

**Verwendung niedermolekularer  
bioresorbierbarer Polyester  
als Drug Delivery Systeme**

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie  
der Johann Wolfgang Goethe-Universität  
in Frankfurt am Main

von  
Hans-Joachim Pfefferle  
aus Heilbronn

Frankfurt 2007  
(D30)

Vom Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie  
der Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen

Dekan: Prof. Dr. Harald Schwalbe  
Gutachter: Prof. Dr. Jörg Kreuter  
Prof. Dr. Dr. Reinhard Schnettler (Universität Gießen)

Datum der Disputation: 07.05.2008

Die vorliegende Arbeit wurde in der Abteilung Bio F + E bei der Firma Merck KGaA in Darmstadt erstellt.

Sie stand unter der Leitung von Herrn Professor Dr. J. Kreuter, Leiter des Institutes für Pharmazeutischen Technologie der Universität Frankfurt. Ich danke Herrn Professor Kreuter für die Überlassung des Themas für diese Arbeit, die wissenschaftliche Beratung und seine Geduld.

Bei Herrn Dr. Berthold Nies möchte ich mich für die intensive wissenschaftliche Betreuung und die freundschaftliche Begleitung durch die Höhen und Tiefen der Arbeit herzlich bedanken!

Darüber hinaus gilt allen mein Dank, die am Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Den damaligen Laborleitern Frau Dr. Adelheid Liebendörfer, Herrn Dr. Ralf Krotz, Herrn Dr. Rainer Specht, Herrn Dr. Robert Wenz und Herrn Dr. Jörg Maier, die für mich immer ein offenes Ohr hatten und mir kollegialen Ratschlägen zur Seite standen.

Frau Sabine Hofmann, Frau Sabine Perschbacher, Frau Sigrid Schneck, Herrn Guntram Fleissner und Herrn Ludwig Daum für die gute und freundschaftliche Atmosphäre im Labor.

Herrn Dr. Jonczyk, der mir die Versuche mit den Cyclopeptiden ermöglichte und Herrn Bihrer für die Unterstützung bei der Analytik der Cyclopeptide im Labor.

Herrn Dr. Volker Alt, Universität Gießen, für die gute und erfolgreiche Zusammenarbeit bei den Implantationsversuchen.

Herrn Günther Hauke und Herrn Reiner Funck, aus der Zentralen Verfahrensentwicklung der Merck KGaA für die immer prompte und unbürokratische Hilfe bei technischen Problemen.



Meinen Eltern

Eva

„Denn unser Wissen ist Stückwerk“

1. Kor 13,9



<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
Ziel der Arbeit .....	1
Implantate .....	1
Parenterale Depotsysteme .....	2
Bioabbaubare Polymere .....	3
Polyol-oligo-lactide/glycolide .....	11
<b>Thema I    Arzneistofffreisetzung aus Polymer-Stäbchen</b> .....	<b>17</b>
I.1        Einführung .....	17
I.2        Materialien und Methoden .....	18
I.2.1    Substanzen.....	18
I.2.1.1 Polymere .....	18
I.2.1.2 Arzneistoffe.....	19
I.2.1.3 Sonstige Substanzen.....	19
I.2.1.4 Untersuchungsmedien.....	19
I.2.2    Geräte.....	20
I.2.3    Methoden.....	20
I.2.3.1 Synthese der Polymere .....	20
I.2.3.2 Polymercharakterisierung .....	21
I.2.3.3 Herstellung der Prüfkörper.....	24
I.2.3.4 Einlagerungsversuche und Probengewinnung .....	26
I.2.3.5 Freisetzungsuntersuchungen .....	28
I.3        Ergebnisse und Diskussion .....	31
I.3.1    Molmasse der Polymere .....	31
I.3.1.1 Einfluss des Glyceringehaltes.....	31
I.3.1.2 Einfluss der Syntheseparameter.....	33
I.3.1.3 Einfluss des Glycolids bei der Copolymerisation .....	35
I.3.2    Eigenschaften der Polymerstäbchen .....	35
I.3.2.1 Wasseraufnahme.....	35
I.3.2.2 Polymermassenabnahme .....	38
I.3.2.3 Degradation .....	42
I.3.3    Wirkstofffreisetzung aus den Polymerstäbchen.....	56
I.3.3.1 Einfluss der Beladungsrate.....	56
I.3.3.2 Einfluss der Stereoisomerie der Milchsäure .....	62
I.3.3.3 Einfluss des Lactid / Glycolidgehaltes.....	67
I.4        Zusammenfassung .....	70

<b>Thema II</b>	<b>Entwicklung eines Freigabesystems für ein cyclisches Peptid .....</b>	<b>75</b>
II.1	Einführung .....	75
II.2	Materialien und Methoden .....	76
II.2.1	Substanzen.....	76
II.2.1.1	Polymere .....	76
II.2.1.2	Peptide .....	77
II.2.1.3	Sonstige Substanzen.....	78
II.2.2	Geräte.....	78
II.2.3	Methoden.....	78
II.2.3.1	Analytik der Peptide.....	78
II.2.3.2	Herstellung der Presslinge.....	80
II.2.3.3	Wasseraufnahme und Degradation .....	82
II.3	Ergebnisse und Diskussion .....	82
II.3.1	Wirkstofffreie Prüfkörper .....	82
II.3.1.1	Polymerstäbchen .....	82
II.3.1.2	Polymer-Tabletten .....	84
II.3.2	Arzneistofffreisetzung .....	86
II.3.2.1	Polymerstäbchen .....	86
II.3.2.2	Polymertabletten.....	90
II.3.2.3	Freisetzungsprofil der Prüfkörper.....	91
II.4	Zusammenfassung .....	93
<b>Thema III</b>	<b>Halbfeste Zubereitungen zur Arzneimittelfreigabe.....</b>	<b>97</b>
III.1	Einführung .....	97
III.2	Materialien und Methoden .....	98
III.2.1	Substanzen.....	98
III.2.1.1	Polymere .....	98
III.2.1.2	Arzneistoffe.....	99
III.2.2	Geräte.....	100
III.2.2.1	Prüfkörper.....	100
III.2.3	Methoden.....	101
III.2.3.1	Herstellung der halbfesten Zubereitungen.....	101
III.2.3.2	Messung des pH-Wert-Verlaufes.....	101
III.2.3.3	Messung des Milchsäure-Verlaufes.....	101
III.3	Ergebnisse und Diskussion .....	102
III.3.1	Degradationsuntersuchungen wirkstofffreier Polymer-Mischungen .	102
III.3.1.1	Verlauf des pH-Wertes .....	102
III.3.1.2	Verlauf der Milchsäurekonzentration im Medium .....	103
III.3.2	Arzneistofffreisetzung .....	105
III.4	Zusammenfassung .....	110

<b>Thema IV Herstellung eines bFGF-beschichteten Hydroxylapatit-Implantatkörpers .....</b>	<b>115</b>
IV.1 Einführung .....	115
IV.2 Materialien und Methoden .....	116
IV.2.1 Substanzen.....	116
IV.2.1.1 Polymer .....	116
IV.2.1.2 Wachstumsfaktor bFGF (Basic fibroblast growth factor).....	116
IV.2.1.3 Hydroxylapatit-Zylinder .....	116
IV.2.2 Methoden.....	117
IV.2.2.1 Beschichtung .....	117
IV.2.2.2 Freisetzung des Wachstumsfaktors.....	117
IV.2.2.3 Studiendesign .....	117
IV.2.2.4 Operation.....	118
IV.2.2.5 Knochenmarkierung.....	118
IV.2.2.6 Perfusion .....	118
IV.2.2.7 Histologie und Histomorphometrie.....	119
IV.3 Ergebnisse.....	120
IV.3.1 Beschichtung .....	120
IV.3.2 Freisetzungsversuche.....	121
IV.3.3 Einwachsverhalten des Knochens .....	122
IV.3.4 Diskussion .....	126
<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>129</b>
<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>135</b>



# **Einleitung**



## Ziel der Arbeit

Die Abteilung Biomaterialien der Firma Merck erwarb 1993 mehrere Patente über resorbierbare Polymere. Die Grundidee in diesen Patenten ist, dass  $\alpha$ -Hydroxycarbonsäuren in Anwesenheit eines Polyols polymerisiert werden. Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden Polymere untersucht, die als Carbonsäurekomponente Milch- und/oder Glycolsäure enthalten und bei denen Glycerin oder Ethylenglycol als Polyol verwendet wurde. Durch Variation des Verhältnisses zwischen Monomeren und Polyol lassen sich so Oligo- bzw. Polymere mit vielfältigen Eigenschaften erhalten.

Diese Arbeit verfolgte zweierlei Ziele:

Es sollten grundlegende Erkenntnisse über diese Polymerklasse gewonnen werden und

es sollte die Eignung dieser Polymere als implantierbares Arzneistoffdepot – möglichst im Rahmen einer tierexperimentellen Studie - untersucht werden.

## Implantate

Das Einbringen von Implantaten in den menschlichen Körper auf parenteralem Weg zur Heilung oder Linderung von Krankheiten hat eine lange Geschichte in der Medizin. Es wurde und wird eine Vielfalt verschiedener Materialien für sehr unterschiedliche Indikationen verwendet. Eine Gliederung ist prinzipiell nach zwei Gesichtspunkten möglich.

Zum einen lässt sich eine Klassifizierung nach dem Zweck der Anwendung vornehmen. Das heißt, der Stoff hat eine primär physikalische/ mechanische Funktion oder er besitzt eine pharmakologische Wirkung. Eine genaue Abgrenzung ist nicht immer möglich. Beispiele für Stoffe mit einer primär physikalischen bzw. mechanischen Funktion sind Prothesen, Ostensynthesematerialien, Knochenzemente, Stents oder Antiadhäsionsfolien. Stoffe mit einer primär pharmakologischen Wirkung sind zum Beispiel die Alzetpumpe oder Depotsysteme für Arzneimittel wie zum Beispiel wirkstoffabgebende Pflaster.

Es gibt aber durchaus Produkte, bei der eine eindeutige Zuordnung nicht so einfach ist. Schon bei Knochenzementen mit Antibiotikazusatz fällt die eindeutige Klassifizierung schwer. Zwar dient ein Knochenzement der festen Verankerung von Prothesen im Knochen, erfüllt also eine mechanische Funktion, doch hat das inkorporierte Antibiotikum eine eindeutig pharmakologische Wirkung.

Eine zweite Möglichkeit der Klassifizierung rückt die stoffliche Zusammensetzung und die Herkunft des Implantates in den Vordergrund. Das heißt, es handelt sich um Stoffe natürlicher Herkunft, wie Kollagen, Chitosan, oder Cellulosen oder sie sind aus künstlichen Werkstoffen wie Metall (Implantatstahl, Titan) oder Kunststoff hergestellt. Letztere lassen sich nochmals in resorbierbare (Lactide, Glycolide, Polyanhydride) und nicht resorbierbare (PMMA, Cyanoacrylate) Kunststoffe untergliedern.

## **Parenterale Depotsysteme**

Die ersten synthetischen Polymere, die für den Einsatz im Körper als resorbierbare Materialien hergestellt wurden, waren die Polyglycolide (PGA). Aus diesem Kunststoff wurde 1970 das resorbierbare Nahtmaterial Dexon® hergestellt. Parallel hierzu wurde das Vicryl® entwickelt, bei dem es sich um ein Copolymer der Glykol- und der Milchsäure (PLGA) handelt. Diese Nahtmaterialien, welche einen zweiten Eingriff zur Entfernung überflüssig machten, bahnten den Weg für viele andere Anwendungen von resorbierbaren Materialien. So führte die intensive Forschung im Bereich der PLGA's bald zu den unterschiedlichsten Formen und Anwendungen im Bereich der implantierbaren und injizierbaren Arzneimittelsysteme, was in den späten 80er Jahren zu einem sprunghaften Anstieg der Patenente in diesem Bereich führte.

Auf dem Gebiet der parenteralen Depotarzneiformen haben sich in den letzten beiden Jahrzehnten wesentliche Entwicklungen vollzogen. Als Vorteile dieser Applikationsform gelten die geringeren Schwankungen des Plasmaspiegels des freigesetzten Wirkstoffes, die Verminderung lokaler und systemischer Nebenwirkungen, eine verbesserte Compliance beim Patienten, und die Möglichkeit, die in den letzten Jahren in verstärktem Maße gentechnologisch zugänglichen Peptide [1] applizieren zu können.

Durch Anwendung schwerlöslicher Formen eines Wirkstoffes, durch Wirkstoff-Hilfsstoff-Komplexe, durch Verwendung lipophiler Vehikel oder durch die Erhöhung der Viskosität des Vehikels lässt sich ein Depoteffekt erzielen. Überwiegend handelt es sich bei den Handelspräparaten nach wie vor um ölige Lösungen, wie z.B. im Falle von Androcur® [2] Depot, dessen Wirkstoff in Rizinusöl gelöst vorliegt und nur alle 14 Tage intramuskulär injiziert wird. Des weiteren werden Kristallsuspensionen von Kortikoiden (Volon® A 40 [3], Urbason® [4]) als Depotpräparate zur intramuskulären Injektion angeboten.

Neben diesen klassischen Methoden der Retardierung wurde vor allem in den letzten beiden Jahrzehnten versucht, Depotformen auf Basis von Trägersystemen

zu entwickeln. Zu unterscheiden sind hierbei mikropartikuläre Systeme (Suspensionen) [5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16] sowie monolithische Systeme (Implantate) [17, 18, 19, 20, 21, 22], die mittels einer Injektionsnadel oder eines Trocar appliziert werden können. Monolithische Implantate haben gegenüber mikropartikulären Formen den Vorteil, dass sie im Falle von schweren Nebenwirkungen bedeutend einfacher wieder zu entfernen sind.

Bei den Trägermaterialien kann man resorbierbare von nicht resorbierbaren, inerten Trägern unterscheiden. Der Nachteil biologisch nicht abbaubarer Polymerträger liegt darin, dass sie nach der Arzneistofffreigabe im Organismus verbleiben oder chirurgisch wieder entfernt werden müssen. Bereits 1964 [23] wird die Eignung von Silikonimplantaten als Trägermaterial für Arzneistoffe beschrieben. Auch Hydrogelmatrices, z.B. aus Polyhydroxyethylmethacrylaten (p-HEMA) [24, 25], eignen sich zur Herstellung von halbfesten Depotformen.

## **Bioabbaubare Polymere**

### **Begriffe und Klassifizierung**

Begriffe wie „bioabbaubar“ oder „bioresorbierbar“ sind als Beschreibung der Eigenschaft eines Stoffes, durch biologische Prozesse abgebaut und eliminiert zu werden, recht ungenau. Warum ein Stoff nach einer gewissen Zeit im Körper nicht mehr nachweisbar ist, kann unterschiedliche Gründe haben. Um diese, in der Literatur zum Teil sehr unscharf verwendeten Begriffe, klar gegeneinander abzugrenzen, führte Vert [26] für biologisch abbaubare Polymere vier verschiedene Begriffe ein:

- Bioabsorbierbar
- Biodegradierbar
- Bioresorbierbar
- Bioerodierbar

Als bioabsorbierbar gelten Polymere, die sich in Körperflüssigkeiten lösen, ohne dass eine Kettenspaltung oder eine Molmassenabnahme stattfindet.

Biodegradierbar sind Polymere, die in Körperflüssigkeiten abgebaut und ausgeschieden werden, ohne dass die Abbauprodukte über natürliche Stoffwechselwege metabolisiert werden.

Bioresorbierbar sind Polymere, die abgebaut werden und deren Abbauprodukte über natürliche Stoffwechselwege ausgeschieden werden

Bioerodierbar sind Polymere, die ausschließlich von der Oberfläche abgebaut werden.

Häufig werden diese Begriffe aber wenig genau synonym verwendet.

Zur großen Familie der bioabbaubaren Polymere gehören neben natürlich vorkommenden Substanzen wie z.B. Kollagen oder Albumin eine größere Zahl synthetisch hergestellter Polymere wie z.B. Polyester.

Die aliphatischen Polyester sind infolge ihrer günstigen verarbeitungstechnischen und applikationsrelevanten Eigenschaften die dominierende Gruppe. Insbesondere Homo- und Copolymere von Milchsäure und Glycolsäure, sowie Polyester von  $\alpha$ -Hydroxycarbonsäuren finden breite Anwendung. Sie werden seit längerer Zeit als synthetische Nahtmaterialien, z.B. Dexon<sup>®</sup> (Polyglycolid) [27, 28] oder Vicryl<sup>®</sup> (L-Poly-Lactid-Glycolid) [29, 30] und zunehmend auch als Matrixbildner für Arzneistofffreigabesysteme, z.B. Zoladex<sup>®</sup>, Enantone<sup>®</sup> und Enantone-Gyn<sup>®</sup>, Decapeptyl<sup>®</sup> Depot, eingesetzt. In vielen Untersuchungen wird Polylactiden und Poly-Glycolid-Copolymeren eine ausgezeichnete Gewebeverträglichkeit bestätigt, und zwar sowohl für Nahtmaterial als auch für Nanopartikel.

Poly lactid und Poly-Glycolid-Copolymere sind kommerziell unter der Bezeichnung Resomer<sup>®</sup> von der Fa. Boehringer Ingelheim erhältlich und werden auch noch von Birmingham Poliers, Du Pont und ICI angeboten. Die Molmassenverteilung der meisten kommerziell erhältlichen Polyactide und Poly-Glycolid-Copolymere ist symmetrisch und eng. Polylactid wird außer mit Polyglycolid auch mit Tartrat [31], Glycin [32] oder mit Poly(1,3-dioxan-2-on) [33], das auch als Polytrimethylen-carbonat bezeichnet wird, copolymerisiert. Als synthetisches Nahtmaterial wird des weiteren die Kombination Polyglycolid/Poly(1,3-dioxan-2-on) unter der Bezeichnung Maxon<sup>®</sup> [34] sowie Poly(para-dioxanon) [35] vertrieben.

Die längerkettigen Homo-und Copolyester der  $\beta$ - bzw.  $\alpha$ -Hydroxycarbonsäuren wie z.B. Poly- $\beta$ -hydroxybuttersäure oder Poly- $\epsilon$ -Caprolacton sind ebenfalls biologisch abbaubar. Aufgrund der größeren Methylengruppenzahl, der geringeren Estergruppenzahl und der dadurch erhöhten Hydrophobie, werden sie allerdings bedeutend langsamer abgebaut. Deshalb sind sie für die meisten Arzneistofffreigabesysteme weniger gut geeignet [36].

## Beispiele für klinisch eingesetzte Polymere

Depotpräparate auf der Basis biologisch abbaubarer Träger, die subcutan im Abstand von vier Wochen appliziert werden, sind zur Behandlung des hormonabhängigen Prostatakarzinoms (Enantone<sup>®</sup> [37], Decapeptyl<sup>®</sup> Depot [38], Zoladex<sup>®</sup> [39]) und der Endometriose (Enantone-Gyn<sup>®</sup> [40]) im Handel. Der polymere Träger besteht bei allen Präparaten aus einem Poly-Lactid-Glycolid-Copolymer. Bei Enantone<sup>®</sup>, Decapeptyl<sup>®</sup> Depot und Enantone-Gyn<sup>®</sup> handelt es sich um Retardmikropartikel, während Zoladex<sup>®</sup> ein monolithisches Implantat ist.

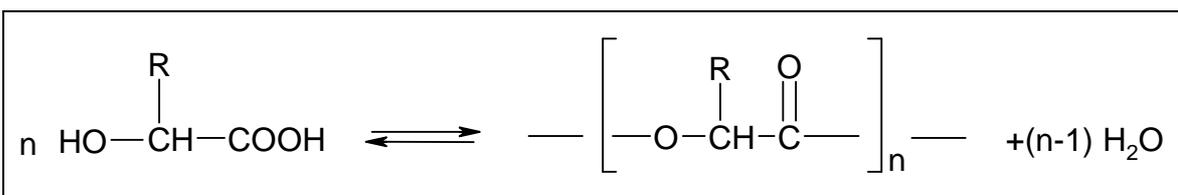
Von den verwendeten bioabbaubaren Trägern sind Polyester, insbesondere die Homo- und Copolymere der Milch- und Glycolsäure, am besten untersucht. Die Freigabe- bzw. Wirkungsdauer solcher Systeme kann von mehreren Stunden bis zu einem Jahr reichen. In einer Untersuchung [41] erreichte man z.B.- mit DL-Polylactid-Mikropartikeln, die Norethisteron enthielten, nach einmaliger i.m. Injektion eine Freigabe über 6 Monate, die die Ovulation während dieses Zeitraumes unterband.

## Synthese von Poly-Lactiden / Glycoliden

Aliphatische Polyester [42, 43] können prinzipiell auf zwei verschiedenen Wegen synthetisiert werden:

- a) Durch direkte Polykondensation [Abbildung 1] der Monomere unter Wasserentfernung [44, 45, 46].

Man erhält hierdurch Polymere mit Molmassen von etwa 10.000 g/Mol [47].

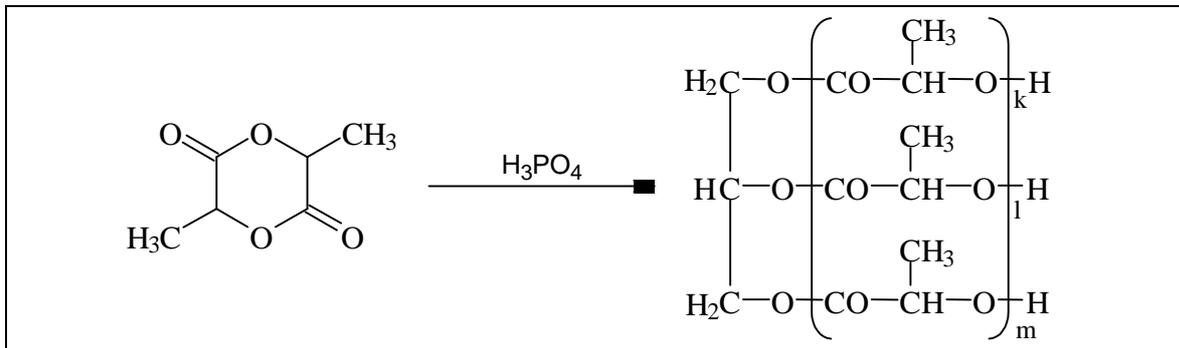


**Abbildung 1** Synthese von Poly-Lactiden / Glycoliden durch direkte Polykondensation

- b) Durch ringöffnende Polyaddition [48, 49, 50, 51] der cyclischen Dimere von Milch- bzw. Glycolsäure (Abbildung 2)

In Abhängigkeit vom verwendeten Katalysator werden hier Molmassen von mehreren 100.000 g/Mol erreicht. Üblicherweise werden zinnorganische Verbindungen wie Zinnoctanoat [52] oder einfach Wasserstoffionen in Form

von Phosphorsäure verwendet, wobei letztere wegen der physiologischen Unbedenklichkeit bevorzugt werden.



**Abbildung 2** Synthese von Poly-Lactiden / Glycoliden durch ringöffnende Polyaddition

### Abbau und Metabolismus im Körper

Polymere und Copolymere der Milch- und Glycolsäure werden in wässrigem Milieu sowohl in vivo als auch in vitro durch hydrolytische Spaltung in ihre Bestandteile Milchsäure und Glycolsäure degradiert. Das Vorhandensein eines enzymatischen Abbaus der Polymere in ihre monomeren Bestandteile in vivo wird in einigen Literaturstellen diskutiert [53], ist nach experimentellen Ergebnissen anderer Autoren jedoch unwahrscheinlich [54]. Eine Beteiligung von freien Radikalen an der Degradation wird ebenfalls diskutiert, gilt aber als eher unwahrscheinlich [55]. Die Art der Degradation ist unabhängig von der chemischen Zusammensetzung und dem Molekulargewicht der Polymere. Dagegen ist der zeitliche Verlauf der Degradation von Polymerimplantaten besonders von folgenden Faktoren abhängig: chemische Struktur und Zusammensetzung, Molekulargewicht, Oberflächenbeschaffenheit [56] und Morphologie der Implantate, Implantationsort sowie Sterilisationsbedingungen. Die Degradationszeiten liegen zwischen wenigen Wochen und mehr als einem Jahr.

**L-Lactat** ist im menschlichen Körper ein normaler Bestandteil des Kohlenhydratstoffwechsels. In der Gluconeogenese wird aus Vorstufen, z.B. dem Lactat, Glucose gebildet. Lactat wird im Gewebe unter aeroben Bedingungen oxidativ zu  $\text{CO}_2$  und Wasser degradiert. Ebenso ist es im Eiweißmetabolismus zu finden. Bei intensiver Muskelaktivität wird das Muskelglycogen über die Glycolyse zu Lactat abgebaut.

**D-Lactat** findet sich in Nahrungsmitteln wie Milch, Milchprodukten und Gemüse. In Joghurt kann der Gehalt an D-Milchsäure bis zu 0,7% betragen. D-Lactat wird bei gehemmter Glycolyse von humanen Erythrozyten gebildet und ist Abbauprodukt der Aminosäure Glycin. Im menschlichen Stoffwechsel ist D-Lactat in sehr geringen Mengen als physiologisches Zwischenprodukt messbar und wird enzymatisch umgesetzt. Der niedrige, aber konstante Plasmaspiegel spricht für eine metabolische Kontrolle. Die Abbaugeschwindigkeit von D-Milchsäure ist nicht wesentlich länger als von L-Milchsäure.

**Glycolsäure** (Glycolat) kommt in Pflanzen, zum Beispiel Zuckerrüben, unreifen Trauben und Weizen vor. Glycolat wird entweder unverändert über die Nieren ausgeschieden oder im Körper verstoffwechselt. Durch das Enzym Glycolatoxidase, das in der Leber in den Peroxisomen zu finden ist, wird Glycolsäure zu Glyoxylsäure metabolisiert. Glyoxylsäure kann zu aktivierter Ameisensäure und CO<sub>2</sub> oder, bei Vorliegen hoher Konzentrationen, zu Oxalsäure verstoffwechselt werden. Des Weiteren ist es möglich, dass Glyoxylsäure die Aminosäure Glycin bildet.

## **Biokompatibilität**

### **Polymere auf Basis der Milch- und Glycolsäure**

#### **Zytotoxizität (Biokompatibilität in vitro)**

Die Wirkung von Polymeren der Milchsäure auf die Zellproliferation wurde in Zellkultursystemen mit epithelialen Zellen der Ratte, humanen Fibroblasten und einer humanen Osteosarkomzelllinie getestet. In Abhängigkeit vom Zell- und Polymertyp zeigte sich eine minimale Retardation. Im allgemeinen war die Biokompatibilität der in der Literatur [57, 58, 59] beschriebenen Polymere zufriedenstellend.

