zusammenfassung

Bei ca. 20% der Weltbevölkerung wird eine Keratocojunktivitis sicca diagnostiziert. Dies ist eine Erkrankung der Augenoberfläche mit dem Symptom eines instabilen Tränenfilms. Die Lebensqualität der betroffenen Personen ist oft ernsthaft eingeschränkt durch Symptome wie Brennen und Kratzen bis hin zu Hornhautperforationen. EGF, ein Wachstumsfaktor, der unter anderem in den Basalzellen des cornealen Epithels gebildet wird, ist ein bedeutender Faktor für die Intaktheit des Hornhautepithels und damit den Erhalt eines regelrechten Tränenfilms. Patienten mit Keratocojunktivitis sicca besitzen geringere Konzentrationen an EGF in ihrer Tränenflüssigkeit als gesunde Patienten. Aus diesem Grund erscheint eine Substitutionstherapie mit EGF sinnvoll. Für eine effektive Therapie ist es notwendig, einen konstanten EGF-Spiegel über mehrere Stunden am Auge aufrecht zu erhalten. Dies ist durch die Verwendung von konventionellen Augentropfen für den Patienten nicht möglich. Eine Alternative ist die Verwendung von sterilen, gut verträglichen, EGF-beladenen Inserten, die, im Bindehautsack appliziert, EGF kontrolliert freisetzen. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung solcher Inserte zur kausalen Behandlung des trockenen Auges.

Als Insertmaterial kommen Alginat zum Einsatz, die sich durch hohe Verträglichkeit am Auge auszeichnen. Um das Freisetzungsverhalten der Inserte zu variieren, wurden zahlreiche Parameter wie z.B. die chemische Zusammensetzung der verwendeten Alginat, der Calciumgehalt der Inserte oder der Gehalt an wasserlöslichen Porenbildnern variiert. Zur Herstellung geeigneter Inserte wurde das 1%ige Hydrogel in Teflonformen getrocknet. Der entstandene Film wurde anschließend mittels einer Calciumchloridlösung quervernetzt und wieder getrocknet. Aus dem wasserunlöslichem Film wurden ovale Inserte in beliebiger Form ausgestanzt. Untersuchungen zur Quervernetzungsdauer mittels Atomabsorptionsspektrometrie zeigten, daß die Quervernetzung nach einer Minute abgeschlossen war.

Die quantitative und qualitative EGF-Analytik erfolgte durch HPLC bzw. HPLC-MS. Dadurch konnte gezeigt werden, daß EGF während der Freisetzung keinerlei Abbauvorgängen unterliegt.

Da bei der Freisetzung von EGF aus Alginatinserten immer geringe Mengen Alginat gelöst werden, und Alginat im Milieu des HPLC-Fließmittels unlöslich ist, mußte es vor der Vermessung quantitativ und ohne Verlust an EGF abgetrennt werden. Als

geeignete Methode erwies sich die Ausfällung des Alginats durch Zugabe von Acetonitril.

Die starke Adsorption des EGF an Oberflächen konnte durch Zugabe von 0,1% bovinem Serumalbumin (BSA) zu EGF-Lösungen auf ein Minimum reduziert werden. Die Verwendung von Silanisierungsmitteln wie Simacote® hat sich im Rahmen dieser Untersuchungen nicht bewährt.

In isothermen Streßtests zeigte sich, daß EGF relativ stabil ist und der Abbau durch die Arrhenius-Gleichung beschrieben werden kann. Bei Raumtemperatur (21°C) besaß EGF in Lösung bei pH 7,4 eine pharmazeutische Haltbarkeit von 191 Tagen. Die Halbwertszeit betrug 1260 Tage.

Die Freisetzungseigenschaften der Inserte wurde auf verschiedene Weise variiert:

Bei der Herstellung wurden vier verschiedene Alginat mit unterschiedlichem Mannuron- bzw. Guluronsäureanteil und verschiedenen Viskositäten verwendet. Es zeigte sich, daß nur Inserte aus Alginaten mit hoher Viskosität und hohem Guluronsäureanteil eine deutlich retardierte Freisetzung besaßen.