Zur Prüfung der Toxizität von Polymeren und Copolymeren der Milch- und Glycolsäure wurden Bakterienkulturen eingesetzt. Die beschriebenen toxischen Effekte korrelierten deutlich mit dem verminderten pH-Wert einiger Polymerformulierungen. Es wurden keine den Einsatz dieser Substanzen limitierende Ergebnisse beschrieben [60, 61].

In einem in vitro Test mit Mäusefibroblasten erwiesen sich Polymere sowohl der Glycolsäure als auch der Milchsäure als nicht toxisch. Entsprechende Ergebnisse wurden bei intramuskulärer Implantation der Materialien bei der Ratte erzielt [62].

## **Sensibilisierung**

In der Literatur liegen keine detaillierten Untersuchungen zur Sensibilisierung von Polymeren und Copolymeren der Milch- und Glycolsäure vor. In älteren Untersuchungen [63, 64] wird bei Einsatz von Polymeren und Copolymeren der Milch- und Glycolsäure nicht mit antigenen Eigenschaften gerechnet.

## **Implantation (Biokompatibilität in vivo)**

In der Human- und Veterinärmedizin, sowie experimentell bei Tieren sind biologisch abbaubare Polylactide und Polyglycolide und deren Copolymere im besonderen als Nahtmaterialien, aber auch als Trägermaterial von Arzneimitteln, Implantate zum Knochenersatz und als Fixationsmaterial (Schrauben und Platten) im Einsatz.

Die Polymere wurden in unterschiedlicher chemischer Zusammensetzung und Materialbeschaffenheit bei unterschiedlichen Tierarten experimentell implantiert [65, 66, 67]. Die Tiere zeigten Wundheilungsvorgänge und geringgradige Fremdkörperreaktionen. Akute entzündliche Gewebereaktionen traten stets auf, Bindegewebsreaktionen vor allem nach subcutaner Implantation. Beide Reaktionen waren nach vollständiger Absorption des Polymers reversibel. Bei beginnender bzw. geringfügiger Degradation des Implantates fanden sich zum Teil schaumige Makrophagen im Implantationsbereich. Die Versuche zeigten keine negativen Gewebereaktionen und damit die gute Gewebeverträglichkeit der Implantate vom Zeitpunkt der Implantation bis zur Degradation.

## **Monomere**

**Milchsäure** ist nur wenig toxisch. Bei der Ratte werden LD<sub>50</sub> Werte von 2000 – 4000 mg/kg (i.p., oral, s.c.) angegeben. Der niedrigste LD<sub>50</sub> Wert beträgt 1810 mg/kg oral beim Meerschweinchen. Beim Menschen liegt die maximal verträgliche tägliche Dosis bei >1500 mg/kg. Die Angaben wurden für Racemate getroffen [68]. Milchsäure ist im Draizetest am Kaninchen an der Haut mit 5 mg und am Auge mit 750 µg über 24 Stunden lokal stark reizend.

Der Mensch nimmt seit Jahrhunderten DL-Milchsäure über die Lebensmittel auf. Eine Diät mit 0,4 % DL-Milchsäure zeigte keinen Einfluss auf das Wachstum von 2 - 4 Wochen alten Neugeborenen. Einige unreife Neugeborene wiesen nach Gaben von 800 mg/kg Körpergewicht D-Milchsäure täglich in einer Diät über 12 Tage innerhalb der ersten zwei Lebensmonate Anzeichen einer Acidose auf. L-Milchsäure zeigte diesen Effekt nicht [68].

### **Zytotoxizität (Biokompatibilität in vitro)**

Die Zytotoxizität von Dialyselösungen bestehend aus Bicarbonat und Milchsäure wurden an humanen polymorphkernigen Granulozyten untersucht. Lösungen mit 20 mM Bicarbonat und 12,5 mM Milchsäure und einem pH Wert von 7,2 waren gut verträglich [69].

Die Wirkung von D- und L-Milchsäuremonomeren auf Fibroblasten und Epithelzellen wurde getestet. Geringgradige Effekte auf die Zellmorphologie und Proliferation sowie die Differenzierung der Zellen wurden beobachtet. Wenn die untersuchten Konzentrationen an Milchsäuremonomeren in vivo durch Degradation freigesetzt würden, wäre es unwahrscheinlich, dass das umgebende Gewebe geschädigt wird. Insgesamt unterstützen die in vitro Resultate mit den Monomeren die zufriedenstellenden Biokompatibilitätseigenschaften der Polylactide [57, 58].

### **Sensibilisierung**

Tabar et al. [70] beschreiben einen sehr seltenen Fall einer allergischen Kontaktdermatitis, die durch die Bestandteile Rizinusöl und Milchsäure einer Salbe zur Warzenentfernung hervorgerufen wurde. Die allergische Reaktion wurde durch einen Patch-Test bestätigt.

### **Genotoxizität**

Im Ames Test mit *Salmonella typhimurium* verschiedener Stämme zeigte sich weder mit noch ohne Hinzufügung eines metabolischen Systems (S-9 Mix) eine mutagene Aktivität. Der Chromosomenaberrationstest in vitro an chinesischen Hamsterfibroblasten verlief ebenfalls negativ [71].

Morita et al. [72] untersuchten Milchsäure im Chromosomenaberrationstest an chinesischen Hamsterovarienzellen K1 in Abhängigkeit vom pH Wert. Bei einem pH Wert von 6,0 wurden Chromosomenaberrationen induziert, ein pH Wert von 5,7 war toxisch. In gepufferten Lösungen bzw. nach Neutralisation der Milchsäure waren die Ergebnisse im Chromosomenaberrationstest negativ.

Für **Glycolsäure** werden LD<sub>50</sub> Werte von 1950 mg/kg bei oraler Applikation bei der Ratte, von 1920 mg/kg oral beim Meerschwein und nach i.v. Injektion von 1 g/kg bei der Katze angegeben. Glycolsäure ist im Draizetest am Kaninchen mit 2 mg am Auge lokal stark reizend.

Eine toxische Wirkung der Glycolsäure kann direkt und durch ihre Stoffwechselprodukte Glyoxylsäure und Oxalsäure möglich sein. Glyoxylsäure wird eine direkte toxische Wirkung auf die Nierentubuli mit möglicher Urämie nachgesagt. Hämolyse und hirnorganische Schäden mit psychischen Störungen

wurden beobachtet. Schwerlösliche Kalziumsalze der Oxalsäure können zu Nierensteinen führen [73]. Glycolsäure wird als einer der Hauptmetaboliten bei der Ethylenglycolvergiftung angesehen, die zu hochgradiger metabolischer Acidose, Nieren- und ZNS-Schäden führen kann [74, 75].

Die orale Applikation von Glycolat und Glyoxylat in einer Rattenstudie (3% im Futter) erhöhten die Oxalatwerte im Urin innerhalb weniger Stunden. Deutliche kristalline Ablagerungen in den Nierentubuli fanden sich nach zwei Wochen [76].

Auswertbare Aussagen zur Zytotoxizität sowie generell zur Sensibilisierung und Genotoxizität wurden in der Literatur nicht gefunden [77, 78].

## **Einarbeitung von Arzneistoffen**

Monolithische Freigabesysteme können Arzneistoffe grundsätzlich in zwei verschiedenen Formen enthalten. Die Arzneistoffe sind entweder in der Polymermatrix gelöst oder darin suspendiert. Es handelt sich also dabei um feste Lösungen bzw. feste Suspensionen, wobei auch Mischformen davon vorliegen können. Welches System letztlich im Einzelfall vorliegt, hängt letztendlich von zwei Haupteinflussgrößen ab. Zum Einen ist dies die physikalische Löslichkeit des Arzneistoffes im Polymer. Diese Löslichkeit hängt ab von der Molekülgröße, der Hydrophilie von Polymer und Arzneistoff und weiteren Parametern. Zum Anderen beeinflusst die Methode der Einarbeitung das spätere Vorliegen des Arzneistoffes in starkem Maße.

Der Aggregatzustand des Arzneistoffes im Polymer ist von großer praktischer Bedeutung. Er hat Einfluss auf Freigabeverhalten, Materialeigenschaften des Polymers wie Abbaugeschwindigkeit oder Glasübergangstemperatur und Stabilität des Arzneistoffes in der Matrix.

Das Einarbeiten der freizusetzenden Substanzen in das Polymer kann auf unterschiedliche Weise erfolgen, was im Folgenden näher erläutert wird.

Beim **Löseverfahren** wird das Polymer in geeigneten Lösungsmitteln gelöst und der Wirkstoff entweder ebenso gelöst oder in suspendierter Form eingearbeitet. Die Lösung wird dann in einem dünnen Film ausgegossen. Problematisch ist anschließend das Entfernen des Lösungsmittels. Auch unter Vakuum gelingt dies häufig nur wenig zufriedenstellend und das verbleibende Lösungsmittel verändert die Eigenschaften im Sinne eines Weichmachers.

Haben die Polymere einen niedrigen Erweichungspunkt, kommt auch das sogenannte **Schmelzverfahren** in Betracht, bei dem der Wirkstoff bei einer Temperatur von 60 - 100°C in der Polymerschmelze suspendiert bzw. gelöst wird.

Die noch heiße Schmelze wird dann in einen Teflonschlauch aufgezogen, wodurch man nach dem Erkalten und Entfernen aus dem Schlauch Stäbchen erhält. Von Nachteil ist hier vor allem die relativ hohe thermische Belastung des Wirkstoffes.

Eine weitere, sehr schonende Methode zur Einarbeitung von Wirkstoffen ist die **Verpressung**. Lassen sich Polymere schon bei geringem Druck plastisch verformen, ist es möglich, das Polymer in Pulverform zu verpressen. Vorteilhaft ist hierbei, dass weder Lösungsmittel noch Wärme angewendet werden und der Wirkstoff immer in suspendierter Form vorliegt. Eingeschränkt ist nur die Formgebung. In Abhängigkeit vom Presswerkzeug lässt sich nur eine beschränkte Anzahl von Formen herstellen, wie zum Beispiel Stäbchen oder Tabletten.

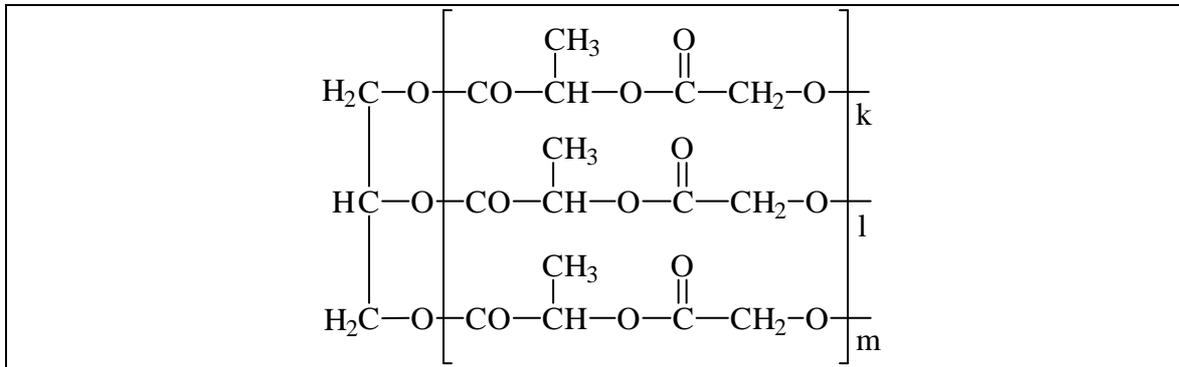
Grundsätzlich besteht auch die Möglichkeit, Polymere mittels **Extrusion** zu formen und dabei Wirkstoffe einzuarbeiten. Durch die dabei entstehenden großen Scherkräfte kann die thermische Belastung gering gehalten werden, was für Polymer und Arzneistoff von Vorteil ist. In der Formgebung ist man auf Stäbchen und Bänder beschränkt. Von Nachteil bei diesem Verfahren ist der hohe Einsatz an Polymer und Arzneistoff pro Herstellungscharge. Dies beschränkt die Extrusion auf die kommerzielle Herstellung von Formkörpern.

## **Polyol-oligo-lactide/glycolide**

Aus den vielfältigen Einsatzgebieten resorbierbarer Polymere als Implantat leiten sich unterschiedliche Anforderungsprofile ab. So benötigt resorbierbares Osteosynthesematerial eine hohe Festigkeit über einen Zeitraum von mehreren Monaten, wohingegen eine Wundabdeckung eine hohe Wasserdampfdurchlässigkeit und hohe Geschmeidigkeit erfordert. Durch entsprechende Copolymere und geeignete Reaktionsführung bei der Synthese lassen sich, ausgehend von demselben Monomer, beide Anwendungen realisieren. Diese Variation bekannter Ausgangsstoffe hat gegenüber der Suche nach gänzlich neuen Materialien den Vorteil, dass Daten über die Toxizität und Biokompatibilität vorliegen. Die Möglichkeiten der Einflussnahme auf die Eigenschaften der Polylactide, denen das Interesse hier gilt, ist vielfältig. Sie reicht von der Variation des Katalysators bei der Synthese über die Copolymerisation mit anderen Reaktionspartnern bis hin zum Mischen mit anderen Substanzen nach der Polymerisation.

Bei den untersuchten Polymeren handelt es sich um Copolymere aus Glycerin oder Ethylenglycol mit Milch und/oder Glycolsäure im Molmassenbereich von 300 bis 6000 g/Mol (Abbildung 3). Diese niedrigen Molmassen liegen in einem

Bereich, in dem es zu sehr unterschiedlichen Materialeigenschaften der verschiedenen Substanzen kommt. Sie reichen von niederviskosen Flüssigkeiten bis zu spröden, glasartigen Materialien.



**Abbildung 3** Strukturformel der Glycerol-oligo-lactide-co-glycolide

Diese Polymere unterscheiden sich von den herkömmlichen Polylactiden vor allem in drei Punkten:

- Sie haben eine geringere Molmasse und dadurch
- eine niedrige Glasübergangstemperatur
- Die hohe Hydrophilie der Moleküle bewirkt im Zusammenwirken mit der geringeren Molmasse den zum Teil deutlich schnelleren Abbau

Die Synthese erfolgt in einer ringöffnenden Polyaddition (analog zu Abbildung 2). Hierzu werden die Ausgangssubstanzen zusammen mit Phosphorsäure als Katalysator in einen Reaktionskolben eingewogen. Die Polymerisation läuft bei Temperaturen zwischen 150°C und 195°C über einen Zeitraum von 3 h bis 5 h ab.

### Abbau und Metabolismus im Körper

Der Abbau der Milch- und Glycolsäure-Ketten und der Metabolismus der Monomere erfolgt wie schon beschrieben. Da sich die Glycerol-oligo-lactide von den dort beschriebenen Monomeren und Polymeren nur durch das Glycerin unterscheiden, wird an dieser Stelle nur der Einfluss des zusätzlich verwendeten Glycerins beschrieben.

Glycerin ist ein Stoff, der physiologisch im Körper vorkommt und verstoffwechselt wird. Er ist normaler Baustein der Neutralfette. Als Spaltprodukt der Fette wird Glycerin in der Leber durch die Glycerin-Kinase mit ATP phosphoryliert und kann dann zum Aufbau von Glucose verwendet werden, oder es wird analog zu den

Kohlenhydraten zu CO<sub>2</sub> und Wasser abgebaut. Die normale Serumkonzentration nach Fasten beträgt 0,046 - 0,185 mg/ml. Bei Serumwerten bis zu 0,15 mg/ml wird Glycerin in der Niere vollständig rückresorbiert, bei höheren Werten kommt es zur osmotischen Diurese [79].

Glycerin wird sowohl als Arzneistoff in verschiedenen Infusionslösungen zur parenteralen Ernährung, Behandlung von Niereninsuffizienz und Infusionstherapie des Hirnödems eingesetzt, als auch als Hilfsstoff von oralen, lokalen und parenteralen Arzneimitteln verwendet. In der Infusionslösung Nephroplasma<sup>®</sup> 7 % sind z.B. 10 g Glycerin/1000 ml enthalten. Bei einer Dosierung von maximal 8,5 ml/kg/KGW/Tag eines 70 kg schweren Menschen werden täglich mehr als 5 g Glycerin verabreicht.

### **Zytotoxizität (Biokompatibilität in vitro)**

Im Hinblick auf die Substitution von Glucose bei der Peritonealdialyse wurden die Effekte von Glycerin und Glucose auf die Funktion von menschlichen peritonealen Mesothelzellen (HPMC) in vitro geprüft [80]. Die Lebensfähigkeit von HPMC wurde durch Glycerin leicht beeinträchtigt. Die HPMC Proliferation war durch Glycerin dosisabhängig vermindert, jedoch weniger stark als durch Glucose.

### **Genotoxizität**

Der Ames-Test war in mehreren Publikationen negativ [81]. In einer Veröffentlichung wurde von Chromosomenaberrationen in Knochenmarkszellen und Spermien der Ratte berichtet [82]. In anderen Veröffentlichungen [81] verliefen Chromosomenaberrationstests an Fibroblasten und Ovarzellen des chinesischen Hamsters negativ.

### **Implantation (Biokompatibilität in vivo)**

Pericardiale bovine Mitralklappenprothesen, die mit Glycerin behandelt und in Schafe und Ratten implantiert wurden, zeigten eine zufriedenstellende Biokompatibilität [83]. Intramuskuläre Injektionen von 1 ml 50%igem Glycerin in Kaninchen führten zu Degeneration und Nekrose von Muskelfasern. Nach 7 bis 14 Tagen waren Anzeichen einer Regeneration zu beobachten [84].

## **Nomenklatur**

Eine Benennung der Polymere nach einer im Patent vorgegebenen und durch mich systematisierten Nomenklatur für diese Polymerklasse erschien aus zweierlei Gründen sinnvoll:

1. Eine Beschränkung auf die Benennung der in dieser Polymerklasse verwendeten Ausgangsstoffe vereinfacht die Nomenklatur und erlaubt eine Abkürzung unter Erhalt einer eindeutigen Identifizierung.
2. Verschiedene Polymere lassen sich mit dieser Nomenklatur besser miteinander vergleichen. Unterschiede in der Zusammensetzung werden anhand der Benennung schon deutlich.

Die hier bearbeiteten Polymere werden gemäß folgender Nomenklatur benannt und abgekürzt:

- Der erste Buchstabe im Namen gibt die Polyolkomponente an:  
**G** steht für Glycerin, **E** für Ethylenglycol und **P** für Propylenglycol.
- Der zweite Buchstabe ist bei allen Polymeren identisch, es ist ein **O** und steht für oligo.
- Der dritte Buchstabe steht für die Säurekomponente:  
**L** bedeutet Milchsäure, **G** bedeutet Glycolsäure.
- Nach einem Bindestrich folgt die Angabe der optischen Form der Milchsäure:  
mögliche Angaben sind **L** oder **DL**.
- Nach einem weiteren Bindestrich folgt das stöchiometrische Verhältnis der einzelnen Komponenten in der Reihenfolge Polyol / Milchsäure / Glycolsäure.  
Die Angabe für die Säurekomponente bezieht sich auf das Dimer. Deshalb enthält das Oligomer-Molekül die doppelte Anzahl an entsprechenden Säurekomponenten der im Namen des Polymers aufgeführten Zahl.

Beispiele: GOL-DL-1:18 ist ein Polymer mit 36 DL-Milchsäureeinheiten auf ein Glycerinmolekül  
GOLG-L-1:1:3 ist ein Polymer mit 2 L-Milchsäureeinheiten und 6 Glycolsäureeinheiten auf ein Glycerinmolekül.  
EOL-L-1:0,5 enthält 1 L-Milchsäuremolekül auf ein Molekül Ethylenglycol.

# **Thema I**

Arzneistofffreisetzung aus  
Polymer-Stäbchen



## I.1 Einführung

Zu Beginn dieser Arbeit stand die Frage im Vordergrund, ob die Polymer-Klasse der Glycero-oligo-lactide-co-glycolide für eine Entwicklung eines monolithischen Arzneimitteldepots geeignet ist. Solche Depots werden üblicherweise unter die Haut mittels eines Trokars appliziert und entfalten von dort ihre systemische Wirkung.

Die Verwendung solcher Wirkstoffdepots für die systemische Therapie setzt voraus, dass es sich bei den Wirkstoffen um hochpotente Substanzen (z.B. Hormone) handelt, die in den geringen applizierten Mengen ihre Wirkung über mehrere Tage und Wochen entfalten können.

Sollen Wirkstoffdepots in der lokalen Therapie eingesetzt werden, können auch Substanzen Verwendung finden, die eine geringere Wirkpotenz besitzen. Die maximal mögliche Applikationsmenge reicht aus, um lokal wirksame Wirkstoffspiegel zu erreichen. Als Applikationsorte für solche stäbchenförmige Arzneimittelträger käme nicht nur die Subcutis in Frage. Das Einbringen eines Arzneimittel-Trägers in das Operationsfeld während eines chirurgischen Eingriffes wäre ebenfalls denkbar. Als mögliche Substanzgruppen kommen hierbei Antibiotika [85] oder Zytostatika [86, 87, 88] in Frage.

Die Eigenschaften dieser Polymere, wie Abbauprozess und Freisetzungverhalten waren bisher im Detail noch nicht untersucht worden, aber aus der Analogie zu den bekannten Poly-lactiden-co-glycoliden in gewissem Maße abschätzbar. Im Vordergrund der Untersuchungen stand, in wie weit sich verschiedene Polymere in ihrer Abbauprozess unterscheiden. Durch die Variation der verschiedenen Bestandteile dieser Polymere in Menge und Verhältnis zueinander ist eine unübersehbare Anzahl unterschiedlicher Substanzen vorstellbar. Aus dieser Anzahl an Substanzen wurden beispielhaft Vertreter ausgewählt und näher untersucht. Als Differenzierungsmerkmal wurde die Copolymer-Zusammensetzung und die Stereoisomerie des Lactides gewählt. Die Molmasse der verwendeten Polymere lag in einem Bereich, bei dem die Formstabilität der hergestellten Stäbchen bei 37°C über einen längeren Zeitraum gewährleistet war.

Ein zweiter wichtiger Punkt bei den Untersuchungen war, Kenntnis über Steuerungsmöglichkeiten der Freisetzung verschiedener Arzneistoffe zu gewinnen. Entscheidende Faktoren sind der Aggregatzustand des inkorporierten Arzneistoffes, dessen Korngröße, seine Hydrophilie und weitere physikalisch-

chemische Eigenschaften. Ebenso spielt die Art und Weise der Einarbeitung des Arzneistoffes in das Polymer eine entscheidende Rolle.

## I.2 Materialien und Methoden

### I.2.1 Substanzen

#### I.2.1.1 Polymere

In Tabelle 1 sind sämtliche Polymere aufgeführt, die in den folgenden Untersuchungen verwendet wurden. Die Polymere wurden in einer Chargengröße von ca. 500 g in den Labors der Merck KGaA synthetisiert.

**Tabelle 1**      **Verwendete Polymere**

<b>Polymer</b>	<b>Charge</b>
GOL-L-1:18	96/Da/655
GOL-DL-1:18	96/Da/659
GOLG-DL-1:9:9	97/Hfm/7
GOLG-DL-1:13,5:4,5	97/Hfm/8
GOLG-DL-1:4,5:13,5	97/Hfm/9
GOL-L-1:1	Hfm 94/83
GOL-L-1:2	Hfm 95/78
GOL-L-1:3	Hfm 94/9
GOL-L-1:4	Hfm 94/114
GOL-L-1:5	Hfm 94/103
GOL-L-1:6	Hfm 95/7
GOL-L-1:12	Hfm 95/61
GOL-L-1:15	Hfm 95/39
GOL-L-1:18	Hfm 95/62
GOL-L-1:22	Hfm 95/40
GOL-L-1:30	Hfm 95/2

### I.2.1.2 Arzneistoffe

**Tabelle 2**      **Verwendete Arzneistoffe**

Polymer	Hersteller
Gentamicin-Sulfat	Merck KGaA
Gentamicin-Base	Eigenherstellung
Methotrexat Na-Salz, lyophilisiert	Biosyn
Methotrexat Säure, mikronisiert	Biosyn

### I.2.1.3 Sonstige Substanzen

**Tabelle 3**      **Verwendete Substanzen**

Substanz	Hersteller
Bacillus subtilis ATCC 6633	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen, Braunschweig

### I.2.1.4 Untersuchungsmedien

**Tabelle 4**      **Zusammensetzung der verwendete Pufferlösungen**

Abk.	Bezeichnung	Zusammensetzung	
PBS	Isotonischer Phosphatpuffer pH 7,4 mit Kochsalz	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$	19,10 g/l
		$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1,85 g/l
		NaCl	4,40 g/l
		Aqua dest.	ad 1000,0 ml
PP 7,4	Phosphatpuffer 0,015 molar	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	9,58
		$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1,74
		Aqua dest.	ad 1000,0 ml

## I.2.2 Geräte

**Tabelle 5      Verwendete Geräte**

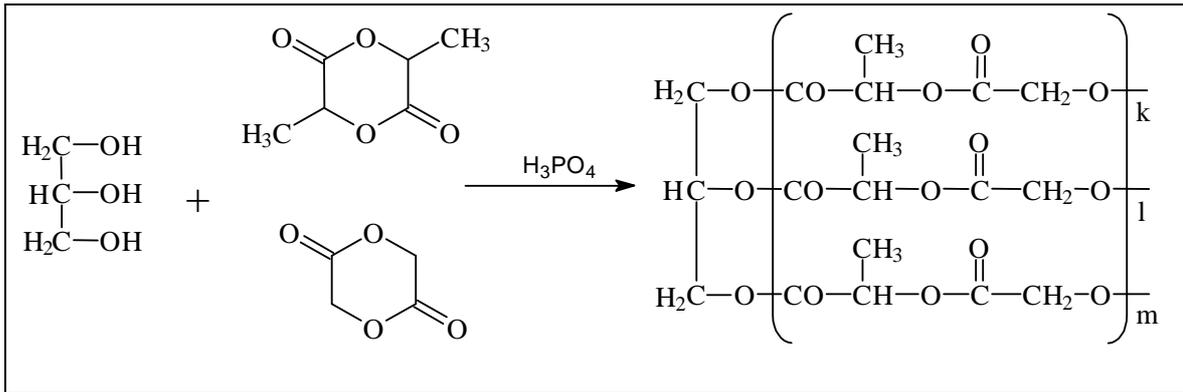
Gerät	Hersteller
Analysensiebe	Hayer & Boecker, Oelde
Autoklav	München-Medizin-Mechanik, München
Bioeye-Bildanalysensystem mit Auswertungssoftware	ISRA, Darmstadt
Brutschrank	Memmert, Schwabach
Microlab 10000 (automatischer Dilutor)	Hamilton Bonadoz AG, Schweiz
Mikropräzisionspipette verschiedener Volumina mit Spitzen	Eppendorf, Hamburg
pH-Meter, CG 841	Schott, Hofheim
Rotorschnellmühle Pulverisette 14	Fritsch GmbH Laborgerätebau, Idar-Oberstein
Schlagbalkenmühle	Janke & Kunkel, Staufen i.Br.
Presswerkzeug	E. Merck ZVE-I
Teflonschläuche Innendurchmesser 3mm, Außendurchmesser 5mm	Bender & Hobein, Bruchsal
Exzentermischer	Turbula, Schweiz

## I.2.3 Methoden

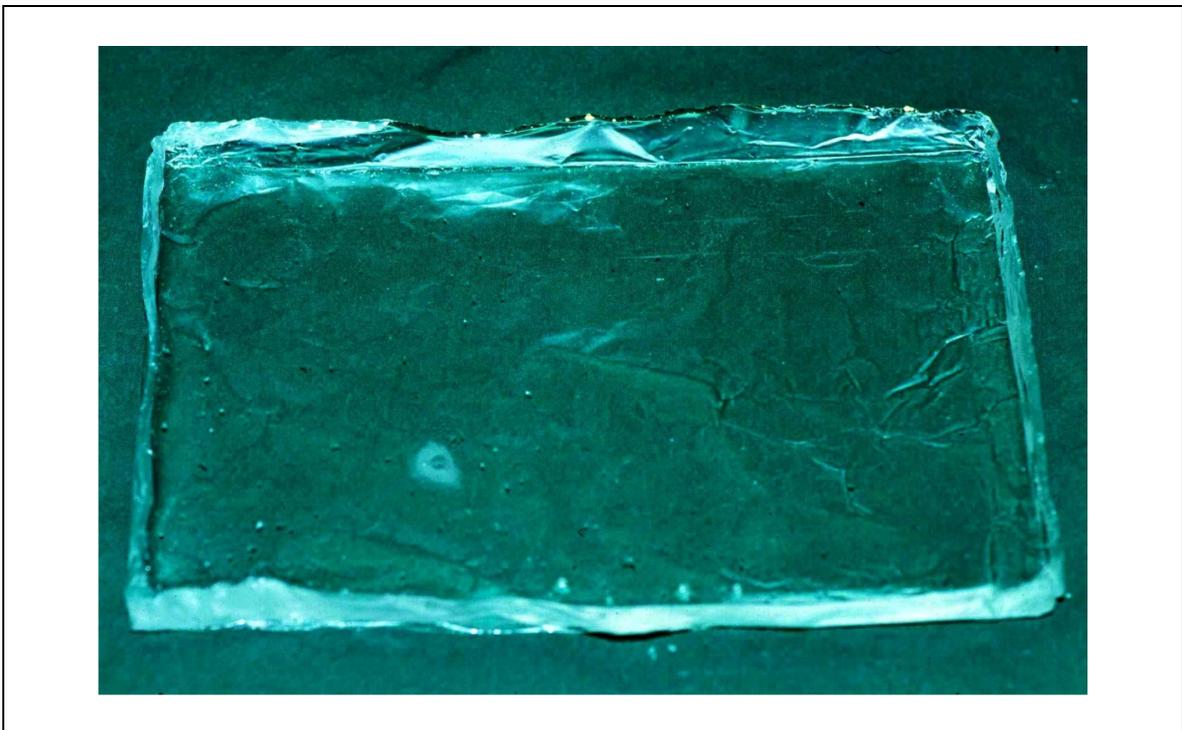
### I.2.3.1 Synthese der Polymere

Die Synthese der verwendeten Polymere erfolgte jeweils auf gleiche Weise (Abbildung 4). Beispielhaft soll dies an der Synthese von GOL-L-1:18 beschrieben werden.

In einen Dreihalskolben werden 400g L-Lactid und 14,2 g Glycerin eingewogen. Dazu werden 3,5 ml Phosphorsäure (85%) zupipetiert. In einem temperierten Ölbad wird der Kolben mit folgendem Temperaturprogramm erhitzt und 0 - 30 min auf 100°C, 30 - 60 min auf 150°C und 5 Stunden auf 150°C gehalten. Danach erfolgt das Ausgießen in eine Aluminiumform. Nach Abkühlung und Entfernen erhält man einen Polymerblock, wie er in Abbildung 5 zu sehen ist.



**Abbildung 4** Synthese der Glycerol-oligo-lactide-co-glycolide



**Abbildung 5** Polymerblock nach der Synthese

### I.2.3.2 Polymercharakterisierung

#### I.2.3.2.1 Restgehalte

Niedermolekulare Stoffe in einem Polymer verändern dessen Eigenschaften in unterschiedlicher Weise. So können zum Beispiel hydrophile Stoffe bei Kontakt mit Wasser schnell herausgelöst werden und durch Porenbildung zu einer vergrößerten inneren Oberfläche des verbleibenden Polymers führen. Daraus resultiert zuletzt eine schnellere Hydrolyse. Nicht umgesetztes Lactid oder

Glycolid werden zu den entsprechenden Säuren hydrolysiert und führen so zu einer pH-Verschiebung. Aus diesem Grund wurden die Restgehalte beider Ausgangsmomomere untersucht.

### **Lactid, Glycolid, Glycerin, Milchsäure und Glycolsäure**

Die beiden  $\alpha$ -Hydroxycarbonsäuren wurden gaschromatographisch bestimmt. Hierbei konnten beide Produkte in einer Analyse nebeneinander bestimmt werden. Die Anlage hatte folgende Spezifikationen:

Stationäre Phase:	Sil 8
Säule:	Quarzkapillare, 25 m Länge, 0,32 mm Durchmesser, 1,2 $\mu$ m Filmdicke
Temperaturprogramm der Säule:	140°C nach 10 min. 200°C nach 30 min. 25 0°C
Injektor-Temperatur:	180°C
Detektor:	FID
Detektortemperatur:	250°C
Trägergas:	Helium
Probenvorbereitung:	400 mg Probe in 1 ml Chloroform
Standards:	20 mg Glycolid+20 mg Lactid in 10 ml Chloroform

#### **I.2.3.2.2 Molmasse**

Ein wichtiger Parameter der Polymeranalytik ist die Bestimmung der Molmasse. Es stehen unterschiedliche Verfahren zur Verfügung, bei denen entweder direkt oder indirekt die Molmasse ermittelt wird. Verwendet wurde hier die Gel-Permeations-Chromatographie (GPC). Es handelt sich dabei um eine indirekte Methode, bei der gegen einen Polymerstandard geeicht werden muss. Für diese Eichung stehen mehrere Methoden zur Verfügung. Die Wichtigsten sind:

- a) Eichung gegen engverteilte Standards (narrow distributed Standards, ND)
- b) Eichung mit breiten Standards (broad standard calibration)
- c) Universelle Eichung unter Verwendung des Staudinger Indexes und der Mark-Houwink-Gleichung (universal calibration)

Für die hier betrachteten Polymere ergibt sich das Problem, dass weder Standards für die Methode a) und b), noch verlässliche Mark-Houwink-Parameter (Methode c) vorliegen. Es ist daher üblich, die GPC mit engverteilten Polystyrol-Standards nach Methode a) zu eichen. Man misst bei konstantem Fluss die Elutionszeiten der ND-PS-Standards und passt ein Polynom höherer Ordnung an die Datenpunkte an.

Auch Aussagen über die Molekulargewichtsverteilungen (Molecular Weight Distribution) lassen sich anhand einer GPC-Analytik bestimmen, denn hiervon hängen praktisch alle wichtigen Eigenschaften, insbesondere die mechanischen des Polymers ab.

MWD's werden qualitativ mit den Begriffen breit, eng, symmetrisch, multimodal u.a.m. beschrieben. Eine mehr quantitative Aussage liefert die Berechnung der sog. Polydispersität  $D$ , wie sie in Gleichung 1 wiedergegeben ist. Ein niedriger Zahlenwert deutet auf eine enge Molmassenverteilung hin.

$$D = \frac{M_w}{M_n}$$

### Gleichung 1 Polydispersität

$D$ : Polydispersität     $M_n$ : Zahlenmittlere Molmasse     $M_w$ : Gewichtsmittlere Molmasse

Die GPC als Relativmethode führt zwangsläufig zu Fehlern, da die nur aus C-C-Verknüpfungen aufgebauten Polystyrole sich in Lösung ganz anders verhalten als die Poly-(lactide) bzw. Poly-(glycolide) oder deren Copolymere. Deshalb findet man in der GPC viel zu hohe Molekulargewichte. GPC-Daten lassen sich untereinander nur vergleichen, wenn sie mit der gleichen Methode bestimmt wurden.

$M_n$     Zahlenmittlere Molmasse

$M_w$     Gewichtsmittlere Molmasse

$M_z$     Z-Mittlere Molmasse

Die Anlage zur Bestimmung der Molmasse hatte folgende Ausstattung:

Apparatur:	Merck-Hitachi L-6000 Pumpe
Dosiersystem:	Valco 100 $\mu$ l
Trennsäule:	LiChrogel PS 4 (10 $\mu$ m) + PS 40 (5 $\mu$ m)
Säulentemperatur:	30°C
Eluent:	Tetrahydrofuran
Fließgeschwindigkeit:	0,5 ml/min.
Detektor:	Merck-Hitachi RI-71
Auswerteverfahren:	Merck-Hitachi GPC-Integrator D-2520
Probenvorbereitung:	5 mg Standards, 20 mg Probe auf 5 ml Eluent
Standards:	Polystyrol (Merck) mit den Molmassen 580, 950, 2050 und 5100

Zur Stabilisierung der Basislinie wurde eine Säule des Typs 250-4 LiChorsorb Si 60 (5µm) zwischen Pumpe und Injektionssystem geschaltet.

Die zu untersuchenden Polymere wurden in einem 5 ml Messkolben genau eingewogen und in Eluent gelöst. Als Eichstandard wurde Polystyrol der Molmassen 580, 950, 2050 und 5100 verwendet.

### **I.2.3.3 Herstellung der Prüfkörper**

Zur Herstellung von lösungsmittelfreien Polymerstäbchen ist die Extrusion die Methode der Wahl, falls die zu inkorporierenden Substanzen thermisch genügend stabil sind. Da aber zur Zeit der Untersuchungen kein Laborextruder zur Verfügung stand, musste nach einer anderen Herstellungsmethode gesucht werden.

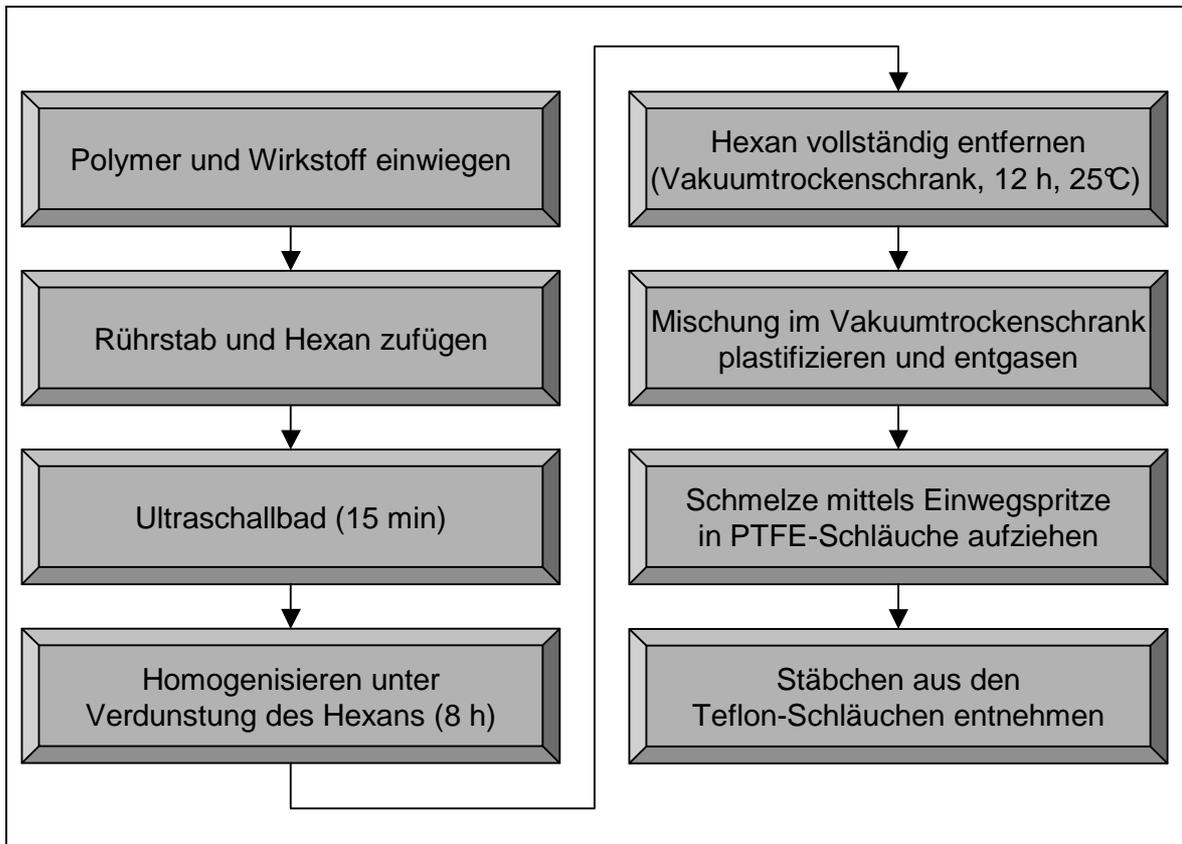
Als die am geeigneten erschien die Schmelzmethode nach Remmele [89], die durch Herrlinger [90] modifiziert und vereinfacht wurde. Diese Methode hat den Vorteil, dass sehr geringe Polymer- und Substanzmengen verwendet werden können, wohingegen die Extrusionsmethode Chargengrößen von mindestens 100 g benötigt. Diese im Folgenden beschriebene Methode erlaubt es, aus kleinsten Mengen homogene Polymerstäbchen herzustellen. Es werden hierbei Polymer/Wirkstoffmassen thermisch plastifiziert und mit Hilfe eines angelegten Unterdruckes in Teflonschläuche mit gewünschtem Durchmesser eingesaugt. Die Stäbchen werden anschließend mit Hilfe eines dünnen Metallstabes aus den Teflonschläuchen herausgedrückt. Abbildung 6 zeigt anhand eines Flow-charts den Ablauf der Herstellung von Stäbchen nach dieser Methode.

Um aus den Polymeren ein Pulver zu erhalten wurden die bei der Synthese anfallenden Polymerplatten (Abbildung 5) mit einem Hammer grob zerkleinert. Um ein Zersplittern zu vermeiden, wurden die Polymerplatten in silikonisiertes Papier eingeschlagen. Die so erhaltenen Polymerstücke wurde dann in einer Schlagbalkenmühle zu einem Pulver zerkleinert. Der Mahlvorgang dauerte wenige Sekunden, so dass eine Kühlung mit Trockeneis nicht notwendig war. Anschließend wurde das Pulver mittels Analysesieben klassiert, so dass letztlich ein Polymerpulver mit einer Partikelgröße von 125 - 250 µm vorlag.

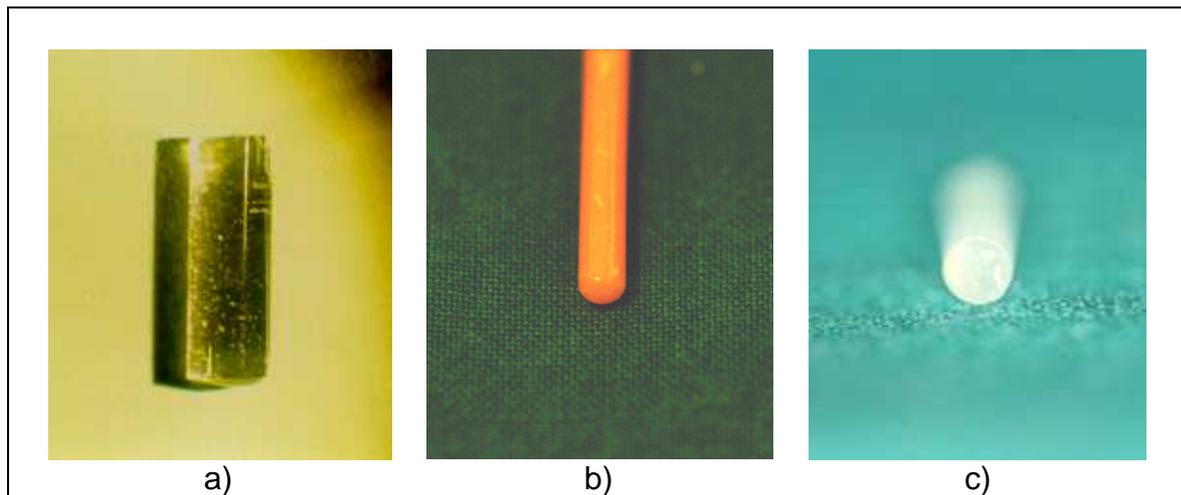
Um den Wirkstoff homogen in das Polymer einzuarbeiten wurden der Wirkstoff und die Polymerpartikel in n-Hexan dispergiert und verrührt. Hexan ist weder für die Polymere noch für die wasserlöslichen Wirkstoffe ein Lösungsmittel und lässt sich wegen seines niedrigen Dampfdruckes rasch und einfach entfernen. Die Ultraschallbehandlung der in Hexan dispergierten Teilchen bietet außerdem den Vorteil, dass die fein gemahlene Wirkstoffe, die stark zur Agglomeration neigen, besonders fein dispergiert werden. Dadurch, dass Einwaage, Mischen und

Herstellung in einem Gefäß erfolgen kann, lassen sich mit dieser Methode schon aus wenigen Gramm Substanz / Polymermischung homogene Stäbchen herstellen.

Die Wirkstoffe, die in Hexan löslich sind und deshalb nicht nach obiger Methode eingemischt werden konnten, wurden mittels einer Reibschale homogen in das Polymerpulver eingearbeitet.



**Abbildung 6** Ablauf der Polymerstäbchen-Herstellung



**Abbildung 7** Verschiedene Stäbchen hergestellt durch Aufziehen in einen Teflonschlauch

a) Stäbchen ohne Wirkstoff b) methotrexathaltiges Stäbchen c) gentamicinhaltiges Stäbchen

### I.2.3.4 Einlagerungsversuche und Probengewinnung

Die Einlagerungen für die Abbau- und Freisetzungsversuche wurden - falls bei einzelnen Versuchen nicht anders angegeben - unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Das Polymer-Stäbchen wurde nach Wägung in ein Schnappdeckel-Gläschen gelegt und mit 20 ml auf 37°C vorgewärmter Pufferlösung überschichtet. Die Lagerung erfolgte bei 37°C in einem Brutschrank. Eine Agitation fand nicht statt. Erfolgte die Probenentnahme nicht täglich, so wurde das Gläschen einmal täglich umgeschüttelt. Bei der Entnahme von Elutionsmedium wurde - falls nicht anders angegeben - die komplette Menge ausgetauscht.

Eine Lagerung in Serum wurde nicht durchgeführt, da der Einfluss von unspezifischen Esterasen auf den Abbau von Polylactiden als sehr gering erachtet wird [91, 92]. Der Einfluss des pH-Wertes [93, 94] und der Ionenstärke [93, 94, 95] hingegen ist deutlich höher, weshalb 0,15-molarer Phosphatpuffer pH 7,4 als geeignetes Testmedium ausgewählt wurde.

#### I.2.3.4.1 pH-Wert

Um einen ersten Eindruck von der Abbaugeschwindigkeit der Polymere zu gewinnen, wurden Polymerstäbchen in PBS-Puffer gelagert, und es wurde zu bestimmten Zeitabschnitten der pH-Wert gemessen. Die Stäbchen hatten eine Länge von etwa 2 cm und einen Durchmesser von 3 mm, die Puffermenge betrug 30 ml.

Diese Methode gibt nur einen recht groben Einblick in das Abbauverhalten der Polymere, lässt jedoch deutliche Unterschiede zwischen verschiedenen Polymeren erkennen.

#### I.2.3.4.2 Wasseraufnahme

Um Aussagen über das Quellungsverhalten der untersuchten Polymere machen zu können, wurde die Wasseraufnahme bestimmt. Dies geschah durch Wägung der Prüfkörper vor Einlegen in das Prüfmedium, direkt nach der Entnahme und nach Trocknung. Die Wasseraufnahme (WA) berechnet sich dann nach Gleichung 2

$$WA[\%] = \frac{(G_f - G_t) * 100}{G_t}$$

#### Gleichung 2 Berechnung der prozentualen Wasseraufnahme

WA: Wasseraufnahme    G<sub>f</sub>: Feuchtgewicht    G<sub>t</sub>: Gewicht nach Trocknung

Für die Durchführungen wurden Polymerstäbchen mit einem Durchmesser von 3 mm und einer Länge von ca. 12 mm verwendet, was einer Masse von ca. 100 mg entsprach. Die Stäbchen wurden genau gewogen und in Rollrandgläschen gelegt. Es wurden 20 ml auf 37°C vortemperierter Puffer hinzugefügt und die Gläschen mit einem Kunststoffdeckel verschlossen. Die Lagerung erfolgte bei 37°C. Die Gläschen wurden täglich vorsichtig umgeschüttelt. Zu jedem Prüfzeitpunkt wurden jeweils 3 Prüfmuster entnommen und das oberflächlich anhaftende Wasser mit einem Tuch vorsichtig entfernt. Nach sofortigem Wiegen (G<sub>f</sub>) wurden die Polymerstäbchen über 3 Tage im Exsikkator bei Raumtemperatur bis zur Gewichtskonstanz getrocknet (G<sub>t</sub>).

#### I.2.3.4.3 Polymermassenabnahme

Die Polymermassenabnahme erfolgte ebenfalls gravimetrisch und wurde nach Gleichung 3 berechnet.

$$MA[\%] = \frac{(G_a - G_t) * 100}{G_a}$$

#### Gleichung 3 Berechnung der prozentualen Molmassenabnahme

MA: Polymermassenabnahme    G<sub>a</sub>: Ausgangsgewicht    G<sub>t</sub>: Gewicht nach Trocknung

Die Versuchsbedingungen waren identisch mit denen bei der Bestimmung der Wasseraufnahme.

#### **I.2.3.4.4 Bestimmung der Abbauprodukte**

Milchsäure und Glycolsäure fallen beim hydrolytischen Abbau der Polymere neben Glycerin entweder als kurzkettige Oligomere oder als Monomere an. Im Freigabemedium sind sie damit ein Indikator für den fortschreitenden Abbau.

Es wurde für jeden Messpunkt jeweils 1 ml Prüfmedium entnommen und durch die gleiche Menge frischen Puffer ersetzt. Um die Hydrolyse bis zu den Monomeren zu vervollständigen wurden 50 µl 3 N-NaOH zugesetzt und nach zwölf Stunden der Gehalt an Milchsäure und Glycolsäure HPLC-analytisch bestimmt.

Die Analytik erfolgte an einer HPLC-Anlage von Merck-Hitachi mit folgender Ausstattung:

Säule:	Polysphere OA HY (ohne Vorsäule)
Eluent:	0,01 N Schwefelsäure
Fluss:	0,6 ml/min
Säulentemperatur:	60°C
Detektion:	215 nm

Die Retentionszeiten lagen bei der Glycolsäure bei etwa 9,1 min, bei der Milchsäure bei etwa 9,8 min.

#### **I.2.3.5 Freisetzungsuntersuchungen**

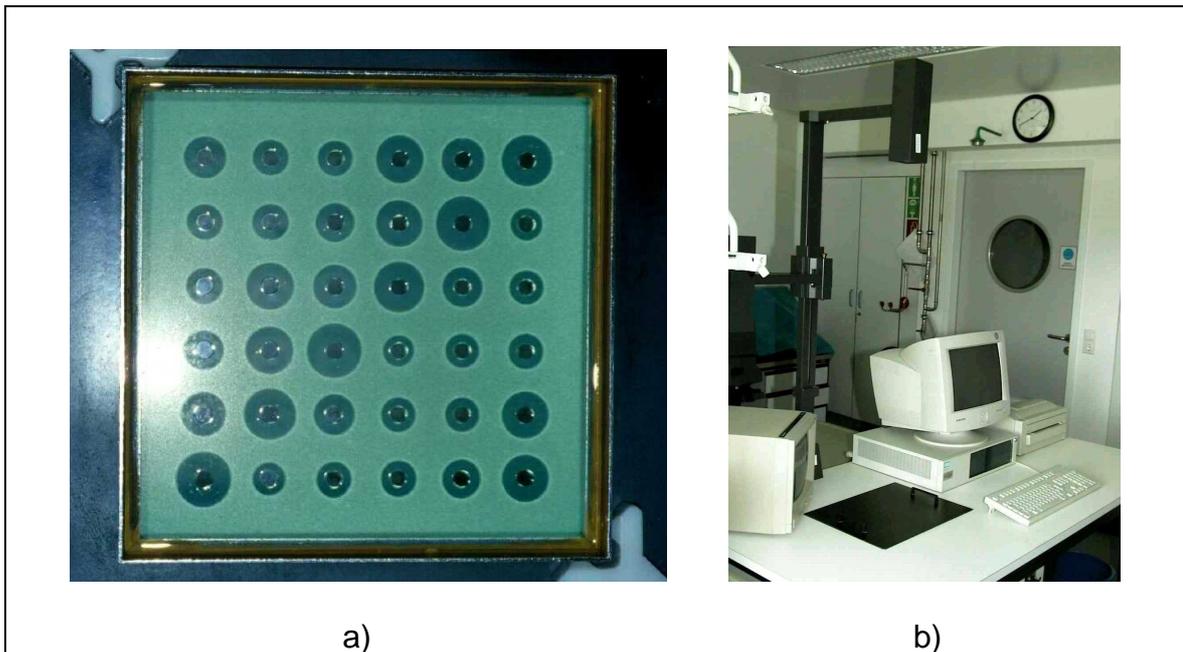
Für die Freisetzungsuntersuchungen konnten wie für die Polymeranalytik Stäbchen mit einem Durchmesser von 3 mm und einer Länge von ca. 12 mm verwendet werden, was einer Masse von ca. 100 mg entsprach. Die Stäbchen wurden genau gewogen und in Rollrandgläschen gelegt. Es wurden 20 ml auf 37°C vortemperierter Puffer hinzugefügt, die Gläschen mit einem Kunststoffdeckel verschlossen und bei 37°C gelagert. Die Gläschen wurden täglich vorsichtig umgeschüttelt. Zu jedem Prüfzeitpunkt wurden jeweils 3 Prüfmuster entnommen und dabei das Medium komplett gewechselt.