Der Zusatz von Calciumchlorid zum Hydrogel führte zu hochporösen, spröden Inserten und damit zum Burst release.

Die Beimengung von wasserlöslichen Substanzen wie Hydroxyethylcellulose zu den Alginatgelen beschleunigte die EGF-Freisetzung.

Eine Verträglichkeitsstudie in Zusammenarbeit mit der Augenklinik ergab eine im allgemeinen gute subjektive Verträglichkeit der Inserte, sie verursachten keine Schäden am Auge. Während des Applikationszeitraums von bis zu drei Tagen blieben sie sowohl in in-vitro als auch in in-vivo-Erosionsversuchen stabil.

In einer klinischen Pilotstudie konnten erste positive Reaktionen auf die EGF-Inserte bei der Anwendung bei Patienten mit primärer Keratokonjunktivitis sicca gezeigt werden: Sowohl das subjektive Befinden als auch einige objektive Kriterien wie z.B. die Break-up-time verbesserten sich ab dem ersten Tag, anhaltend bis ca. zum 10.Tag der Studie.

Als nächster klinischer Schritt wird eine größere, randomisierte, prospektive Doppelblind-Studie zur genauen Wirksamkeitsbestimmung folgen.

Durch diese Arbeit wurde eine gute Grundlage für weitere Studien in der Zukunft geschaffen, bei denen Calcium-Alginat-Inserte mit anderen Wirkstoffen für verschiedenste ophthalmologische Erkrankungen bestückt werden können.

## 5 Literaturverzeichnis

- [1] Mathers, W.D.(**2000**) "Why the eye becomes dry: a cornea and lacrimal gland feedback model" in *The CLAO Journal: Official Publication of the Contact Lens Association of Ophthalmologists, Inc* 26(3) p. 159-165
- [2] Roberts, D.K.(**1991**) "Keratoconjunctivitis sicca" in *Journal of the American Optometric Association* 62(3) p. 187-199
- [3] Stern, M.E., Beuerman, R.W., Fox, R.I., Gao, J., Mircheff, A.K., Pflugfelder, S.C.(**1998**) "The pathology of dry eye: the interaction between the ocular surface and lacrimal glands" in *Cornea* 17(6) p. 584-589
- [4] Tsubota, K.(**1998**) "Tear dynamics and dry eye" in *Progress in Retinal and Eye Research* 17(4) p. 565-596
- [5] Edelhauser, H.F., Rudnick, D.E., Azar, R.G.( **1998**) "Corneal epithelial tight junctions and the localization of surface mucin" in *Advances in Experimental Medicine and Biology* 438 p. 265-271
- [6] Ohashi, Y., Motokura, M., Kinoshita, Y., Mano, T., Watanabe, H., Kinoshita, S., Manabe, R., Oshiden, K., Yanaihara, C.(**1989**) "Presence of epidermal growth factor in human tears" in *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 30(8) p. 1879-1882
- [7] Knorr, M., Schuller, S., Steuhl, K.P., Thiel, H.J.(**1992**) "EGF in therapy of corneal diseases. Principles and possible uses" in *Der Ophthalmologe: Zeitschrift Der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft* 89(2) p. 119-127
- [8] Nishida, T. and Tanaka, T.(**1996**) "Extracellular matrix and growth factors in corneal wound healing" in *Current Opinion in Ophthalmology* 7(4) p. 2-11
- [9] Schultz, G.S., Davis, J.B., Eiferman, R.A.(**1988**) "Growth factors and corneal epithelium" in *Cornea* 7(2) p. 96-101