##### **I.2.3.5.1 Gentamicin-Bestimmung**

Die Konzentrationsbestimmungen von Gentamicin im Freisetzungsmedium erfolgte mit einer mikrobiologischen Methode, bei der die Hemmwirkung auf einen Bakterien-Teststamm als Maß für die Gentamicin-Konzentration diente.

Die Hemmwirkung von Gentamicin auf *Bacillus subtilis* wurde in einem Agardiffusionstest bestimmt. Dazu wurden in den mit dem Testkeim beimpften Nährboden Löcher gestanzt, die mit dem Testmedium und abgestuften Verdünnungen des Standards gefüllt wurden. Als Teststamm wurde die Sporensuspension von Sporen des *Bacillus subtilis* ATCC 6633 eingesetzt. ATCC-Stämme sind standardisierte Stämme der American Type Culture Collection.

Nach einer Inkubationszeit von 18 Stunden wurden die Durchmesser der Hemmhöfe in einem Auswertesystem gemessen.



**Abbildung 8** a) Agarplatte b) optisches Auswertesystem

Dieses Gerät erfasst über eine Videokamera ein Durchsicht-Bild der transparenten Agarplatten. Ein angeschlossener Computer berechnet daraus die Größe der Hemmhöfe und ermittelt dann anhand einer Standardgerade, welche durch das Auftragen der Logarithmen der Konzentrationen gegen die zugehörigen Hemmhofdurchmesser erhalten wird, die Antibiotika-Konzentrationen der Proben.

Die Proben wurden entweder am gleichen Tag untersucht oder bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren und erst am Versuchstag aufgetaut.

Der Testbereich lag zwischen  $5,0 \mu\text{g/ml}$  und  $0,3125 \mu\text{g/ml}$ , die Nachweisgrenze bei  $0,05 \mu\text{g/ml}$ .

Zusätzlich zu den 5 Standardverdünnungen wurde ein unabhängiger Referenzwert aufgetragen, um eine zusätzliche Kontrolle des Versuchs zu haben.

Die Proben wurden gegebenenfalls nach dem Ergebnis eines Vortests verdünnt. Als Verdünnungsmedium wurde Phosphatpuffer verwendet. Die Verdünnungen wurden so gewählt, dass die ausgewerteten Konzentrationen innerhalb der Standardreihe liegen.

Zur Beschickung der Platten wurden in die entsprechenden Stanzlöcher nach einem festgelegten Plan mit einer Mikropräzisionspipette 20 µl Standardlösung bzw. Probe pipettiert.

Mit jeder Standardlösung bzw. Probe wurden 3 Stanzlöcher pro Platte beschickt. Es wurden jeweils 2 Platten parallel mit 5x Standard-, 1x Referenz- und 6x Probenlösung nach einem vorgegebenen Schema beschickt.

#### **I.2.3.5.2 Methotrexat-Bestimmung**

Beim Wechsel des Elutionsmediums und der Probengewinnung war beim Methotrexat besondere Vorsicht geboten. Es handelt sich bei diesem Arzneistoff um ein potentes Zytostatikum (LD<sub>50</sub>: 160 mg/kg; oral, Ratte). Alle damit in Berührung gekommenen Geräte, Materialien und Lösungen mussten zur Dekontamination in 5%iger KOH-Lösung bei 120°C 30 Minuten lang autoklaviert werden. Die Bestimmung des Methotrexats in den Eluatn erfolgte über eine HPLC-Methode.

Die Analytik erfolgte an einer HPLC-Anlage von Merck-Hitachi

Säule: Lichrospher 100 RP-18 (5µ)  
Fließmittel: 7 g Natrium-dihydrogen-phosphat  
5 ml Phosphorsäure 85%  
1 l Acetonitril  
4 l Aqua bidest  
pH 2,6  
Fluss: 1,0 ml/min  
Druck: 120 bar  
Detektion: Diodenarray 215 nm

Die Retentionszeit betrug in diesem System etwa 4 - 5 min. Abbildung 9 zeigt ein typisches Chromatogramm.

Die Proben konnten ohne Vorbehandlung und meist ohne Verdünnung analysiert werden. Die Nachweisgrenze betrug 0,05 µg/ml.

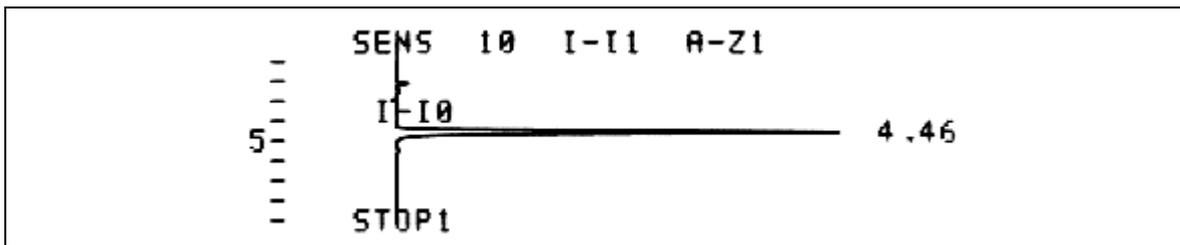


Abbildung 9 Typisches HPLC-Chromatogramm von Methotrexat

## I.3 Ergebnisse und Diskussion

### I.3.1 Molmasse der Polymere

#### I.3.1.1 Einfluss des Glyceringehaltes

Wie schon im Einleitungsteil erwähnt, liegt ein großer Vorteil der Co-Synthese von Lactid und / oder Glycolid mit polyfunktionellen Alkoholen in der guten Steuerbarkeit der Molmasse.

Anhand fünf verschiedener Glycero-oligo-L-lactide (Tabelle 6) wurde die Abhängigkeit der Molmasse vom Verhältnis Milchsäure zu Glycerin untersucht.

Tabelle 6 Übersicht über Polymere und deren Molmasse

Charge	GOL-L	$M_n$	$M_w$	$M_z$
Hfm 94/83	1:1	290	340	400
Hfm 95/78	1:2	440	530	840
Hfm 94/9	1:3	700	860	1060
Hfm 94/111	1:4	1010	1280	1610
Hfm 94/103	1:5	1010	1360	1790
Hfm 95/7	1:6	1340	1850	2450
Hfm 95/61	1:12	2610	3850	5520
Hfm 95/39	1:15	3060	4690	7230
Hfm 95/62	1:18	3680	5980	8910
Hfm 95/40	1:22	4440	7600	13150
Hfm 95/2	1:30	5950	10600	18060

Mit Abnahme des Glycerinanteils steigt die Molmasse der Polymere an. Milchsäureanteil und Molmasse verhalten sich in etwa proportional, eine Verdoppelung des Milchsäureanteils führt also zu einer Verdoppelung der Molmasse. Aus rein praktischen Erwägungen wurde eine Kurvenanpassung mittels linearer Regression vorgenommen. Es sollte versucht werden, anhand einer empirisch gewonnenen Formel eine Vorhersage der Molmasse treffen zu können. Für die gewichtsmittlere Molmasse wurde Gleichung 4 ermittelt:

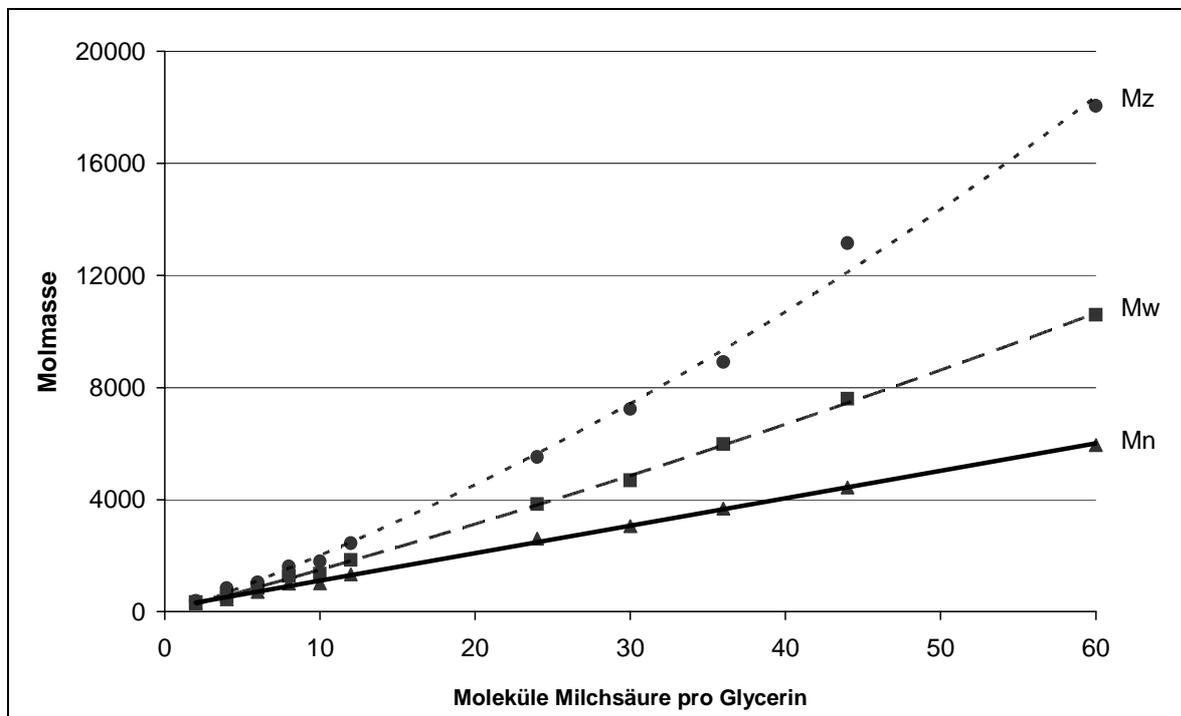
$$M_n = 97,97 x + 126,94$$

#### Gleichung 4 Empirisch gefundene Gleichung zur Abschätzung der zahlenmittleren Molmasse abhängig von der Glycerinmenge

x: Anzahl der Mole Milchsäure

Hierbei steht x für Anzahl der Mole an Milchsäure im Polymer. Das Bestimmtheitsmaß betrug 0,998. Die Molmasse von neu synthetisierten Polymeren konnte so mit einer Genauigkeit von etwa  $\pm 10\%$  vorhergesagt werden.

Abbildung 10 zeigt die entsprechenden Verläufe grafisch.



**Abbildung 10 Molmasse der Polymere bei unterschiedlichem Glycerin/Milchsäureverhältnis**

▲ : zahlenmittlere Molmasse Mn      ■ : gewichtsmittlere Molmasse Mw  
 ● : Z-mittlere Molmasse Mz

### I.3.1.2 Einfluss der Syntheseparameter

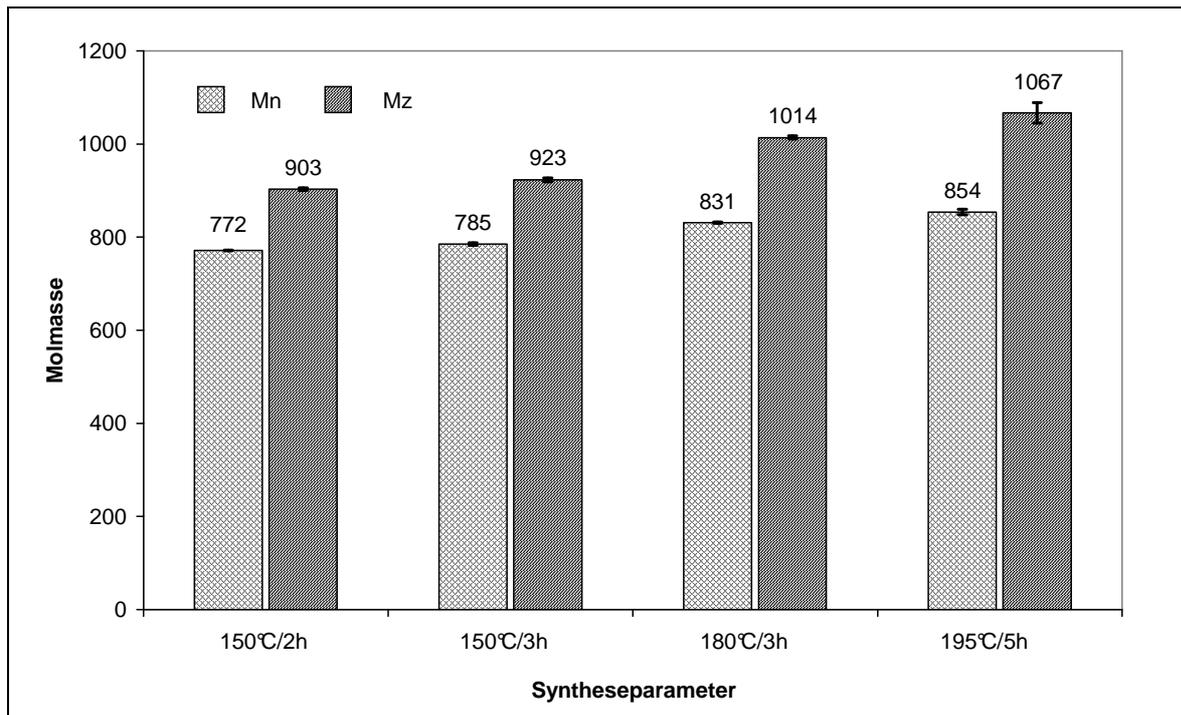
Um den Einfluss des Syntheseweges auf die Polymereigenschaften zu untersuchen, wurde ein Polymer einer bestimmten Zusammensetzung unter vier verschiedenen Synthesebedingungen hergestellt.

Als Beispielpolymer wurde ein GOL-L-1:4 gewählt, das bei folgenden Reaktionsbedingungen synthetisiert wurde:

**Tabelle 7      Syntheseparameter**

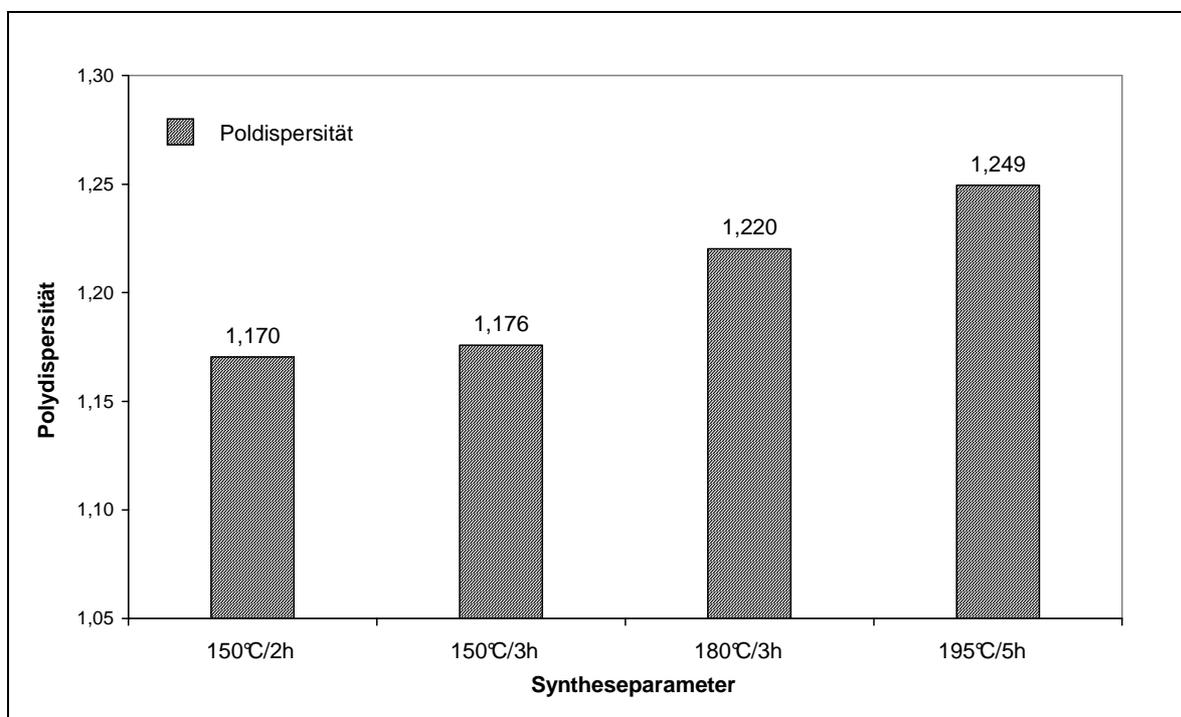
Charge	Temperatur	Synthesedauer
Hfm 95/82	150°C	2 h
Hfm 95/81	150°C	3 h
Hfm 95/88	180°C	3 h
Hfm 95/79	195°C	5h

Es werden zweierlei Effekte sichtbar. Die Molmasse der Polymere steigt mit zunehmender thermischer Einwirkung, wobei der Einfluss auf die zahlenmittlere Molmasse weniger stark ausgeprägt ist als der auf die gewichtsmittlere Molmasse (Abbildung 11). Dieser unterschiedlich starke Einfluss der Reaktionszeit bzw. -temperatur führt zum zweiten Effekt, dem Anstieg der Polydispersität (Abbildung 12). Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass es bei zunehmender thermischer Belastung während der Synthese zu Umesterungsreaktionen kommt. Es spalten sich also immer wieder einzelne oder mehrere Milchsäuremoleküle von einer bestehenden Polymerkette ab, um an anderer Stelle wieder anzupolymerisieren. Längere Polymerketten scheinen eine etwas höhere Stabilität zu besitzen, so dass im Mittel längere Ketten auf Kosten von kürzeren wachsen. Ein weiterer Hinweis auf diesen Mechanismus ist, dass der Restgehalt an nicht umgesetztem Lactid am Ende der Reaktion in allen vier Proben unverändert niedrig ist.



**Abbildung 11 Einfluss unterschiedlicher Syntheseparameter auf die Molmassen der Polymere**

Zahlenmittlere und gewichtsmittlere Molmasse bei unterschiedlicher Dauer und Temperatur der Synthese



**Abbildung 12 Einfluss unterschiedlicher Syntheseparameter auf die Polydispersität**

### I.3.1.3 Einfluss des Glycolids bei der Copolymerisation

Um den Einfluss von copolymerisiertem Glycolid auf die Molmasse zu untersuchen, wurde bei den in Tabelle 8 aufgeführten Polymeren die Molmasse mittels GPC bestimmt. Diese Polymere unterscheiden sich ausschließlich durch ihren Glycolidgehalt, der 0%, 25%, 50% und 75% beträgt.

Im Gegensatz zum Glycerin scheint das Glycolid nur in einem sehr geringen Umfang einen Einfluss auf die Molmasse zu haben. Als Trend zeichnet sich jedoch ab, dass mit steigendem Milchsäuregehalt die Molmasse ebenfalls zunimmt. Dies ist mit großer Wahrscheinlichkeit im höheren Molekulargewicht der Milchsäure - im Vergleich zur Glycolsäure - begründet.

**Tabelle 8** Übersicht Einfluss des Glycolidgehaltes auf die Molmasse

Polymer	Mn	Mw
GOL-DL-1:18	3130	4630
GOLG-DL-1:13,5:4,5	3070	4490
GOLG-DL-1:9:9	2970	4400
GOLG-DL-1:4,5:13,5	2600	3740

## I.3.2 Eigenschaften der Polymerstäbchen

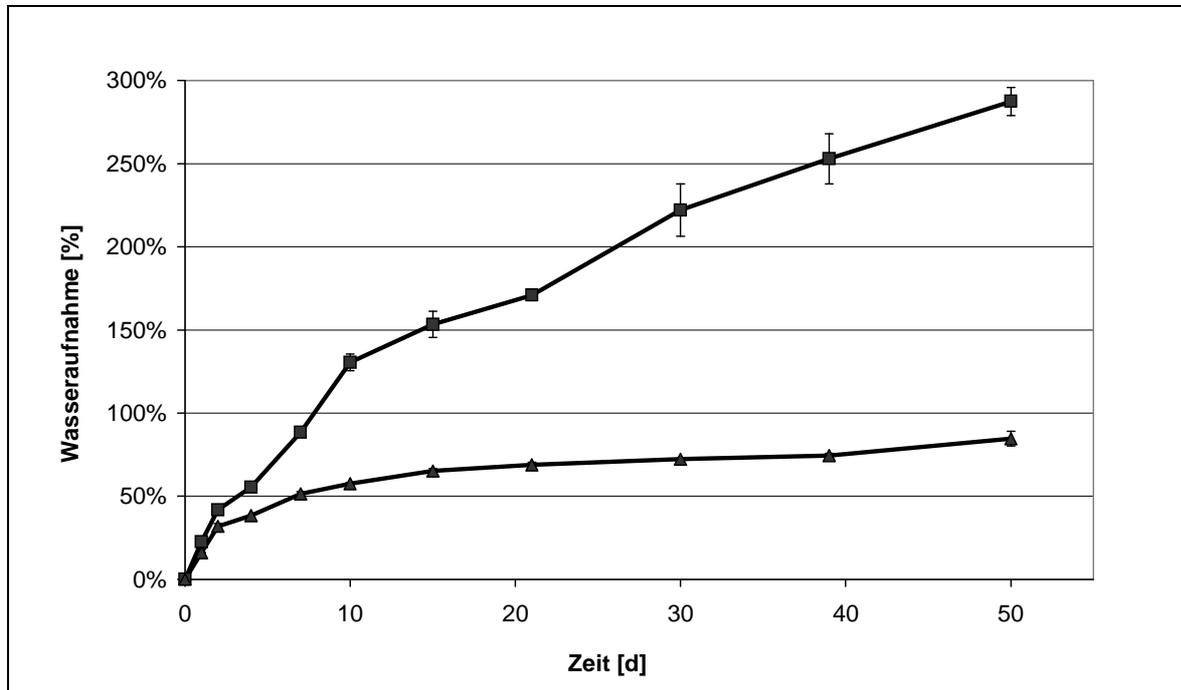
### I.3.2.1 Wasseraufnahme

Für den Abbau biodegradierbarer Polymere ist die initiale Wasseraufnahme von großer Bedeutung, denn erst durch die Anwesenheit von Wasser kann die hydrolytische Esterspaltung und damit der Polymerabbau in Gang kommen.

Die Geschwindigkeit der Wasseraufnahme hängt von verschiedenen Faktoren ab. Die Geometrie des Prüfkörpers hat sicherlich einen sehr bedeutenden Einfluss, da die initiale Wasseraufnahme über die Oberfläche erfolgt und somit dem Volumen / Oberflächenverhältnis eine große Bedeutung zukommt. Eine dünne Folie zeigt erwartungsgemäß eine schnellere Wasseraufnahme als dies von einem massiven Block zu erwarten ist. Aus diesem Grund wurden für alle Untersuchungen Prüfkörper mit einer einheitlichen Geometrie verwendet, um materialspezifische Unterschiede erkennen zu können.

### I.3.2.1.1 Einfluss der Stereoisomerie der Milchsäure

Welchen Einfluss die Stereoisomerie der Milchsäure auf die Wasseraufnahme besitzt, ist in Abbildung 13 dargestellt.



**Abbildung 13 Wasseraufnahme von Polymerstäbchen unterschiedlicher Stereoisomerie**

▲: GOL-L-1:18

■: GOL-DL-1:18

Die Verwendung von racemischem Lactid bei der Synthese führt zu einem Polymer, das keine kristallinen Bereiche aufweist, wie dies bei reinen L- oder D-Lactiden der Fall ist. Dies ist die Ursache für den deutlichen Unterschied bei der Wasseraufnahme zwischen den ansonsten identischen Polymeren. In den amorphen Regionen kommt es rasch zur Quellung des Polymers, teilkristalline Bereiche bleiben zunächst weitestgehend davon verschont.

So wird der durch die Theorie vorhergesagte Effekt bestätigt. Das DL-Polymer nimmt etwa dreimal soviel Wasser auf wie das reine L-Polymer. Dies hat selbstverständlich auch Auswirkungen auf die Degradationszeit der Polymere, wie später noch erläutert werden wird.

### I.3.2.1.2 Einfluss des Lactid- / Glycolidgehaltes

So wie die Verwendung von DL-Lactid zu einem amorphen und dadurch hydrophileren Polymer führt, könnte die Copolymerisation mit Glycolid einen Einfluss auf das Quellungsverhalten der daraus erhaltenen Polymere haben. Die Frage ist also, ob sich die höhere Hydrophilie der Glycolsäure gegenüber der Milchsäure auch auf die Eigenschaften der aus ihnen hergestellten Polymere überträgt.

Ein direkter Nachweis dessen war im Fall dieser Polymere nur schwer möglich, da die Prüfkörper durch die Wasseraufnahme und den fortschreitenden Abbau nicht mehr formstabil waren und so eine Wägung nicht mehr exakt durchzuführen war. Indirekt konnte der Effekt aber bei der Untersuchung der entstehenden Degradationsprodukte nachgewiesen werden.

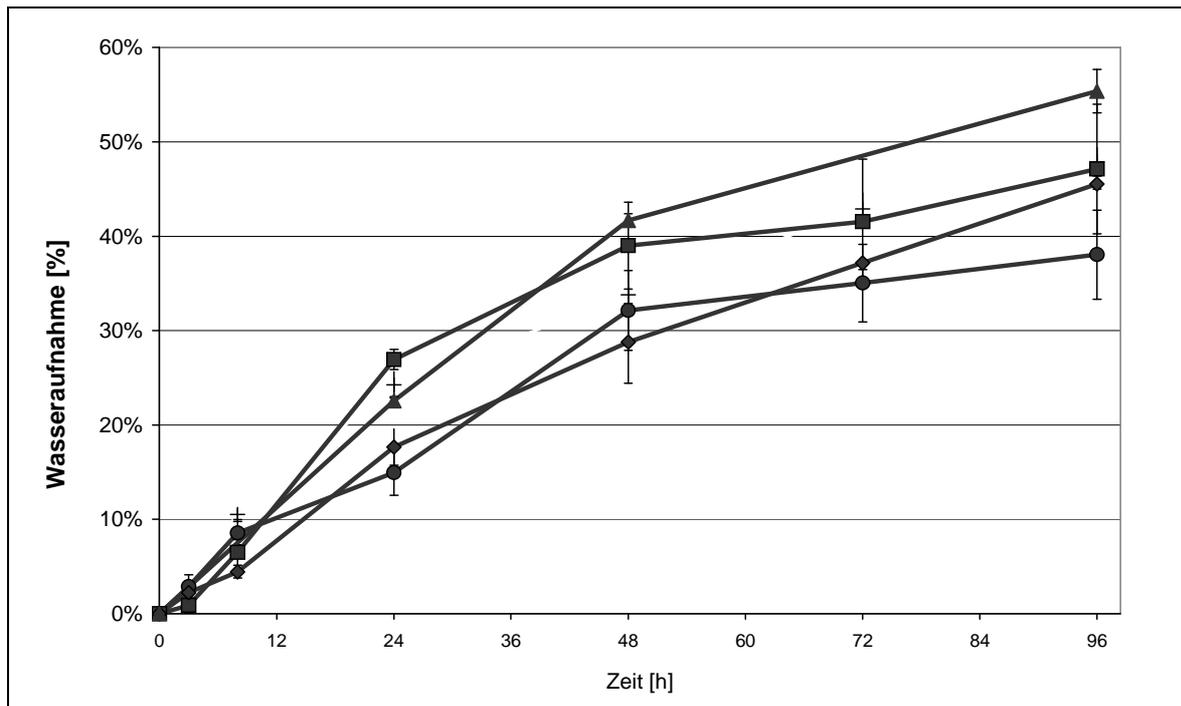
Die Untersuchung der Wasseraufnahme beschränkte sich in diesem Fall auf die ersten vier Tage nach Einlegen in das Testmedium. Tabelle 9 zeigt die verwendeten Polymere. Sie unterscheiden sich jeweils um 25% in ihrem Anteil an Glycolid.

**Tabelle 9      Übersicht über Polymere mit unterschiedlichem Glycolidgehalt**

Polymer	Anteil Glycolid
GOL-DL-1:18	0 %
GOLG-DL-1:13,5:4,5	25 %
GOLG-DL-1:9:9	50 %
GOLG-DL-1:4,5:13,5	75 %

Wie in Abbildung 14 zu sehen ist, konnte in den ersten vier Tagen kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Polymeren festgestellt werden. Überraschend ist die hohe Wasseraufnahme bei GOL-DL-1:18. Eigentlich wäre hier im Vergleich zu den anderen Polymeren eine weniger schnelle Quellung zu erwarten. Hier kommt ein überlagernder Effekt zum Tragen. Die beginnende Degradation führt zu einem Masseverlust an den Prüfkörpern. Das bedeutet, dass bei Polymeren mit einer schnellen Degradationszeit eine geringere Wasseraufnahmefähigkeit vorgetäuscht wird. Außerdem werden wasserlösliche Oligo- und Monomere herausgelöst und werden somit bei der Wägung nicht mehr erfasst.

Im Vorgriff auf Kapitel I.3.2.2.2 sei schon an dieser Stelle ein Blick auf die Polymermasseabnahme dieser Polymere im Vergleich erlaubt. Es fällt ein deutlicher Unterschied zwischen dem reinen GOL-DL-1:18 und den anderen glycolidhaltigen Polymeren auf (Abbildung 17). Wie oben bereits erwähnt führt dieser Masseverlust zu nicht mehr vergleichbaren Werten.



**Abbildung 14 Wasseraufnahme von Polymeren mit unterschiedlichem Glycolid-Anteil**

▲ : GOL-DL-1:18  
 ● : GOLG-DL-1:9:9  
 ■ : GOLG-DL-1:13,5:4,5  
 ◆ : GOLG-DL-1:4,5:13,5

### I.3.2.2 Polymermassenabnahme

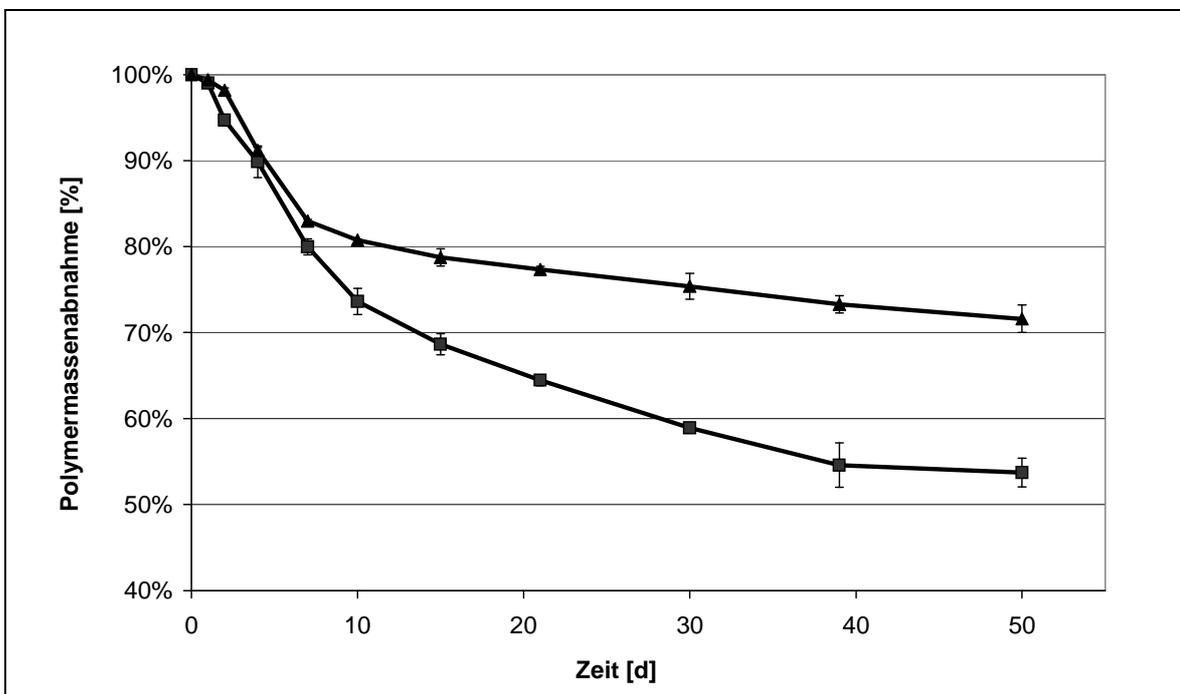
Wie das Quellungsverhalten ist auch die Polymermassenabnahme ein Parameter, um bioabbaubare Polymere zu charakterisieren. Dieser Masseverlust wird gravimetrisch bestimmt und muss von der eigentlichen Degradation unterschieden werden. Ist mit Degradation die hydrolytische Spaltung des Polymers in Monomere gemeint, umfasst der Begriff der Polymermassenabnahme mehr. Unter ihm werden alle Prozesse zusammengefasst, bei denen Substanz den Prüfkörper verlässt. So werden hierbei auch teilweise hydrolysierte, wasserlösliche Oligomere und Restmengen an nicht umgesetzten Ausgangssubstanzen wie Lactid, Glycolid oder Glycerin erfasst. Diese werden durch das wässrige Testmedium gelöst, diffundieren an die Oberfläche des Prüfkörpers und gelangen so in das Testmedium.

#### I.3.2.2.1 Einfluss der Stereoisomerie der Milchsäure

Ein deutlicher Unterschied in der Polymermassenabnahme zwischen Polymeren, bei denen das reine L-Lactid durch racemisches DL-Lactid ersetzt wurde, konnte schon beim Quellungsverhalten belegt werden. Eine beschleunigte Quellung, wie sie von den DL-Polymeren zu erwarten war, sollte zu einer verschnellerten

Polymersmassenabnahme führen. Dies konnte bei den Untersuchungen gezeigt werden.

Wie in Abbildung 15 sichtbar hat das DL-Polymer nach 50 Tagen annähernd doppelt so viel Masse eingebüßt wie sein L-Partner. Nach anfänglich ähnlichem Verlauf zeigt sich nach 8 Tagen ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Polymeren. Der Hauptgrund für diesen Unterschied ist im Quellungsverhalten zu suchen. Wie bereits erwähnt ist für die Degradation die initiale Wasseraufnahme von großer Bedeutung. Es steht dem DL-Polymer folglich mehr Wasser für Lösungsvorgänge, Hydrolyse und Diffusion von Hydrolyseprodukten an die Oberfläche zur Verfügung. Die kristallinen Bereiche im L-Polymer sind lange Zeit vor eindiffundierendem Wasser abgeschirmt.



**Abbildung 15 Einfluss der Stereoisomerie auf die Polymersmassenabnahme**

▲ : GOL-L-1:18

■ : GOL-DL-1:18

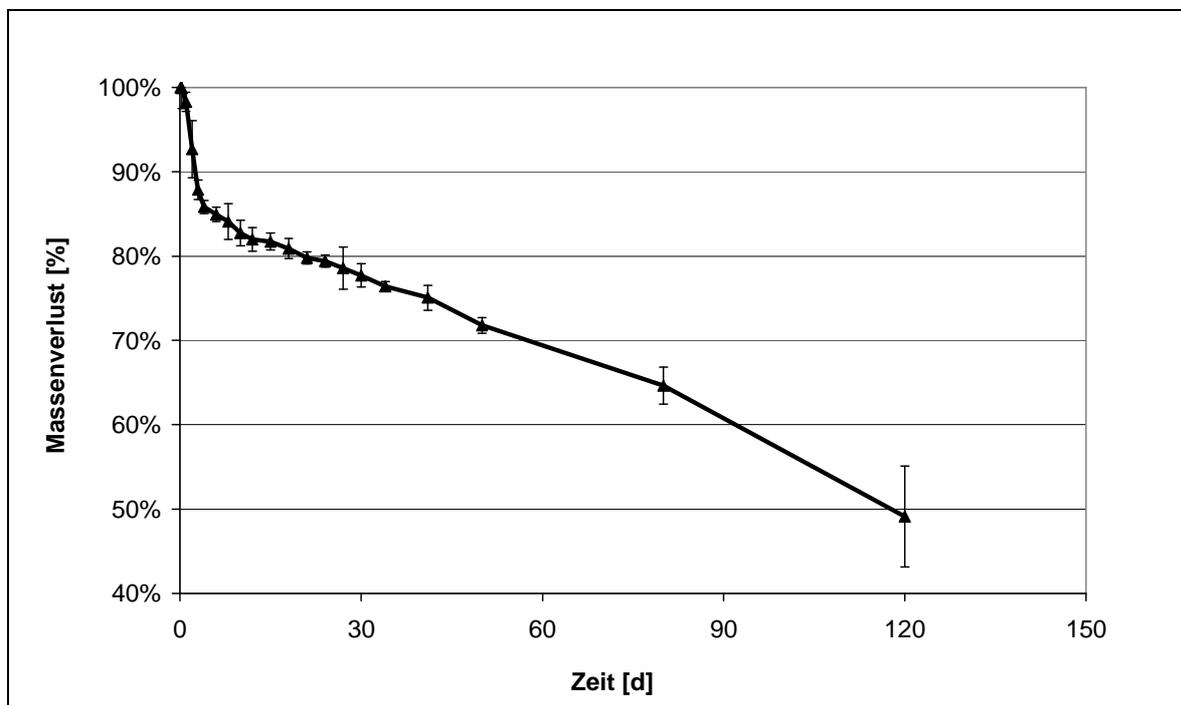
So konnte in einem weiteren Versuch bei GOL-L-1:18 erst nach einem Zeitraum von 180 Tagen eine Halbierung der Polymermasse beobachtet werden (Abbildung 16). Die Formstabilität des Prüfkörpers blieb noch bis zu einem Polymermasseverlust von 60% erhalten. Dies war nach etwa 120 Tagen erreicht, es konnte nur noch ein Prüfkörper gewogen werden.

Was in diesem Versuch auch gezeigt werden konnte, ist die Tatsache, dass der Abbau über den gesamten Stäbchenquerschnitt homogen abläuft, nachdem die Quellungsphase abgeschlossen ist. Dies ist der Fall, wenn das Untersuchungsmedium bis in den Kern des Prüfkörpers vorgedrungen ist. Mit diesem Befund

unterscheiden sich die hier untersuchten Polymere von den glycerinfreien Poly-Lactiden.

Wie in der Einleitung erwähnt, können höherpolymere Lactid-Polymere zu einem heterogenen Abbauverhalten neigen, was sich in einem deutlichen Unterschied zwischen Hülle und Kern des Prüfkörpers zeigt. Solche Prüfkörper erleiden nach einer bestimmten Zeit einen sogenannten ‚burst‘. Dabei sprengt das im Inneren in Gelform vorliegende degradierte Material die Hülle und es kommt zu einem sprunghaften Gewichtsverlust des Prüfkörpers. Zu diesem Degradationsverhalten kommt es aufgrund der mangelnden Diffusion degradiertes Monomere aus dem Formkörper heraus. Milch- und Glycolsäure sammeln sich im Inneren des Polymers an und beschleunigen durch die Herabsetzung des pH-Wertes den Abbau des noch vorhandenen Polymers. So ein Verlauf war bei keinem der hier untersuchten Polymere beobachtet worden.

Um diese Vermutung zu bestätigen wurden einige Stäbchen mit einem Skalpell in der Mitte durchgeschnitten. Es waren keine Bereiche auszumachen, die sich in der oben beschriebenen Weise unterschieden. Diese Beobachtung zeigt, dass die Außenhülle dieser Stäbchen eine ausreichende Durchlässigkeit für Degradationsprodukte besitzt.



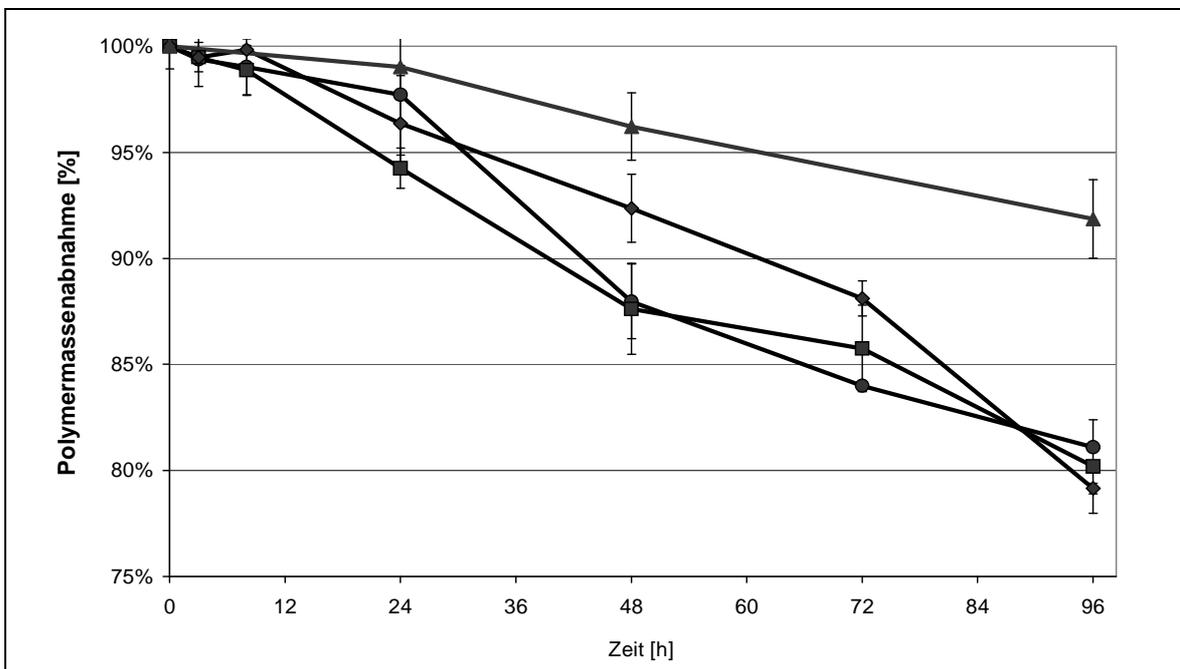
**Abbildung 16** Polymermassenabnahme bei GOL-L-1:18 über einen Zeitraum von 270 Tagen

### I.3.2.2.2 Einfluss des Lactid- / Glycolidgehaltes

Beim Quellungsverhalten konnte ein Einfluss des Glycolides als Co-Polymerisationspartner (Kapitel I.3.2.1.2) nicht belegt werden. Der parallel zur Quellung einsetzende Polymermasseverlust nivellierte den zu erwartenden Effekt.

Abbildung 17 zeigt nun den Polymermasseverlust bei den Polymeren mit unterschiedlichen Glycolid-Gehalten innerhalb der ersten vier Tage. Zwischen den einzelnen Polymeren, die Glycolsäure enthalten, ist kein signifikanter Unterschied in diesem Zeitfenster zu beobachten. Eine Beobachtung über einen längeren Zeitraum war, wie oben schon erwähnt, aus Gründen der mangelnden Formstabilität der Prüfkörper und der damit verbundenen mangelnden Genauigkeit bei der Wägung leider nicht möglich.

Vergleicht man jedoch die glycolidfreien mit den glycolidhaltigen Polymeren fällt ein Unterschied auf. Während letztere einen Masseverlust von etwa 20% erlitten haben, hat GOL-DL-1:18 erst knapp 10% seiner Masse eingebüßt. Eine Erklärung hierfür ist die höhere Hydrophilie der Glycolsäure, die dem gesamten Polymer in Bezug auf eine schnellere Quellung und Degradation günstigere Eigenschaften verleiht.



**Abbildung 17 Polymermassenabnahme von Polymeren mit unterschiedlichem Glycolid-Anteil**

▲ : GOL-DL-1:18  
● : GOLG-DL-1:9:9

■ : GOLG-DL-1:13,5:4,5  
◆ : GOLG-DL-1:4,5:13,5

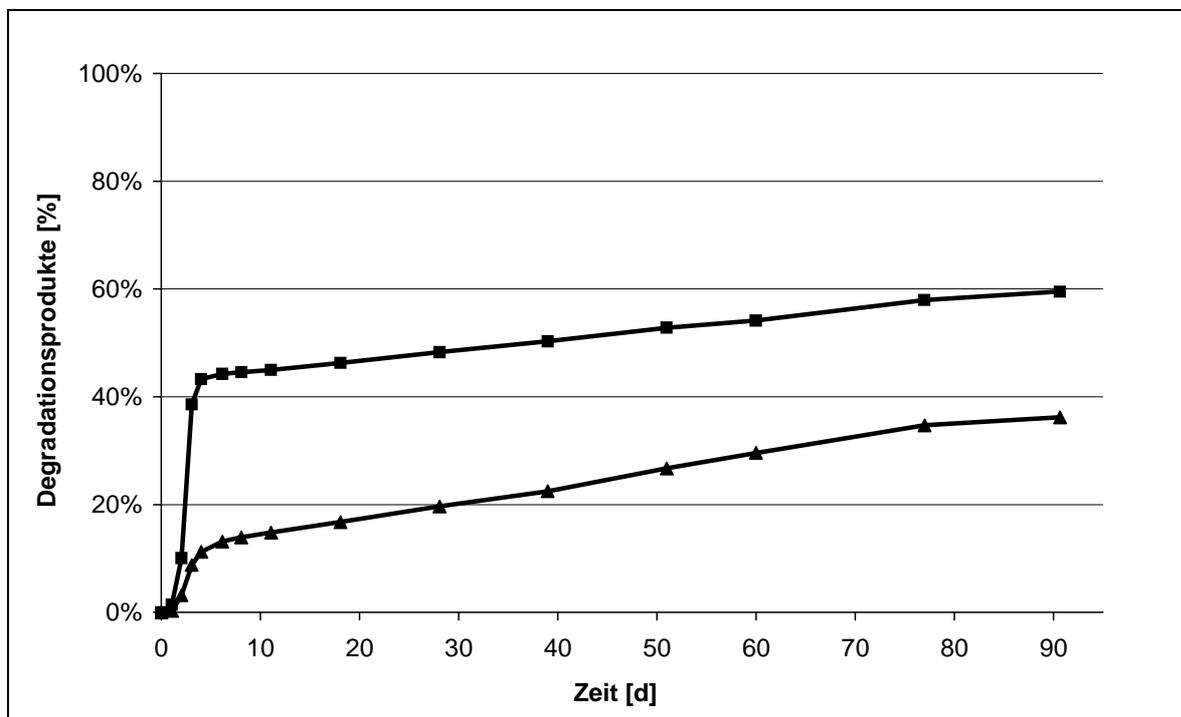
### I.3.2.3 Degradation

Während die Polymermassenabnahme für die Bestimmung des Abbauverhaltens von biodegradierbaren Polymeren eine indirekte Methode darstellt, kann mit der Bestimmung der Abbauprodukte direkt die Hydrolyse verfolgt werden. Es ist auch möglich zu unterscheiden, ob eines der beiden verwendeten Monomere zu einem bestimmten Zeitpunkt der Hydrolyse schneller als das andere abgebaut wird.

#### I.3.2.3.1 Einfluss der Stereoisomerie der Milchsäure

Der Verlauf der Degradation sollte dem der Polymermassenabnahme recht ähnlich sein. Ein deutlicher Unterschied beider Verläufe könnte sich aus dem Herausdiffundieren von wasserlöslichen Oligomeren ergeben. Da aber vor der Bestimmung von Milch- bzw. Glycolsäure im Medium der Prüflösung 3-N-KOH zugesetzt wird, werden bei der HPLC-Analytik auch diese löslichen Oligomere erfasst.

Weitere Unterschiede könnten durch bei der Synthese nicht umgesetzte Anhydride zustande kommen. Da diese jedoch im Wasser rasch zu den Säuren hydrolysieren, werden auch diese durch die HPLC-Analytik erfasst. Das Glycerin spielt mengenmäßig eine untergeordnete Rolle.



**Abbildung 18 Einfluss der Stereoisomerie auf die Degradation; Zeitraum 90 Tage**

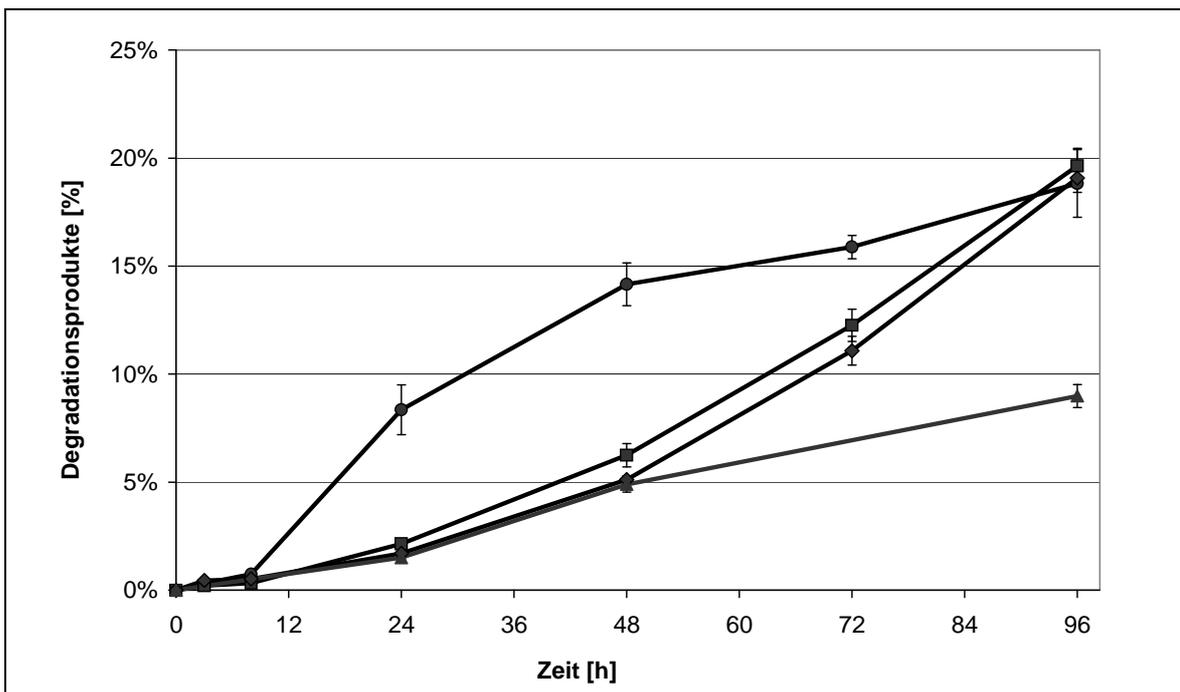
▲: GOL-L-1:18

■: GOLG-DL-1:18

Wie in Abbildung 18 zu sehen ist, unterscheiden sich die beiden Polymere vor allem in den ersten 8 Tagen des Beobachtungszeitraumes. Hier zeigt das DL-Polymer eine deutlich höhere Abgabe von Milchsäure ins Medium. Ob es sich hierbei jedoch tatsächlich um bis zum Monomer degradierte Milchsäure handelt, ist fraglich. Wahrscheinlicher ist, dass durch die höhere initiale Quellung lösliche Oligomere aus dem Inneren des Prüfkörpers nach Außen diffundieren. Nach dieser anfänglich hohen Monomerabgabe verlaufen die beiden Degradationskurven annähernd parallel.

### I.3.2.3.2 Einfluss des Lactid- und Glycolidgehaltes

In Abbildung 19 ist der Konzentrationsverlauf der Degradationsprodukte Milch- und Glycolsäure im Untersuchungsmedium dargestellt. Da die Polymere unterschiedliche Lactid und Glycolid-Gehalte haben, wurde die prozentuale Darstellung gewählt. Das heißt, die Menge des freigesetzten Monomers wurde auf den theoretischen Gesamtgehalt an Milchsäure bezogen. Der Übersichtlichkeit halber ist nur die Milchsäure dargestellt, die Konzentrationsverläufe der Glycolsäure waren in dieser prozentualen Darstellung quasi identisch.