- [10] Schultz, G., Khaw, P.T., Oxford, K., Macauley, S., Van Setten, G., Chegini, N.(1994) "Growth factors and ocular wound healing" in *Eye (London, England)* 8 Part 2 p. 184-187
- [11] Pflugfelder, S.C., Jones, D., Ji, Z., Afonso, A., Monroy, D.(1999) "Altered cytokine balance in the tear fluid and conjunctiva of patients with Sjogren's syndrome keratoconjunctivitis sicca" in *Current Eye Research* 19(3) p. 201-211
- [12] Foulks, G.N.(1998) "The now and future therapy of the non-Sjogren's dry eye" in *Advances in Experimental Medicine and Biology* 438 p. 959-964
- [13] Lemp, M.A.(1999) "The 1998 Castroviejo Lecture. New strategies in the treatment of dry-eye states" in *Cornea* 18(6) p. 625-632
- [14] Lemp, M.A.(1994) "Management of the dry-eye patient" in *International Ophthalmology Clinics* 34(1) p. 101-113
- [15] Murube, J., Murube, A., Zhuo, C.(1998) "Classification of artificial tears. II: Additives and commercial formulas" in *Advances in Experimental Medicine and Biology* 438 p. 705-715
- [16] Murube, J., Paterson, A., Murube, E.(1998) "Classification of artificial tears. I: Composition and properties" in *Advances in Experimental Medicine and Biology* 438 p. 693-704
- [17] Pflugfelder, S.C.(1998) "Advances in the diagnosis and management of keratoconjunctivitis sicca" in *Current Opinion in Ophthalmology* 9(4) p. 50-53
- [18] Lang, G.K.(1998) "Störungen der Tränenfunktion" in *Augenheilkunde* p. 64-65, Thiemeverlag Stuttgart
- [19] Murube, J., Olivares., Murube, E.(1995) "treatment of dry eye by punctum patch" in *Advances in Experimental Medicine and Biology*(438) p. 693-704

- [20] Murube, J. and Murube, E.(1996) "Treatment of dry eye by blocking the lacrimal canaliculi" in *Survey of Ophthalmology* 40(6) p. 463-480
- [21] Tsubota, K.(1994) "New approaches to dry-eye therapy" in *International Ophthalmology Clinics* 34(1) p. 115-128
- [22] Cho, N.H., Seong, S.Y., Chun, K.H., Kim, Y.H., Kwon, I.C., Ahn, B.Y., Jeong, S.Y.(1998) "Novel mucosal immunization with polysaccharide-protein conjugates entrapped in alginate microspheres" in *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society* 53(1-3) p. 215-224
- [23] Martinsen, A., Skjaak-Braek, G., Smidsroed, O., Zanetti, F., Paoletti, S.(1991) "Comparison of different methods for determination of molecular weight and molecular weight distribution of alginates" in *Carbohydr.Polym.* 15(2) p. 171-193
- [24] Amsden, B. and Turner, N.(1999) "Diffusion characteristics of calcium alginate gels" in *Biotechnology and Bioengineering* 65(5) p. 605-610
- [25] Smidsrod, O., Glover, R.M., Whittington, S.G.(1973) "The relative extension of alginates having different chemical composition" in *Carbohydrate Research* 27(1) p. 107-118
- [26] Cohen, S.(1962) "Isolation of mouse submaxillary glandprotein acceleratingincisor eruption and eye lid opening in the new born animal" in *J.Biol.Chem.* 237 p. 1555
- [27] Gregory, H. and Willshire, I.R.(1975) "The isolation of the urogastrones - inhibitors of gastric acid secretion - from human urine" in *Hoppe-Seyler's Zeitschrift Fur Physiologische Chemie* 356(11) p. 1765-1774
- [28] Weaver, L.T. and Walker, W.A.(1988) "Epidermal growth factor and the developing human gut" in *Gastroenterology* 94(3) p. 845-847