**Abbildung 19 Milchsäure im Testmedium bei Polymeren mit unterschiedlichem Glycolid-Anteil; Zeitraum 4 Tage**

▲ : GOL-DL-1:18

■ : GOLG-DL-1:13,5:4,5

● : GOLG-DL-1:9:9

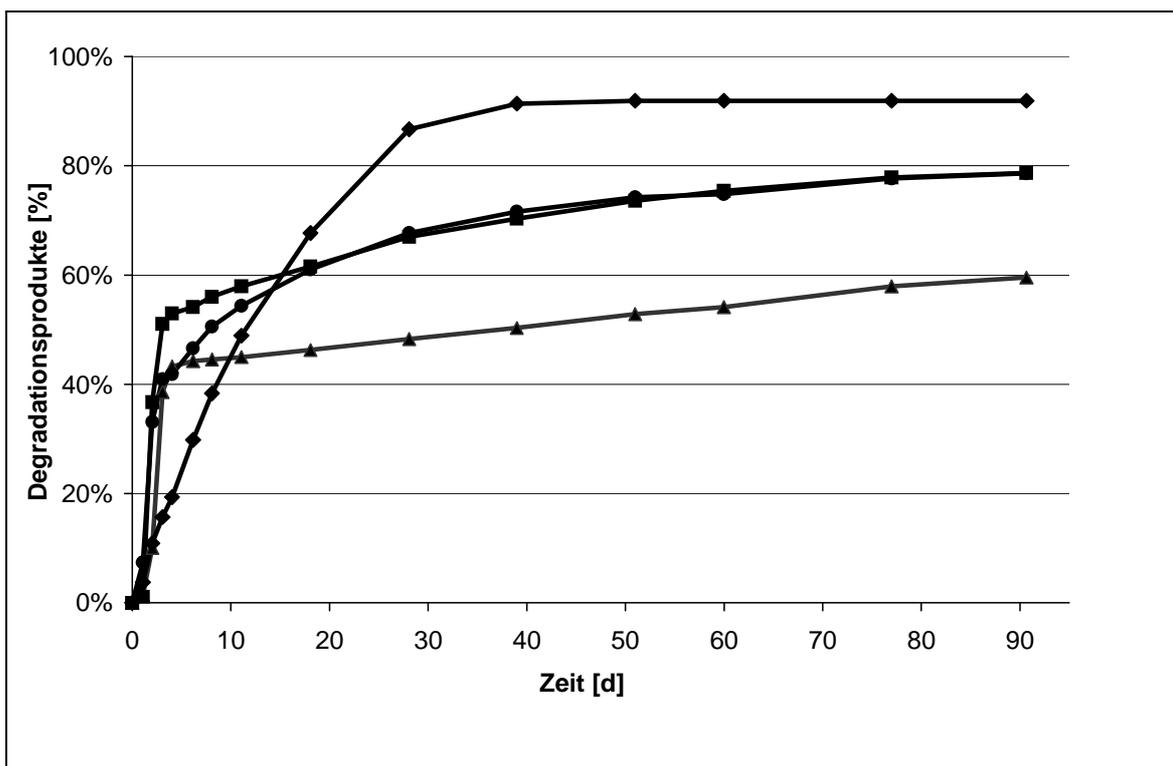
◆ : GOLG-DL-1:4,5:13,5

Die glycolidhaltigen Polymere haben nach 4 Tagen etwa so viel an Monomeren verloren, wie es 20% des theoretisch berechneten Gehaltes an Milchsäure und

Glycolsäure entspricht. Bei dem glycolidfreien Polymer wurden im Testmedium knapp 10% der zu erwartenden Menge an Milchsäure gefunden. Vergleicht man dieses Degradationsmuster mit der Polymermassenabnahme der untersuchten Polymere, sieht man, dass beide Untersuchungsmethoden – nämlich der Polymermasseverlust einerseits und der Anstieg der Monomerenkonzentration im Medium andererseits – zu einem beinahe identischen Muster führen. Während bei der Polymermassenabnahme kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen glycolidhaltigen Polymeren sichtbar ist, deutet sich innerhalb der ersten 4 Tage bei der Degradation ein Unterschied an. Das Polymer GOLG-DL-1:9:9 zeigt ab den ersten 8 Stunden eine schnellere Freisetzung der Degradationsprodukte aus dem Polymer, kommt aber am 4. Tag wieder auf das Niveau der anderen glycolidhaltigen Polymere.

Betrachtet man hingegen die Abgabe von Degradationsprodukten über einen deutlich längeren Zeitraum, nämlich über 90 Tage, zeigt sich ein anderes Bild. Abbildung 20 zeigt diesen Verlauf. Es fällt auf, dass es nun, bedingt durch den unterschiedlichen Gehalt an Glycolid, deutliche Unterschiede im Abbauverhalten der Polymere gibt.

In den ersten beiden Tagen der Untersuchung unterscheiden sich GOL-DL-1:18, GOL-DL-1:9:9 und GOL-DL-1:13,5:4,5 kaum. Nach dem 8. Tag flacht die Degradationskurve von GOL-DL-1:18 deutlich ab. GOL-DL-1:9:9 und GOL-DL-1:13,5:4,5 erreichen nach 90 Tagen eine Degradation von annähernd 80%, wohingegen GOL-DL-1:18 nur etwa zu 60% degradiert. Im Unterschied zu den letztgenannten Polymeren zeigt GOL-DL-1:4,5:13,5 ein deutlich langsames, aber dafür quasi vollständiges Degradationsverhalten.



**Abbildung 20** Degradationsprodukte im Testmedium bei Polymeren mit unterschiedlichem Glycolid-Anteil; Zeitraum 90 Tage

▲ : GOL-DL-1:18

■ : GOLG-DL-1:13,5:4,5

● : GOLG-DL-1:9:9

◆ : GOLG-DL-1:4,5:13,5

Ein Erklärungsansatz wäre die Tatsache, dass bei einem Lactid / Glycolid-Verhältnis von 25:75 das hydrophilste Polymer in dieser Reihe entsteht, und somit die Quellung und die Degradation am weitreichendsten vonstatten gehen. Dies steht in Übereinstimmung mit einigen anderen Quellen aus der Literatur [96, 97], bei denen das Abbauverhalten von reinen Polylactiden/Co-Glycoliden in Abhängigkeit vom Glycolidgehalt untersucht wurde. Durch die Veresterung der freien Carboxylgruppe mit Glycerin herrschen jedoch etwas andere Verhältnisse als bei reinen Polylactiden/Co-Glycoliden.

### I.3.2.3.3 Einfluss des Untersuchungsmediums

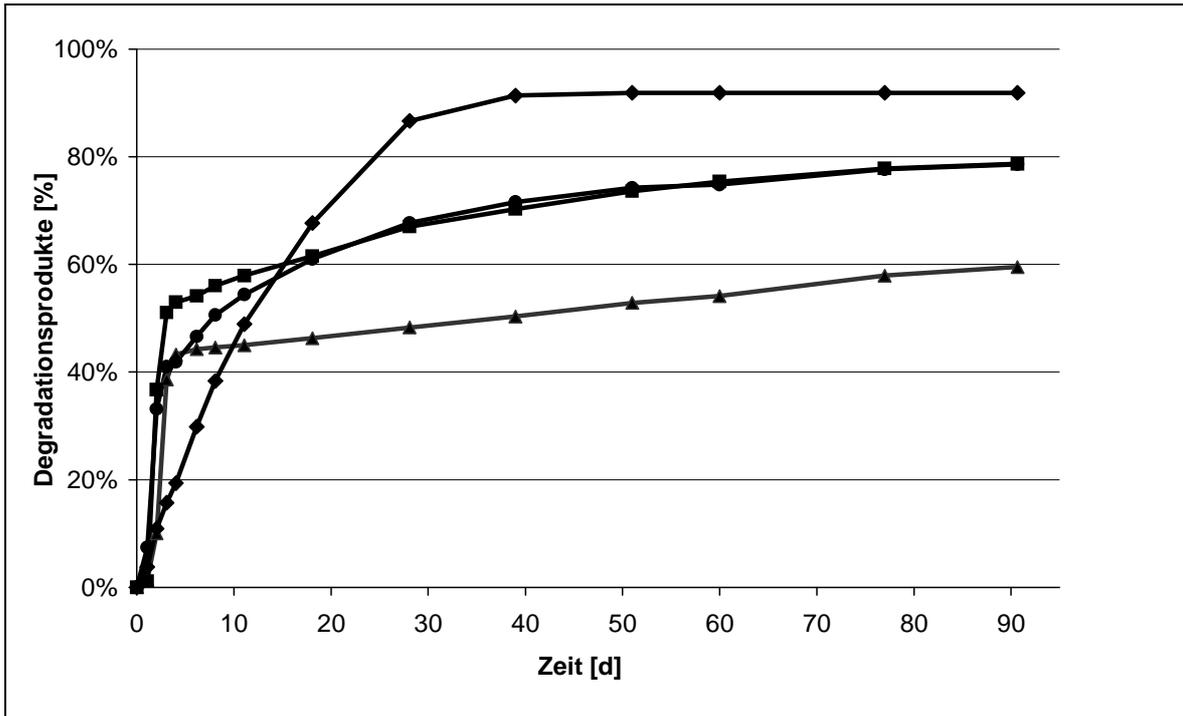
Da sowohl Säuren als auch Basen die hydrolytische Spaltung von Esterbindungen katalysieren, ist anzunehmen, dass der pH-Wert des Untersuchungsmediums einen Einfluss auf die Degradation hat. Es wurden deshalb an vier verschiedenen Polymeren das Degradationsverhalten in Puffer pH 7,4 (Abbildung 21) und destilliertem Wasser (Abbildung 22) untersucht.

Zwei Phänomene lassen sich nachweisen:

1. Die Polymere, die in Puffer eingelegt waren, zeigen zu Beginn der Untersuchung einen starken Anstieg von Milchsäure im Medium. Nach diesem initialen Peak geht der Milchsäure-Verlauf in einen Bereich mit geringerer, aber gleichmäßiger Abgabe über. In bidestilliertem Wasser fehlt der initiale Peak völlig. Die Milchsäure-Abgabe ins Medium geht insgesamt schneller vonstatten.
2. Das Ausmaß der Degradation unterscheidet sich bei den beiden Untersuchungsmedien deutlich. Während bei den Polymeren, die in Puffer gelagert waren, die Degradation nach 90 Tagen im Bereich von 60% - 90% variiert, sind sämtliche in Wasser gelagerten Polymere nach dem Untersuchungszeitraum zu mindestens 88% degradiert.

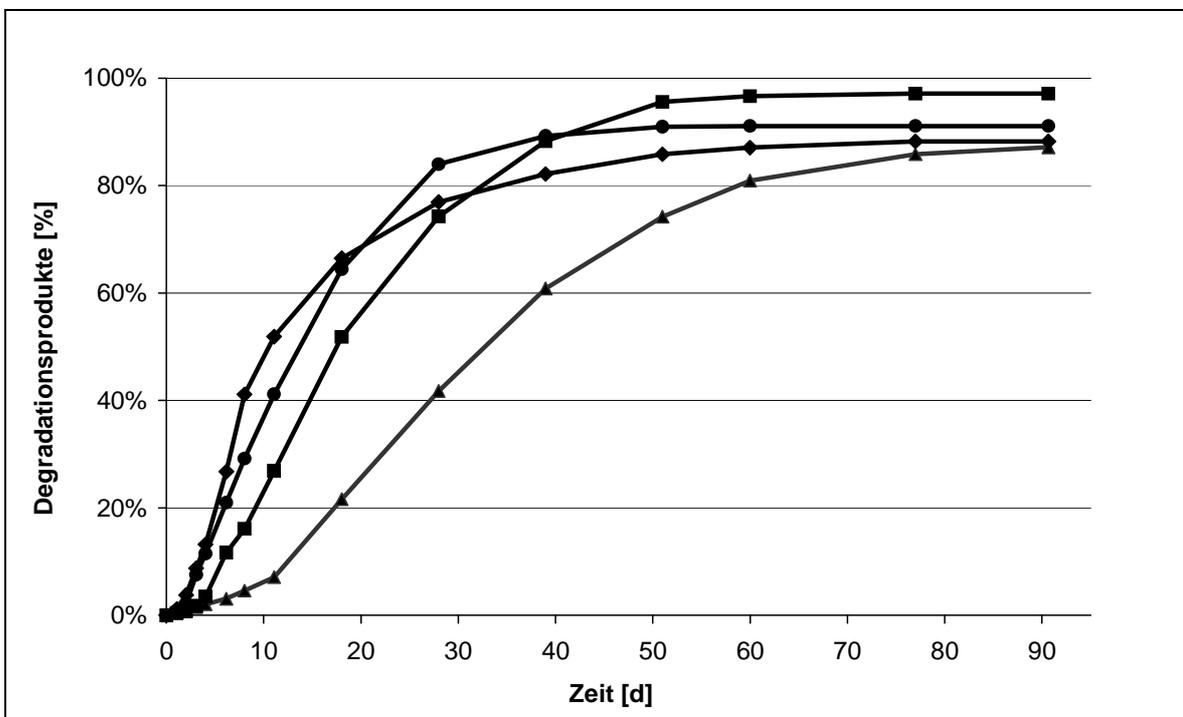
Dieses Verhalten hat wahrscheinlich seine Ursache in der Wasserlöslichkeit der in den Polymeren enthaltenen Oligomere. Folgender Ablauf bei Quellung und Degradation des Polymers wäre vorstellbar: Wasser dringt von der Oberfläche her in die Prüfkörper ein. Die endständigen Carboxylgruppen des Polymers dissoziieren, was ein Absinken des pH-Wertes zur Folge hat. Liegt der pH-Wert des Mediums im Bereich des pKs-Wert der kurzkettigen Oligomere, so können diese nicht mehr dissoziieren und sind deshalb deutlich hydrophober. Dies würde das Fehlen des schnellen Milchsäure-Anstiegs zu Beginn der Einlagerung gegenüber dem gepufferten Untersuchungsmedium erklären.

Das Absinken des pH-Wertes im Prüfkörper beschleunigt im Sinne einer Autokatalyse die Spaltung der Esterbindungen. Dies würde den deutlich höheren Grad der Degradation in Wasser gegenüber einer Puffer-Lösung erklären.



**Abbildung 21** Degradationsverhalten verschiedener Polymere in Puffer pH 7,4

▲ : GOL-DL-1:18  
 ● : GOL-DL-1:9:9  
 ■ : GOL-DL-1:13,5:4,5  
 ◆ : GOL-L-1:4,5:13,5



**Abbildung 22** Degradationsverhalten verschiedener Polymere in bidestilliertem Wasser

▲ : GOL-DL-1:18  
 ● : GOL-DL-1:9:9  
 ■ : GOL-DL-1:13,5:4,5  
 ◆ : GOL-L-1:4,5:13,5

#### **I.3.2.3.4 Einfluss inkorporierter Wirkstoffe**

Es ist bekannt, dass niedermolekulare Substanzen, die in Polymere eingearbeitet sind, deren Degradation beeinflussen können [98, 99, 100]. So werden Weichmacher wie Triacetin gezielt zur Steuerung der Abbauphase von Polymeren verwendet. Es war nun anzunehmen, dass nicht nur die speziell hierfür eingesetzten Hilfsstoffe das Degradationsprofil verändern, sondern die Wirkstoffe selbst ebenfalls einen Einfluss haben.

Die Untersuchung dieses Faktors wurde an vier verschiedenen Polymeren durchgeführt. Als Wirkstoffe kamen Gentamicin in Form des Sulfates und der Base und Methotrexat als Säure und Natrium-Salz zum Einsatz. Sämtliche Wirkstoffe wurden in einer Konzentration von 5% eingesetzt.

##### **Gentamicin**

Die Ergebnisse dieser Untersuchung überraschten, da die Inkorporation von hydrophilen Stoffen auf Grund einer schnellen Porenbildung eine höhere Degradationsgeschwindigkeit erwarten lassen sollte. Gefunden wurde jedoch, dass sich die Abbaugeschwindigkeiten mit und ohne Wirkstoff kaum unterscheiden.

Abbildung 23 zeigt das Degradationsprofil in Form der Milchsäurekonzentration im Medium bei GOL-DL-1:18 mit einer 5%igen Gentamicin-Sulfat-Beladung. Dieses Polymer weist im Vergleich zu den weiter unten in diesem Abschnitt verwendeten Polymeren das geringste Quellungsverhalten auf. Im Gegensatz zu dem unbeladenen Stäbchen ist die Milchsäurekonzentration im Medium zu Beginn sehr gering, steigt aber dafür kontinuierlich und in größerem Ausmaß an.

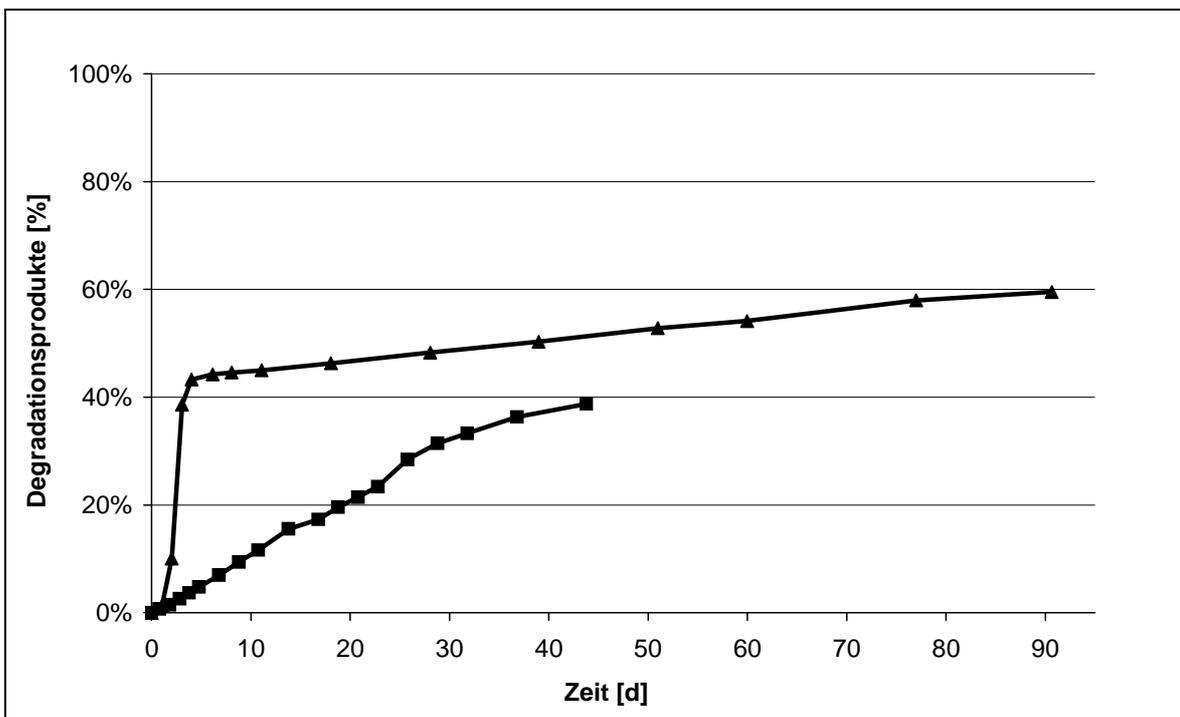
Im Prinzip zeigt das GOL-DL-1:13,5:4,5 (Abbildung 24) das selbe Bild. Die Milchsäurekonzentration im Medium des beladenen Stäbchens erreicht bis zum Ende des Untersuchungszeitraumes das gleiche Niveau wie das des unbeladenen.

Mit zunehmender Hydrophilie des Polymers nähert sich die Abbaukurve der beladenen Stäbchen der der unbeladenen an, wie bei GOL-DL-1:9:9 (Abbildung 25) zu sehen ist und bei GOL-DL-1:4,5:13,5, dem Polymer mit der höchsten Hydrophilie seinen Abschluss findet (Abbildung 26). Bei dieser Untersuchung war der Prüfkörper am 21. Tag derart zerfallen, dass ein Fortführen des Versuches nicht möglich war.

Abbildung 27 zeigt in der Zusammenfassung die Degradationskurve der mit Gentamicin-Sulfat beladenen Stäbchen. Man sieht hier noch einmal sehr deutlich, dass mit ansteigendem Glycolid-Anteil im Polymer die Degradations-

geschwindigkeit zunimmt. Vergleicht man diese Profile mit denen der unbeladenen Stäbchen in Abbildung 20, fällt vor allem die fehlende hohe Milchsäure-Freigabe zu Beginn auf.

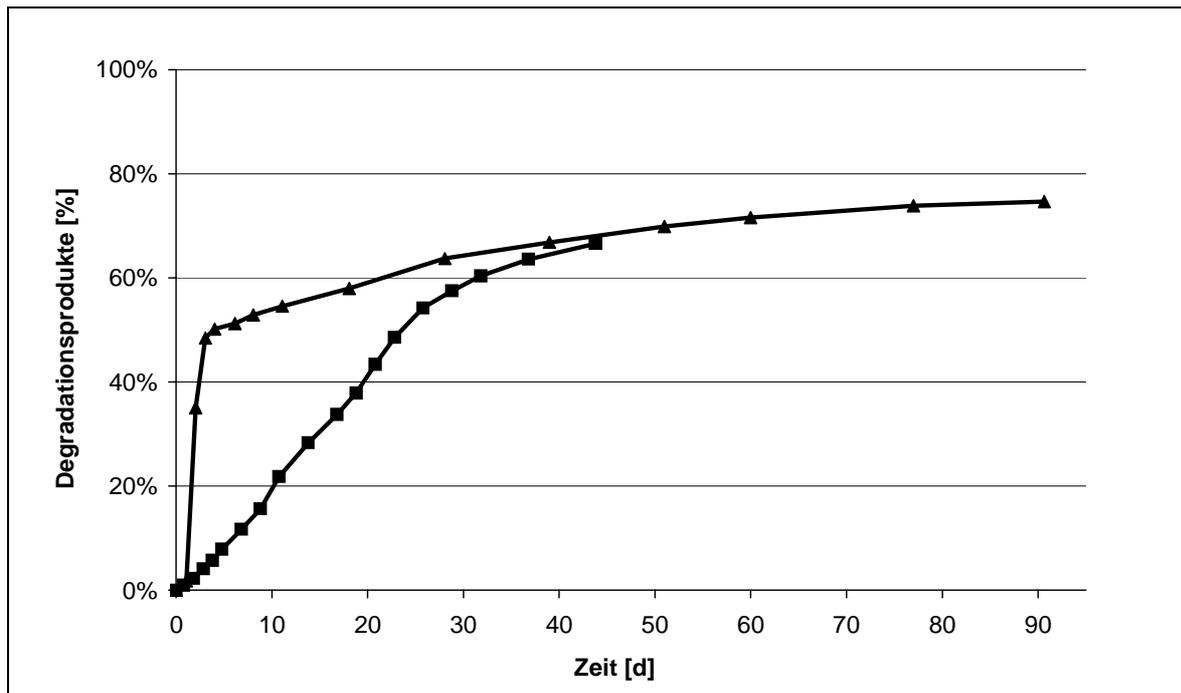
Es wurde nun an Stelle des Gentamicin-Sulfats die freie Base als Wirkstoff eingesetzt. Die Beladungsrate betrug ebenfalls 5%. Im direkten Vergleich des Degradationsprofils von mit Gentamicin-Base (Abbildung 28) bzw. Gentamicin-Sulfat (Abbildung 27) beladenen Stäbchen besteht qualitativ kein Unterschied. Bei beiden steigt sowohl das Ausmaß als auch die Geschwindigkeit der Degradation in der Reihenfolge GOL-DL-1:18 < GOL-DL-1:13,5:4,5 < GOL-DL-1:9:9 < GOL-L-1:4,5:13,5 an. Ein deutlicher Unterschied zwischen den Profilen besteht jedoch im Ausmaß der Degradation. Es liegt bei der Base bei allen Polymeren etwa 20% unter dem des Sulfats, unterstellt man bei der Kurve mit dem zerfallenen Prüfkörper in Abbildung 27 einen kontinuierlichen Fortgang.



**Abbildung 23 Milchsäure-Freisetzung aus GOL-DL-1:18 Stäbchen mit 5%iger Gentamicin-Sulfat-Beladung**

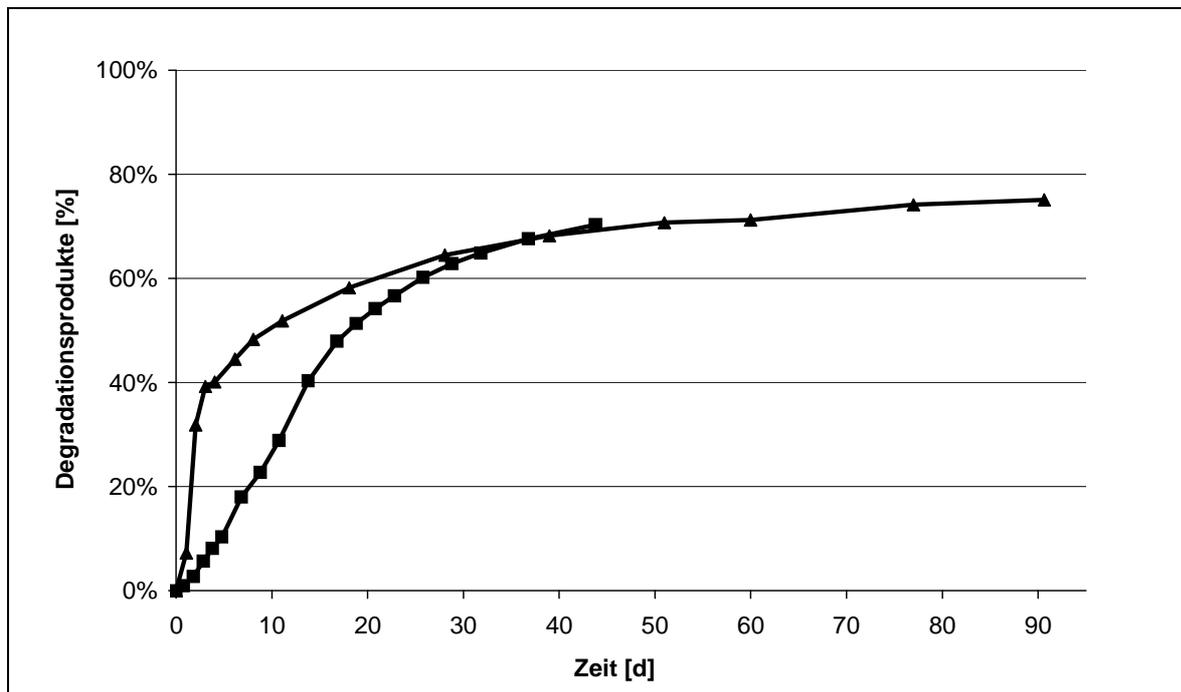
▲ : ohne Gentamicin

■ : mit Gentamicin



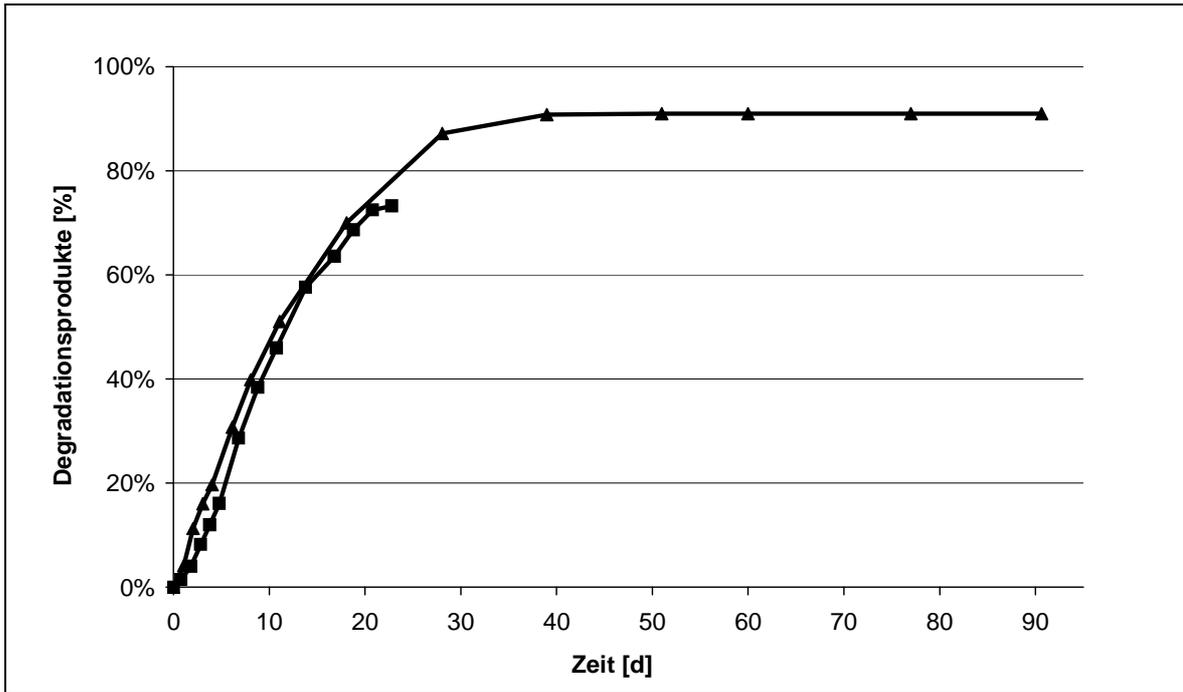
**Abbildung 24** Milchsäure-Freisetzung aus GOL-DL-1:13,5:4,5 Stäbchen mit 5%iger Gentamicin-Sulfat-Beladung

▲ : ohne Gentamicin      ■ : mit Gentamicin



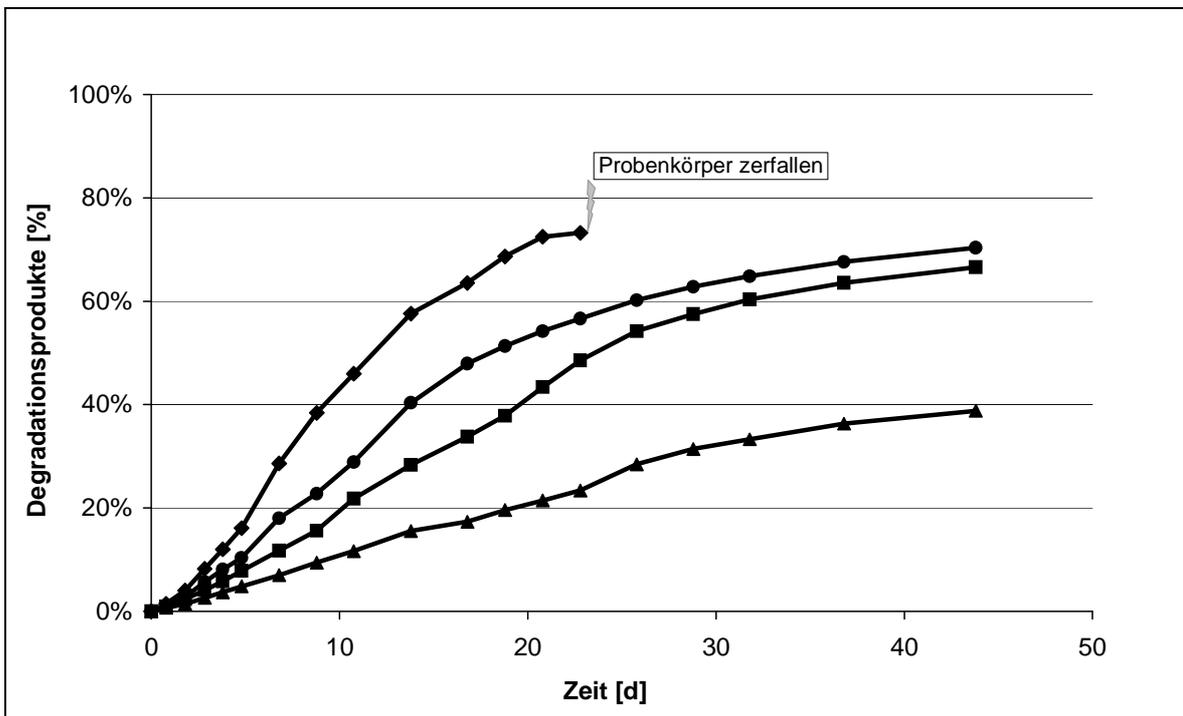
**Abbildung 25** Milchsäure-Freisetzung aus GOL-DL-1:9:9 Stäbchen mit 5%iger Gentamicin-Sulfat-Beladung

▲ : ohne Gentamicin      ■ : mit Gentamicin



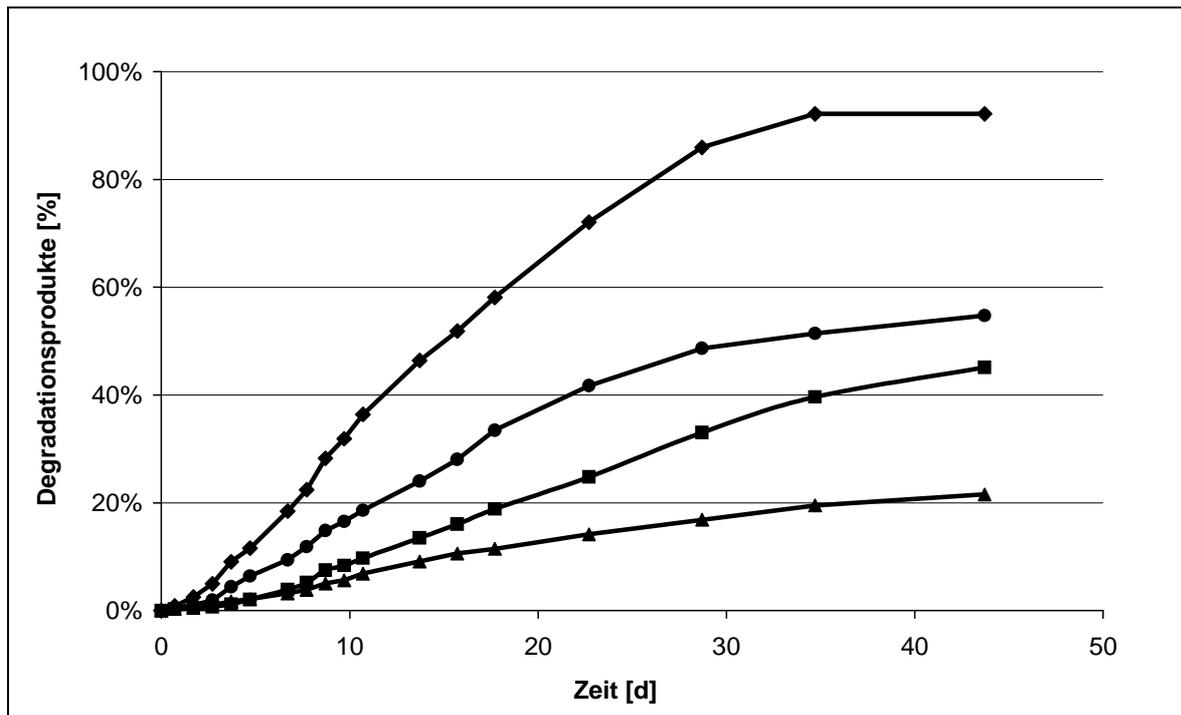
**Abbildung 26** Milchsäure-Freisetzung aus GOL-DL-1:4,5:13,5 Stäbchen mit 5%iger Gentamicin-Sulfat-Beladung

▲ : ohne Gentamicin                      ■ : mit Gentamicin



**Abbildung 27** Milchsäure-Freisetzung aus Stäbchen unterschiedlicher Polymere mit 5%iger Gentamicin-Sulfat-Beladung

▲ : GOL-DL-1:18                              ■ : GOL-DL-1:13,5:4,5  
 ● : GOL-DL-1:9:9                            ◆ : GOL-L-1:4,5:13,5



**Abbildung 28** Milchsäure-Freisetzung aus Stäbchen unterschiedlicher Polymere mit 5%iger Gentamicin-Base-Beladung

▲ : GOL-DL-1:18  
 ● : GOL-DL-1:9:9  
 ■ : GOL-DL-1:13,5:4,5  
 ◆ : GOL-L-1:4,5:13,5

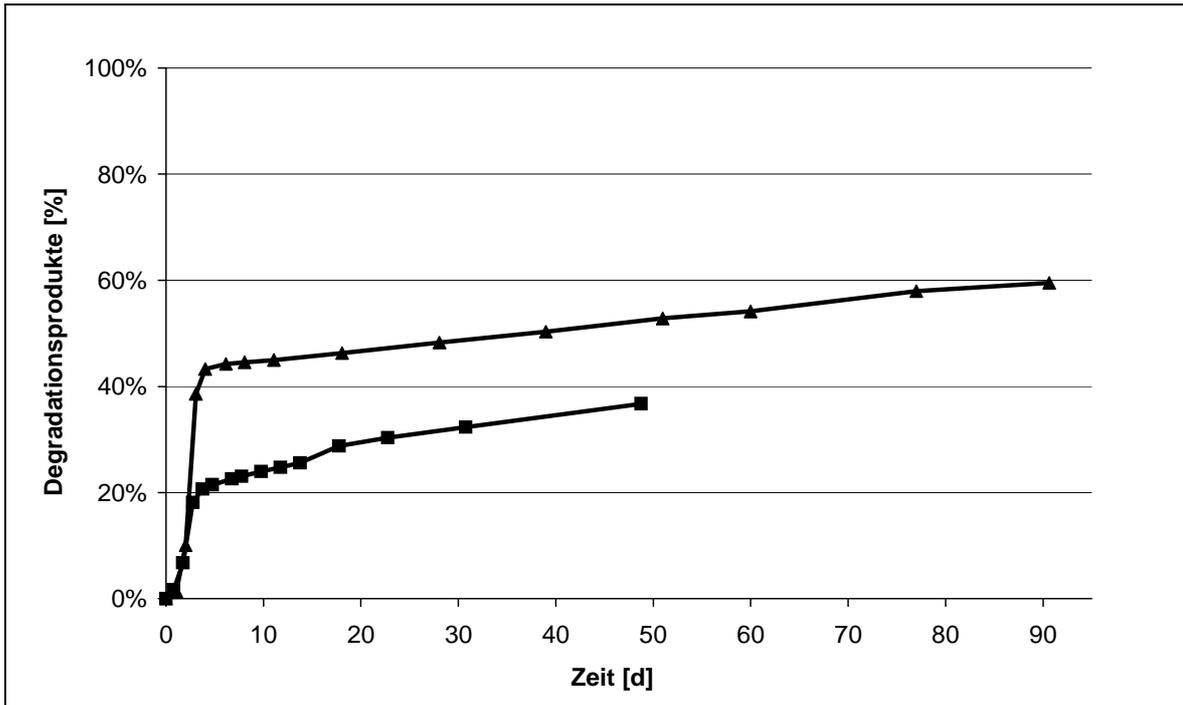
### Methotrexat

Es wurde ein weiterer Versuch durchgeführt, bei dem anstelle des Wirkstoffpaares Gentamicin-Sulfat / Gentamicin-Base Methotrexat-Säure/ Methotrexat-Natrium verwendet wurde. Ansonsten hatte der Versuch die gleichen Parameter.

Es wurden prinzipiell die gleichen Ergebnisse gefunden. Zwei Unterschiede scheinen jedoch erwähnenswert:

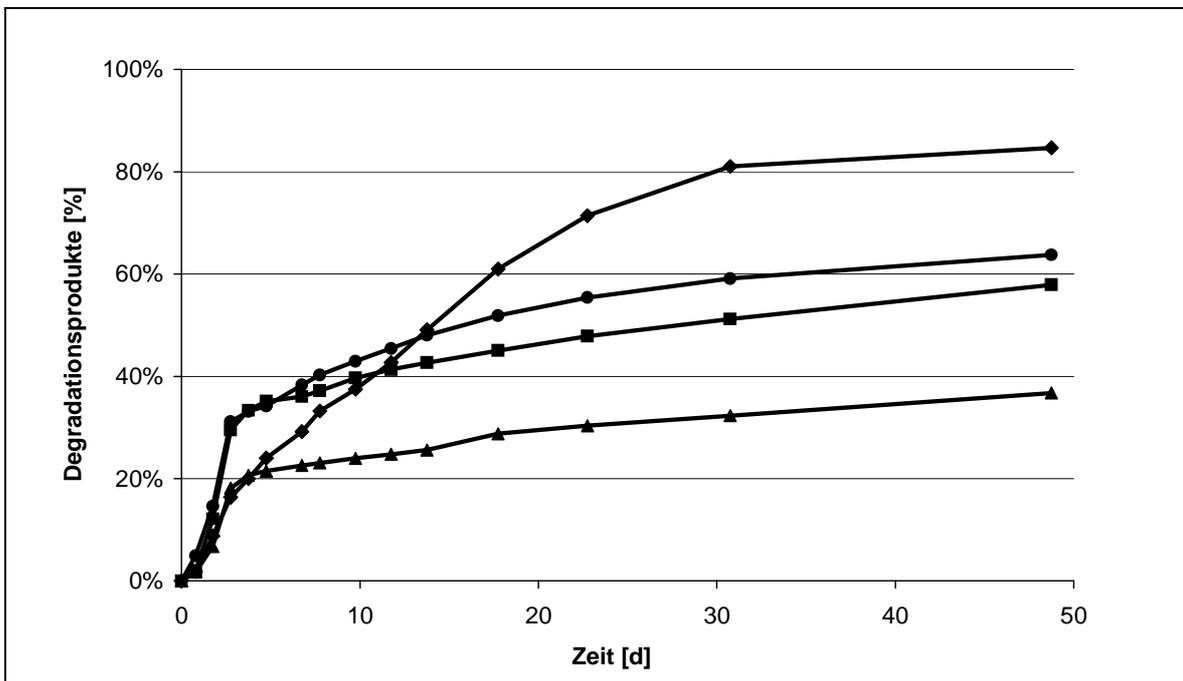
1. Bei der Methotrexat-Säure gab es initial einen Milchsäure-Freisetzung-Peak zu beobachten, der jedoch in seiner Höhe nicht an den der unbeladenen Stäbchen heranreicht. Beispielhaft ist in Abbildung 29 das Degradationsprofil von GOL-DL-1:18 Stäbchen mit einer 5%iger Methotrexat-Säure-Beladung dargestellt.

2. Stellt man die Degradationsprofile von Methotrexat-Säure (Abbildung 30) bzw. Methotrexat-Natrium (Abbildung 31) direkt gegenüber zeigen sie in ihrem Verlauf eine große Ähnlichkeit. Der Einfluss der Wirkstoffform (Vorliegen des Wirkstoffes als Säure oder Salz) auf das Degradationsverhalten spielt im Fall des Methotrexats eine untergeordnete Rolle.



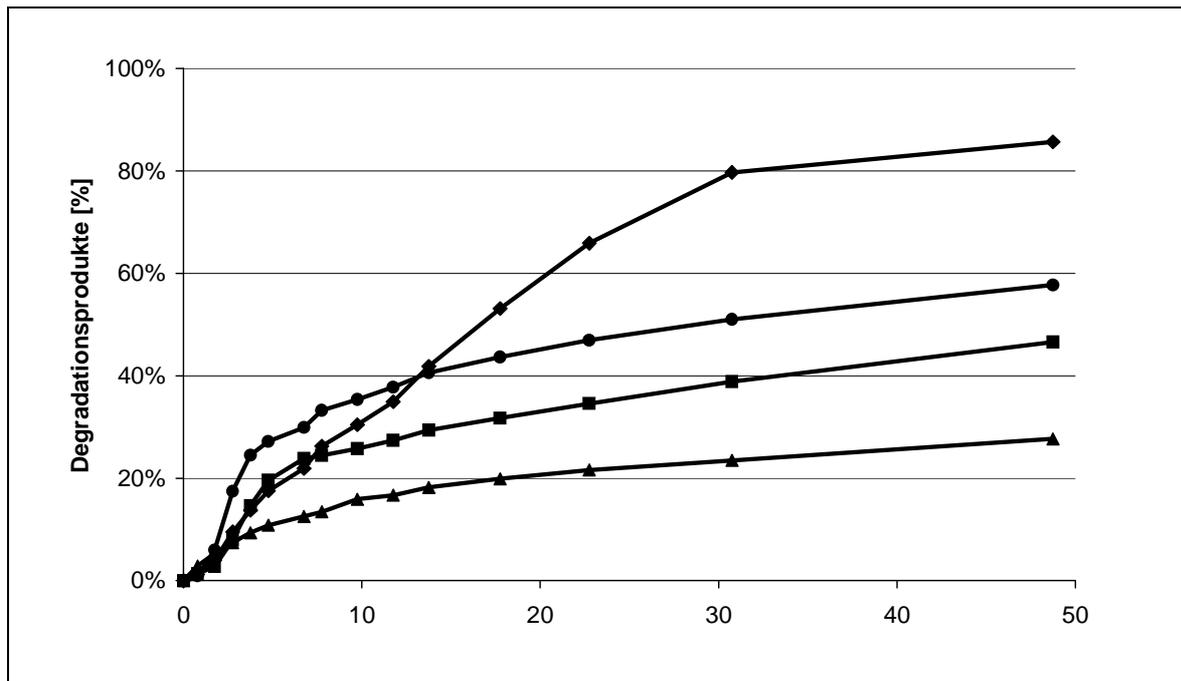
**Abbildung 29** Milchsäure-Freisetzung aus GOL-DL-1:18 Stäbchen mit 5%iger Methotrexat-Säure-Beladung

▲ : ohne Methotrexat      ■ : mit Methotrexat



**Abbildung 30** Milchsäure-Freisetzung aus Stäbchen unterschiedlicher Polymere mit 5%iger Methotrexat-Säure-Beladung

▲ : GOL-DL-1:18      ■ : GOL-DL-1:13,5:4,5  
 ● : GOL-DL-1:9:9      ◆ : GOL-L-1:4,5:13,5



**Abbildung 31 Milchsäure-Freisetzung aus Stäbchen unterschiedlicher Polymere mit 5%iger Methotrexat-Natrium-Beladung**

▲ : GOL-DL-1:18

■ : GOL-DL-1:13,5:4,5

● : GOL-DL-1:9:9

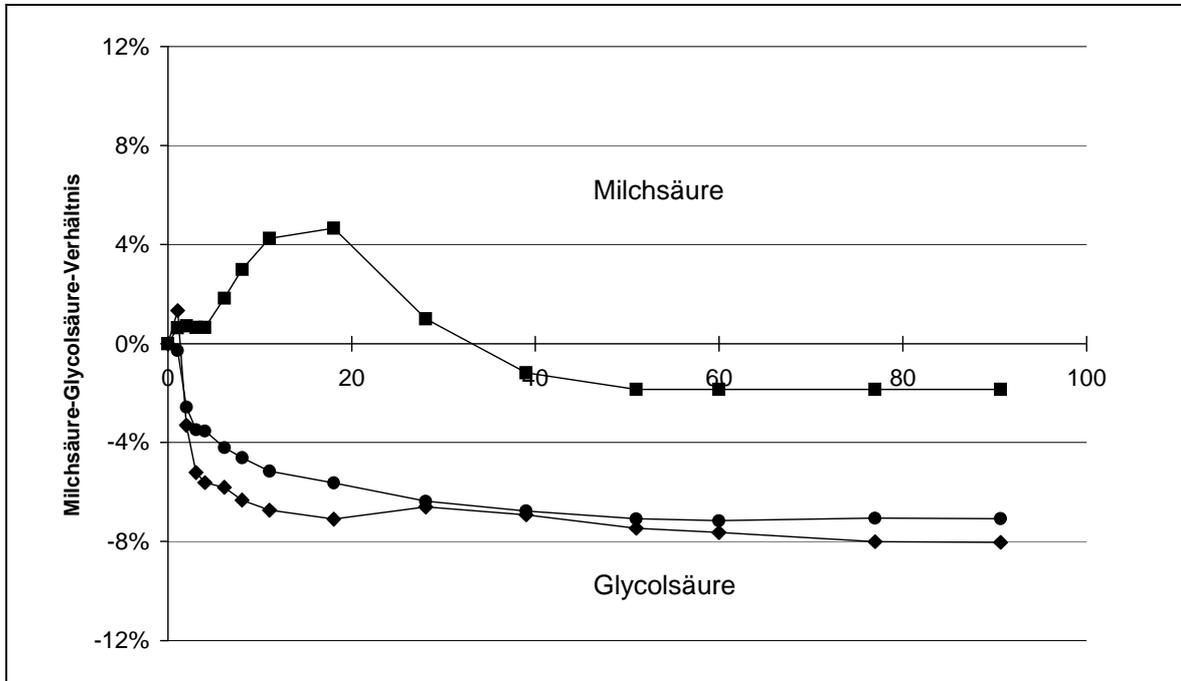
◆ : GOL-L-1:4,5:13,5

### I.3.2.3.5 Abbauverhältnis Milchsäure / Glycolsäure

Wie verhält es sich mit der Degradationsgeschwindigkeit der einzelnen Bestandteile der Polymere? Wird Milchsäure genauso schnell abgebaut wie Glycolsäure? Um einen Aussage darüber machen zu können, wurde der freigesetzte Gehalt an Milchsäure und dem der Glycolsäure gegenübergestellt. Um drei beispielhafte Polymere miteinander vergleichen zu können, wurden hierzu nicht die absoluten Zahlenwerte verwendet, sondern die Prozentwerte bezogen auf den Gesamtgehalt des jeweiligen Monomers in dem entsprechenden Polymer. Diese Prozentwerte wurden voneinander abgezogen. So bedeutet ein positiver Wert, dass zu einem bestimmten Zeitpunkt mehr Milchsäure freigesetzt wurde als Glycolsäure.

In Abbildung 32 sind diese Werte von drei Polymeren, dem GOLG-DL-1:4,5:13,5, GOLG-DL-1:9:9 und GOLG-DL-1:13,5:4,5 im Verlauf von 90 Tagen dargestellt. Diese Polymere stellen Molverhältnisse von Milchsäure zu Glycolsäure von 25:75, 50:50 und 75:25 dar. Wären die Abbaugeschwindigkeiten beider Monomere zu jeder Zeit des Abbau gleich schnell, entsprächen die Kurven im Diagramm der x-Achse. Es zeigen sich jedoch bei den Abbaueversuchen in Puffer pH 7,4 Abweichungen im Bereich von etwa +5% und -8% und eine Annäherung

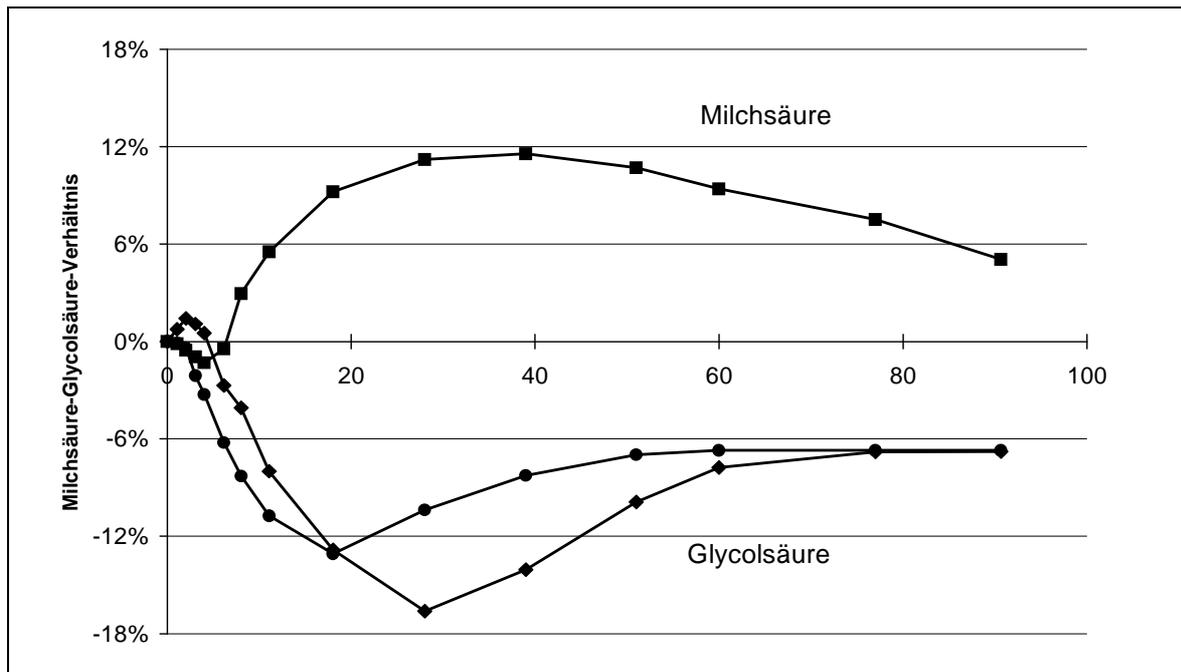
der Kurven bei langen Abbauzeiten an Werte im negativen Bereich. Das Polymer mit dem geringen Milchsäureanteil zeigt zunächst eine schnellere Freisetzung der Milchsäure, die sich aber nach etwa 30 Tagen zu Gunsten der Glycolsäure verändert. Bei den beiden anderen Polymeren scheint der Abbau der Glycolsäure generell schneller zu verlaufen.



**Abbildung 32 Degradationsgeschwindigkeit der einzelnen Polymerbestandteile in Puffer pH 7,4**

■ : GOLG-DL-1:13,5:4,5      ● : GOLG-DL-1:9:9  
 ◆ : GOLG-DL-1:4,5:13,5

Abbildung 33 zeigt die Ergebnisse des gleichen Versuchs, der hier jedoch nicht in Puffer, sondern in destilliertem Wasser durchgeführt wurde. Es fällt auf, dass die Abweichungen nach oben und unten ausgeprägter sind. Die Maxima betragen etwa +12% und -18% und liegen damit mehr als doppelt so hoch wie bei den Versuchen in Puffer. Auch hier zeigt das Polymer mit dem geringen Milchsäureanteil eine bevorzugte Freisetzung von Milchsäure, die jedoch über die gesamte Versuchsdauer erhalten bleibt. Die beiden anderen Polymere mit einem Milchsäuregehalt von 50% bzw. 75% setzen auch hier die Glycolsäure bevorzugt frei.