- [29] Mattila, A.L., Perheentupa, J., Pesonen, K., Viinikka, L.(1985) "Epidermal growth factor in human urine from birth to puberty" in *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 61(5) p. 997-1000
- [30] Carpenter, G. and Cohen, S.(1979 ) "Epidermal growth factor-urogstrone, a polypeptide acquiring hormonal status" in *Annual Review of Biochemistry* 48 p. 193
- [31] Hollenberg, M.D.(1979) "Epidermal growth factor-urogastrone, a polypeptide acquiring hormonal status" in *Vitamins and Hormones* 37 p. 69-110
- [32] Schlessinger, J., Schreiber, A.B., Levi, A., Lax, I., Libermann, T., Yarden, Y.(1983) "Regulation of cell proliferation by epidermal growth factor" in *CRC Critical Reviews in Biochemistry* 14(2) p. 93-111
- [33] Araki, F., Nakamura, H., Nojima, N., Tsukumo, K., Sakamoto, S.(1989) "Stability of recombinant human epidermal growth factor in various solutions" in *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 37(2) p. 404-406
- [34] Savage, C.R.J. and Cohen, S.(1972) "Epidermal growth factor and a new derivative. Rapid isolation procedures and biological and chemical characterization" in *The Journal of Biological Chemistry* 247(23) p. 7609-7611
- [35] Savage, C.R.J. and Cohen, S.(1973) "Proliferation of corneal epithelium induced by epidermal growth factor" in *Experimental Eye Research* 15(3) p. 361-366
- [36] Taylor, J.M., Mitchell, W.M., Cohen, S.(1972) "Epidermal growth factor. Physical and chemical properties" in *The Journal of Biological Chemistry* 247(18) p. 5928-5934
- [37] Morton, C.C., Byers, M.G., Nakai, H., Bell, G.I., Shows, T.B.(1986) "Human genes for insulin-like growth factors I and II and epidermal growth factor are located on 12q22----q24.1, 11p15, and 4q25----q27, respectively" in *Cytogenetics and Cell Genetics* 41(4) p. 245-249

- [38] Zabel, B.U., Eddy, R.L., Lalley, P.A., Scott, J., Bell, G.I., Shows, T.B.(1985) "Chromosomal locations of the human and mouse genes for precursors of epidermal growth factor and the beta subunit of nerve growth factor" in *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 82(2) p. 469-473
- [39] Rall, L.B., Scott, J., Bell, G.I., Crawford, R.J., Penschow, J.D., Niall, H.D., Coghlan, J.P.(1985) "Mouse prepro-epidermal growth factor synthesis by the kidney and other tissues" in *Nature* 313(5999) p. 228-231
- [40] Gray, A., Dull, T.J., Ullrich, A.(1983) "Nucleotide sequence of epidermal growth factor cDNA predicts a 128,000-molecular weight protein precursor" in *Nature* 303(5919) p. 722-725
- [41] Oka, T., Sakamoto, S., Miyoshi, K., Fuwa, T., Yoda, K., Yamasaki, M., Tamura, G., Miyake, T.(1985) "Synthesis and secretion of human epidermal growth factor by *Escherichia coli*" in *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 82(21) p. 7212-7216
- [42] Sivakesaya, S., Xu, Z.N., Chen, Y.H., Hackett, J., Huang, R.C., Lam, E., Lam, T.L., Siu, K.L., Wong, R.S.C., Wong, W.K.R.(1999) "Production of excreted human epidermal growth factor (hEGF) by an efficient recombinant *Escherichia coli* system" in *Process Biochem.(Oxford)* 34(9) p. 893-900
- [43] Weimann, E. and Kiess, W. (1991) Chapter 3: "3.4 Molekulare Wirkmechanismen" in *Wachstumsfaktoren* Schattauer; Stuttgart)
- [44] Carpenter, G. and Cohen, S.(1990) "Epidermal growth factor" in *The Journal of Biological Chemistry* 265(14) p. 7709-7712
- [45] Wells, A.(1999) "EGF receptor" in *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 31(6) p. 637-643
- [46] Bogdan, S. and Klambt, C.(2001) "Epidermal growth factor receptor signaling" in *Current Biology: CB* 11(8) p. R292-R295

- [47] Rickwood, D. (1993) Chapter 3: "growth factors families" in *Growth factors* IRL Press, Oxford University Press; New York)
- [48] Smidsrod, O. and Skjak-Braek, G.(1990) "Alginate as immobilization matrix for cells" in *Trends in Biotechnology* 8(3) p. 71-78
- [49] Byrom, D.(1991) "Biomaterials. Novel Materials from Biological Sources" in p. 365
- [50] Skjak-Braek, G., Grasdalen, H., Larsen, B.( 1986) "Monomer sequence and acetylation pattern in some bacterial alginates" in *Carbohydrate Research* 154 p. 239-250
- [51] Morris, E.R., Rees, D.A., Thom, D.(1980) "Characterisation of alginate composition and block-structure by circular dichroism" in *Carbohydrate Research* 81(2) p. 305-314
- [52] Clark, A.H. and Ross-Murphy, S.B.(1987) "Structural and mechanical properties of biopolymer gels" in *Adv.Polym.Sci.* 83 p. 57-192
- [53] Rees, D.A.(1981) "Polysaccharide shapes and their interactions. Some recent advances" in *Pure Appl.Chem.* 53(1) p. 1-14
- [54] Voigt, R. (2000) Chapter 15.8.4.3: "Alginate" in *Pharmazeutische Technologie* Deutscher Apotheker Verlag; Stuttgart)
- [55] DiBiase, M.D. and Rhodes, C.T.(1991) "The design of analytical methods for use in topical epidermal growth factor product development" in *The Journal of Pharmacy and Pharmacology* 43(8) p. 553-558
- [56] Rücker, G., Neugebauer, M., Willems, G.G. (1992) *Instrumentelle pharmazeutische Analytik* WVG; Stuttgart)
- [57] Manning, M.C., Patel, K., Borchardt, R.T.(1989) "Stability of protein pharmaceuticals" in *Pharmaceutical Research* 6(11) p. 903-918

- [58] George-Nascimento, C., Gyenes, A., Halloran, S.M., Merryweather, J., Valenzuela, P., Steimer, K.S., Masiarz, F.R., Randolph, A.(1988) "Characterization of recombinant human epidermal growth factor produced in yeast" in *Biochemistry* 27(2) p. 797-802
- [59] Downs, E.C., Robertson, N.E., Riss, T.L., Plunkett, M.L.(1992) "Calcium alginate beads as a slow-release system for delivering angiogenic molecules in vivo and in vitro" in *Journal of Cellular Physiology* 152(2) p. 422-429
- [60] Cleland, J.L., Powell, M.F., Shire, S.J. "The development of stable protein formulations: a close look at protein aggregation, deamidation, and oxidation" in *CRITICAL REVIEWS IN THERAPEUTIC DRUG CARRIER SYSTEMS* 10(4) p. 307-377
- [61] Bauer, Frömming, Führer(1999) "Lehrbuch der Pharmazeutischen Technologie" ,(6) WVG Stuttgart
- [62] Gu, L.C., Erdos, E.A., Chiang, H.S., Calderwood, T., Tsai, K., Visor, G.C., Duffy, J., Hsu, W.C., Foster, L.C.(1991) "Stability of interleukin 1 beta (IL-1 beta) in aqueous solution: analytical methods, kinetics, products, and solution formulation implications" in *Pharmaceutical Research* 8(4) p. 485-490
- [63] Pearlman, R. and Nguyen, T.(1992) "Pharmaceutics of protein drugs" in *The Journal of Pharmacy and Pharmacology* 44(1) p. 178-185
- [64] Oliva, A., Farina, J.B., Llabres, M.(1996) "Influence of temperature and shaking on stability of insulin preparations: degradation kinetics" in *International Journal of Pharmaceutics* 143(2) p. 163-170
- [65] Tsubota, K., Goto, E., Fujita, E., Shimmura, S.(1999) "Treatment of dry eye by autologous serum application in Sjögren`s syndrome" in *Br.J.Ophthalmol* 83 p. 390-395

- [66] Küchle, H. and Busse, H.(1991 ) "Taschenbuch der Augenheilkunde" 3(3), Hans Huber Verlag, Stuttgart
- [67] Burk, A. and Burk, R.(1999) "Checkliste Augenheilkunde" in 2(2), Thieme Verlag Stuttgart
- [68] George-Nascimento, C., Lowenson, J., Borissenko, M., Calderon, M., Medina-Selby, A., Kuo, J., Clarke, S., Randolph, A.(1990) "Replacement of a labile aspartyl residue increases the stability of human epidermal growth factor" in *Biochemistry* 29(41) p. 9584-9591
- [69] APV(1985) "Haltbarkeit und Haltbarkeitsprüfung von Arzneimitteln; APV Richtlinie mit Kommentar" in 47(6) p. 627-632
- [70] Amsden, B.(1998) "Solute diffusion within hydrogels. Mechanisms and models" in *Macromolecules* 31(23) p. 8382-8395
- [71] Gombotz, W.R. and Wee, S.(1998) "Protein release from alginate matrixes" in *Adv. Drug Delivery Rev.* 31(3) p. 267-285
- [72] Amsden, B.(1998) "Solute diffusion in hydrogels. An examination of the retardation effect" in *Polymer Gels and Networks* 6(1) p. 13-43

## Danksagung

Mein erster Dank gilt Herrn Prof. Dr. W. Hosemann für die Überlassung des Themas und die Übernahme meiner Betreuung.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. A. Göpferich für die hervorragende fachliche Betreuung, den großartigen Einsatz während der praktischen Tätigkeit und die wertvollen Ratschläge während der Ausarbeitung. Er ermutigte, motivierte und unterstützte mich während der ganzen Zeit und machte so diese Arbeit möglich. Auch für die Möglichkeit, die Arbeit auf internationalen wissenschaftlichen Kongressen vorstellen zu dürfen, danke ich ihm zutiefst.

Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn PD Dr. Dr. (Lond) C.P. Lohmann, Herrn Dr. B. Gabler und Frau B. Fuchs für die guten Anregungen und Ideen bezüglich des Themas, und insbesondere für die tatkräftige Unterstützung bei der Durchführung der klinischen Studien.

Für die massenspektroskopischen Aufnahmen möchte ich mich bei Herrn J. Kiermaier bedanken.

Diese Arbeit wäre nicht möglich gewesen ohne die Hilfe und stete Unterstützung durch die Sekretärinnen des Instituts, Frau L. Frommer und Frau L. Öttl, wofür ich ihnen sehr danke.

Mein Dank gilt auch den medizinisch-technischen Assistentinnen für die stetige Hilfsbereitschaft.

Auch bei den Doktoranden am Lehrstuhl für pharmazeutische Technologie möchte ich mich für die wunderbare Freundschaft und Kollegialität bedanken, wodurch die gemeinsam verbrachten Jahre eine unvergeßliche Zeit für mich wurden.

# Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, daß ich die vorliegende Dissertation selbständig verfaßt und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Die Dissertation ist bisher keiner anderen Fakultät vorgelegt worden.

Ich erkläre, daß ich bisher kein Promotionsverfahren erfolglos beendet habe und daß eine Aberkennung eines bereits erworbenen Doktorgrades nicht vorliegt.

12.05.03

Christoph Koelwel

Christoph Koelwel  
Wassergasse 17  
93059 Regensburg

Regensburg, den 16.12.02

## **Lebenslauf**

Geboren: 15.01.1973 in Regensburg

Schulbildung: 1979-83: Prüfeninger Grundschule, Regensburg  
1983-84: Augustenschule, Regensburg  
1984-93: Von Müller-Gymnasium, Regensburg  
Abitur 1993

Ausbildung zum PTA : 1993-1994: Berufsförderungswerk Eckert, Regenstauf

Hochschulausbildung: Studium der Pharmazie:  
1996: 1.Staatsexamen  
1999: 2.Staatsexamen  
1999-2000 praktisches Jahr:  
\*Max-Weber-Platz Apotheke, München  
\*Lehrstuhl für pharmazeutische Technologie,  
UNI-Regensburg  
2000: 3. Staatsexamen  
2000-02: Promotion