**Abbildung 33** Degradationsgeschwindigkeit der einzelnen Polymerbestandteile in Wasser

■ : GOLG-DL-1:13,5:4,5                      ● : GOLG-DL-1:9:9  
 ◆ : GOLG-DL-1:4,5:13,5

### I.3.3 Wirkstofffreisetzung aus den Polymerstäbchen

Die Freisetzung von Arzneistoffen aus Polymermatrices wird von vielen Einflussfaktoren beeinflusst. Einige Faktoren sind in den verwendeten Materialien selbst zu suchen, wie zum Beispiel in der Hydrophilie oder dem Diffusionsverhalten des verwendeten Arzneistoffes. Diese stoffimmanenten Eigenschaften lassen sich schwerlich verändern. Selten kann auf verschiedene Formen eines Arzneistoffes zurückgegriffen werden. Um nun die Freisetzung der Arzneistoffe an die klinischen Erfordernisse anzupassen, müssen äußere Parameter verändert und aufeinander abgestimmt werden. Diese Faktoren zu kennen ist unabdingbar für die Entwicklung von parenteralen Arzneimittelträgern. Im Folgenden wurden einige wichtige Einflussgrößen näher untersucht.

#### I.3.3.1 Einfluss der Beladungsrate

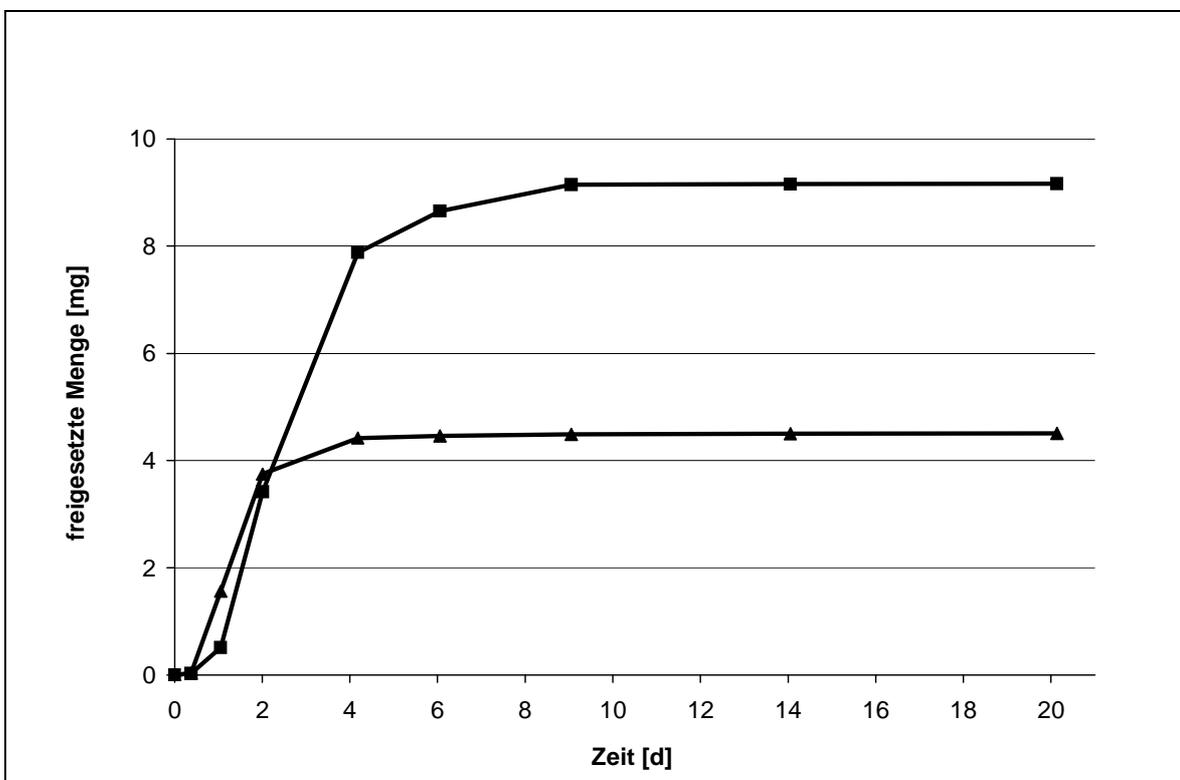
Werden zwei Depotsysteme mit unterschiedlichen Mengen an Wirkstoff beladen, so wird das Depot mit der höheren Beladungsrate eine insgesamt größere Menge an Wirkstoff wieder freisetzen. Bedeutet dies aber auch, dass der Wirkstoff bei dem höher beladenen System auch schneller eluiert wird? Ein hoher Anteil an Arzneistoff in einem Träger kann selbst Einfluss auf Freisetzung und Degradation

nehmen. Somit haben wir es mit einem komplexen System zu tun, dessen Freisetungsverhalten schwierig vorherzusagen ist und deshalb näher untersucht wurde.

### I.3.3.1.1 Gentamicin

Es wurden Polymerstäbchen mit einem Gehalt von 5% und 10% Gentamicin in Form des Sulfates hergestellt. Als Polymer fand ein GOL-L-1:18 Verwendung.

Die Betrachtung der kumulativen Darstellung (Abbildung 34) bestätigt eindeutig, dass ein größerer Gehalt an Arzneistoff zu einer erhöhten Freisetzung führt. Man findet bei doppelter Beladung in etwa den doppelten Gehalt an freigesetzter Substanz.

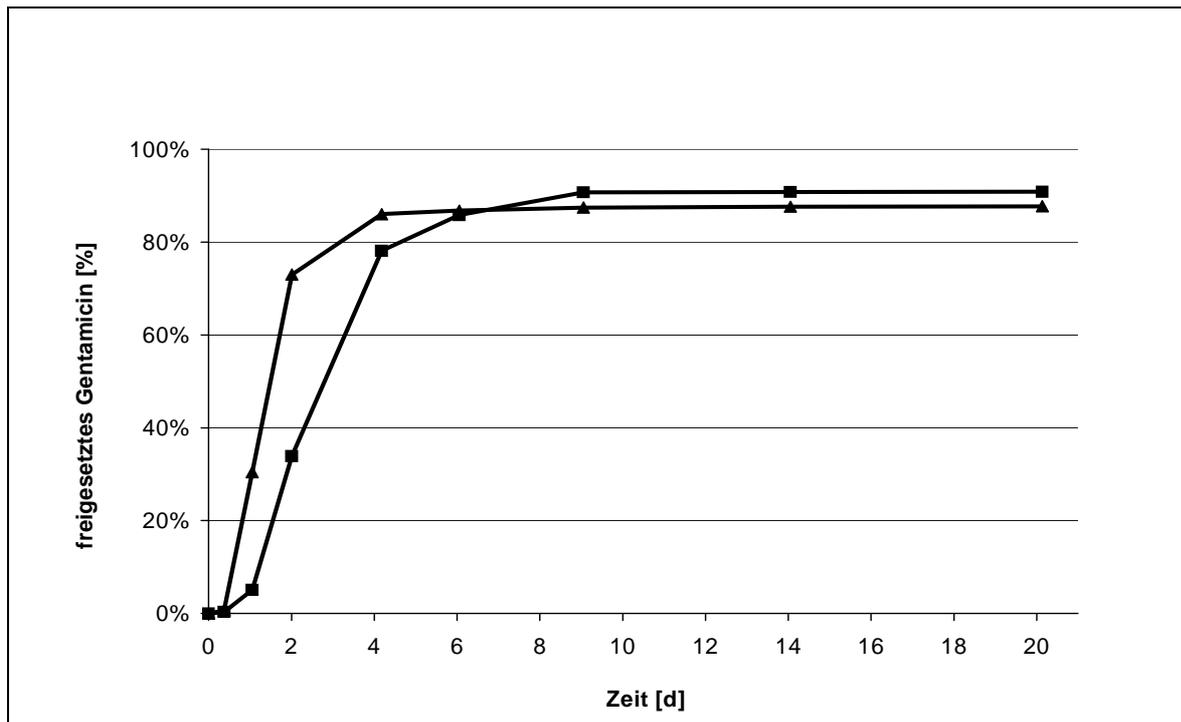


**Abbildung 34** Gentamicin-Freisetzung aus GOL-L-1:18 Stäbchen mit 5%iger und 10%iger Wirkstoff-Beladung; kummulative Darstellung

▲: 5% Gentamicin-Sulfat

■: 10% Gentamicin-Sulfat

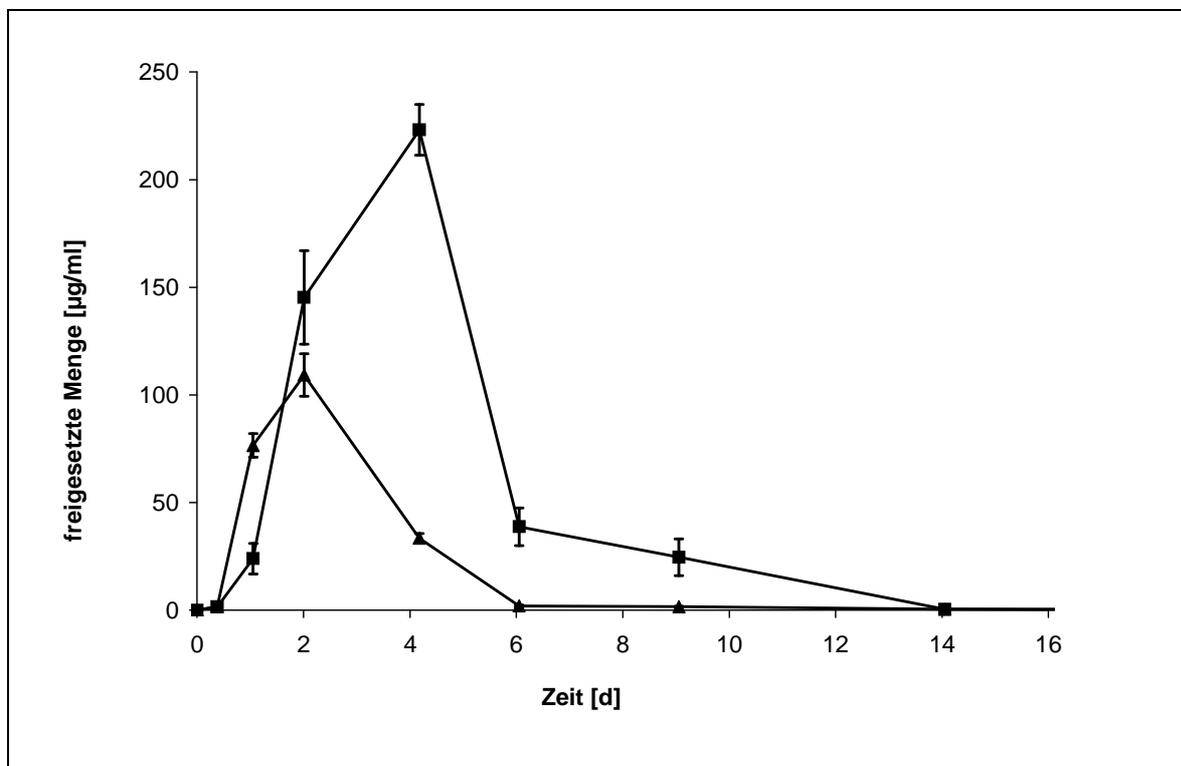
Betrachtet man dasselbe Freisetzungsprofil in einer prozentualen Darstellung (Abbildung 35) fällt folgendes auf. Die Freisetzung aus beiden Stäbchen erreicht beinahe den identischen Anteil von nämlich etwa 90%. Das Stäbchen mit der geringeren Beladungsrate setzt aber deutlich schneller frei. Besonders deutlich wird dies in der fraktionierten Darstellungsweise (Abbildung 36).



**Abbildung 35** Gentamicin-Freisetzung aus GOL-L-1:18 Stabchen 5%iger und 10%iger Wirkstoff-Beladung; prozentuale Darstellung

▲ : 5% Gentamicin-Sulfat

■ : 10% Gentamicin-Sulfat



**Abbildung 36** Gentamicin-Freisetzung aus GOL-L-1:18 Stabchen mit 5%iger und 10%iger Wirkstoff-Beladung; fraktionierte Darstellung

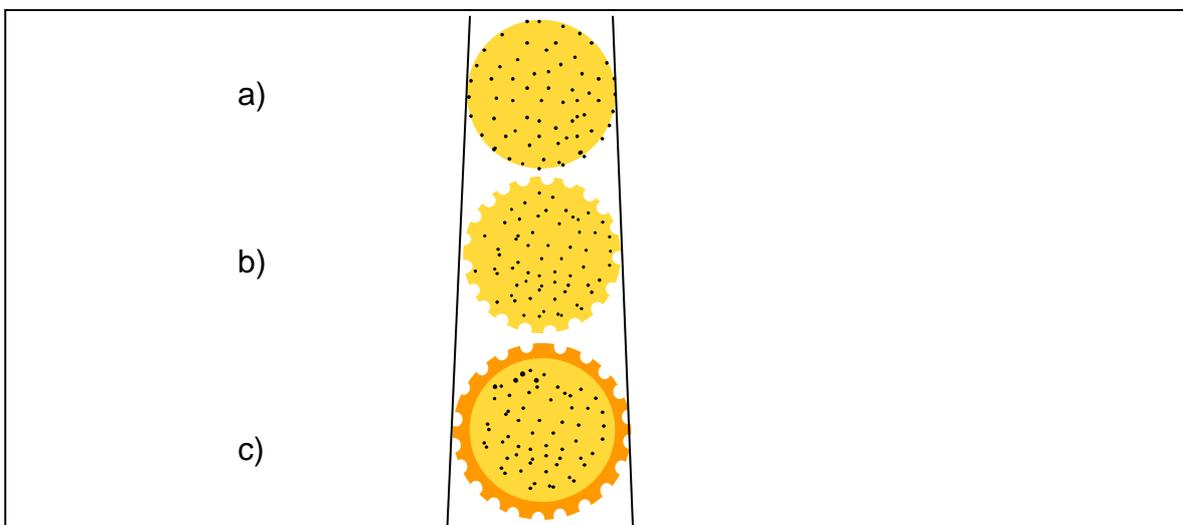
▲ : 5% Gentamicin-Sulfat

■ : 10% Gentamicin-Sulfat

Am ersten Tag setzt das Stäbchen mit der 5%igen Beladung mehr als doppelt so viel Gentamicin frei wie das mit der 10%igen Beladung. Das Freisetzungsmaximum wird beim niedriger dosierten Stäbchen nach etwa zwei Tagen, bei höher dosierten nach vier Tagen erreicht.

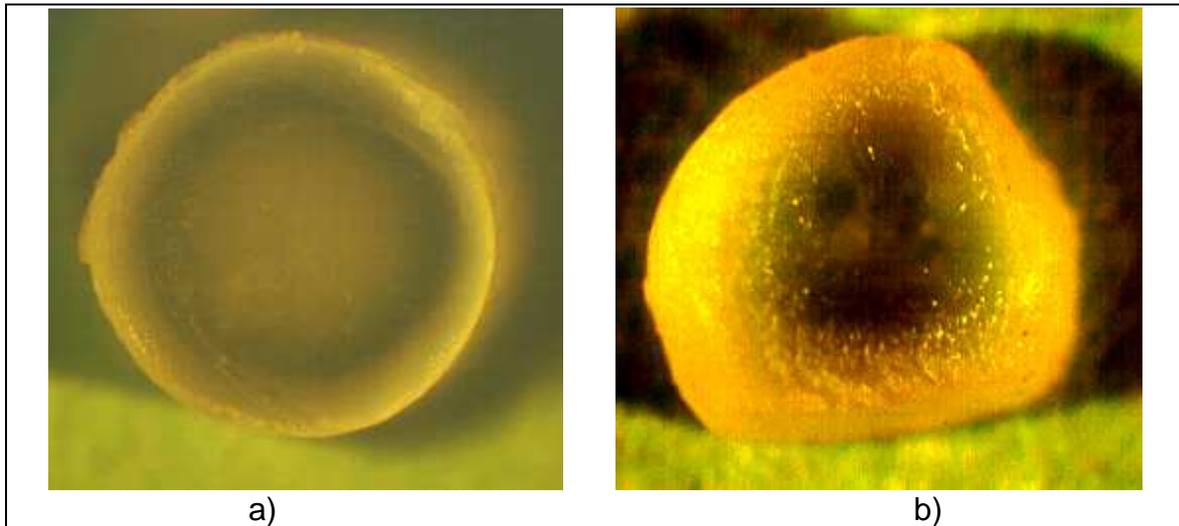
Ein Erklärungsansatz für dieses auf den ersten Blick ungewöhnliche Verhalten liegt im Quellungsverhalten der Polymere. Abbildung 37 soll dies verdeutlichen.

Direkt nach Einlegen der Stäbchen in das Freisetzungsmedium erfolgt ein Herauslösen des sich an der Oberfläche befindlichen, leichtlöslichen Gentamicin-Sulfates. Dies liegt für das Wasser offen zugänglich vor oder ist nur mit einer sehr dünnen Polymerschicht überzogen (Abbildung 37a). Erwartungsgemäß ist die Menge des freigesetzten Gentamicin bei den höherdosierten Stäbchen höher, da sich aus statistischen Gründen die Anzahl der sich an der Oberfläche befindlichen Antibiotika-Partikel mit der Dosierung erhöht. Die herausgelösten Partikel hinterlassen Kavitäten, die folglich die Oberfläche des Stäbchens drastisch erhöhen (Abbildung 37b). An dieser vergrößerten Oberfläche kann das Polymer nun beschleunigt Wasser aufnehmen und quellen. Diese Quellung geht mit einer Volumenvergrößerung einher und führt letztendlich zu verlängerten Diffusionswegen für weiter im Inneren des Stäbchens liegenden Wirkstoff (Abbildung 37c).



**Abbildung 37 Quellungsverhalten wirkstoffbeladener Stäbchen**

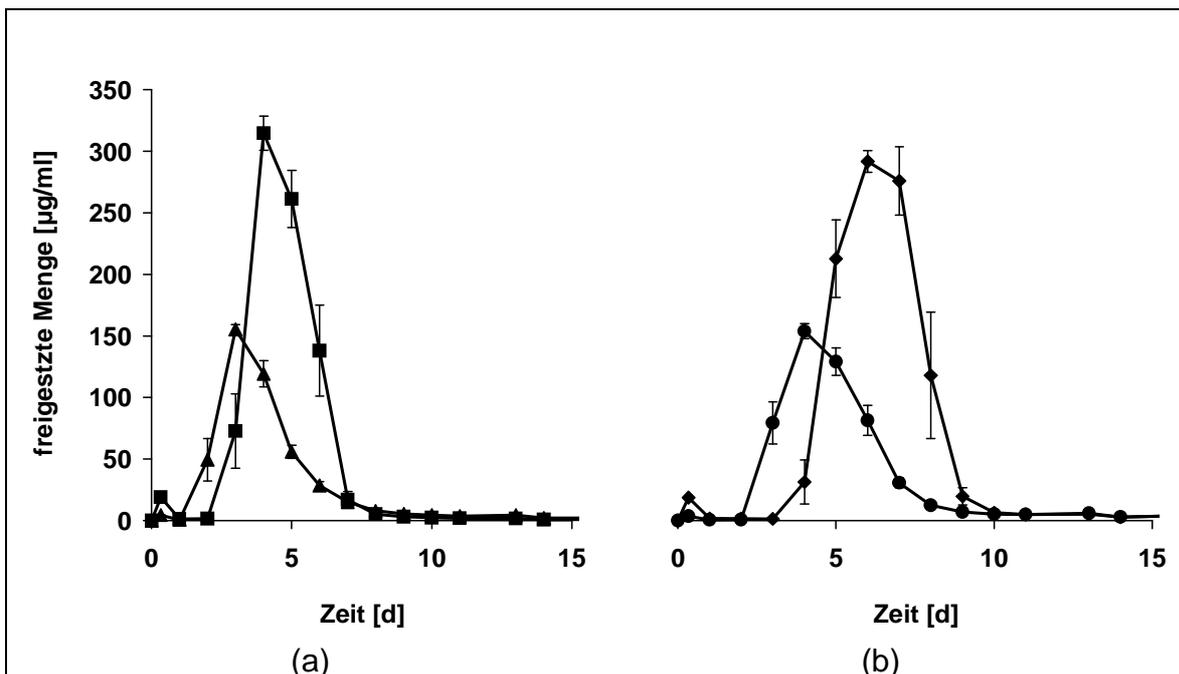
Folgende Aufnahmen durch ein Aufsichtsmikroskop (25-fache Vergrößerung) zeigen diese Quellungsschicht nach 3 und 8 Tagen.



**Abbildung 38** Wirkstofffreie Polymerstäbchen nach Lagerung in Puffer

a) nach 3 Tagen    b) nach 8 Tagen

Dieses Verhalten konnte auch in weiteren Versuchen beobachtet werden (Abbildung 39), bei denen das Freisetzungsverhalten in Abhängigkeit von dem L/DL-Verhältnis im Polymer untersucht wurde.



**Abbildung 39** Gentamicin-Freisetzung aus Polymer-Stäbchen mit 5%iger und 10%iger Wirkstoff-Beladung; fraktionierte Darstellung

(a)

(b)

▲: 5% GOL-L-1:18 / GOL-DL-1:18 85:15    ●: 5% GOL-L-1:18 / GOL-DL-1:18 70:30

■: 10% GOL-L-1:18 / GOL-DL-1:18 85:15    ◆: 10% GOL-L-1:18 / GOL-DL-1:18 70:30

Auch bei diesen Versuchen ist zu sehen, dass sich die Zeitpunkte der maximalen Freisetzung ( $t_{\max}$ ) aus den niedrig- bzw. höherdosierten Stäbchen um etwa 1 – 2 Tage unterscheiden. Das Ausmaß der Freisetzung an diesen Tagen unterscheidet sich analog zur Dosierung etwa um den Faktor zwei. In Abbildung 39 ist des Weiteren noch ein Hinweis auf den Mechanismus der verzögerten Freisetzung bei den höherdosierten Stäbchen zu erkennen. Die Polymere in Abbildung 39a) und b) unterscheiden sich in ihrem Gehalt an DL-Lactid in einer L-Lactid-Matrix. Der höhere DL-Anteil führt zu einer gesteigerten Quellungs-fähigkeit des Stäbchens. Ist nun tatsächlich eine durch Quellung vergrößerte Diffusionsstrecke verantwortlich für das unterschiedliche Erreichen der maximalen Freisetzung, so müsste bei dem Polymer mit dem höheren DL-Anteil der Unterschied in der  $t_{\max}$  größer sein. In der Tat liegt die Verzögerung von  $t_{\max}$  bei den Stäbchen mit dem geringeren DL-Anteil (Abbildung 39 a) bei einem Tag, bei den Stäbchen mit dem höheren DL-Anteil (Abbildung 39 b) bei zwei Tagen.

### **I.3.3.1.2 Methotrexat**

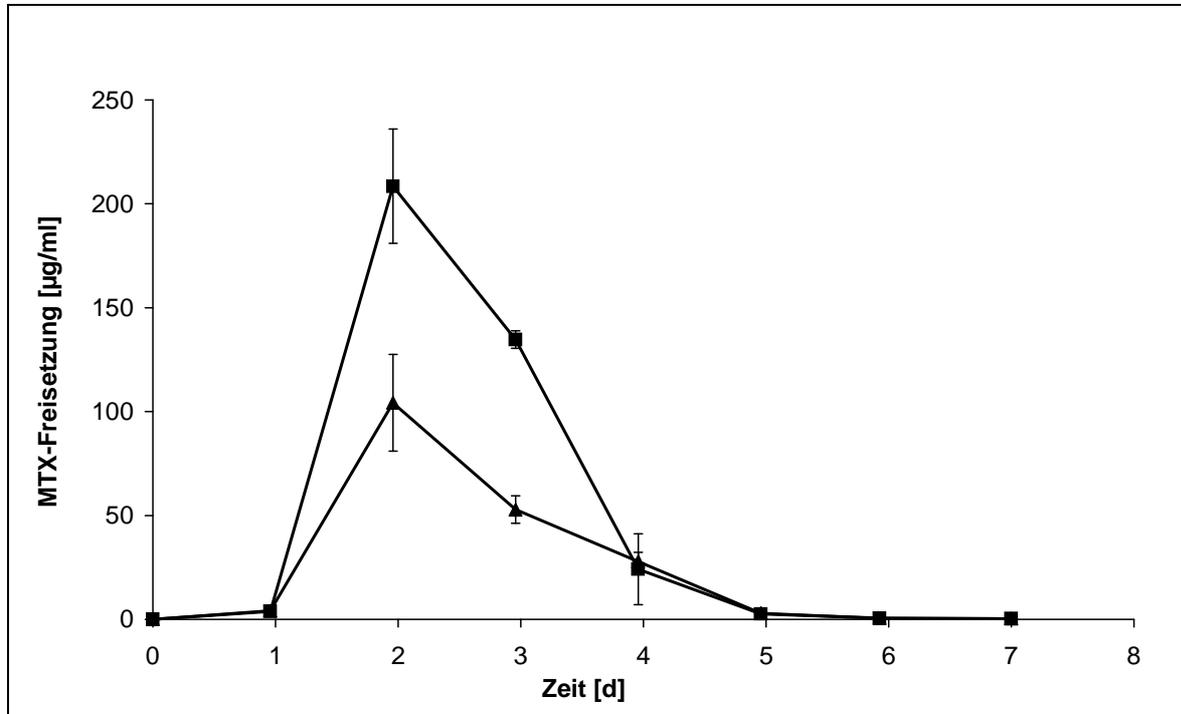
Das als Säure vorliegende Methotrexat ist in Wasser deutlich schlechter löslich als das Gentamicin-Sulfat. Somit könnte der bei dem Antibiotikum beobachtete Einfluss der Beladungsrate auf die Freisetzung ein anderer sein.

An der Oberfläche der Stäbchen liegende Wirkstoff-Partikel werden durch das Elutionsmedium nicht so schnell abgelöst. Dies führt nicht wie bei dem hydrophilen Gentamicin zu einer Oberflächenvergrößerung mit anschließend beschleunigter Quellung. Bei sehr schwerlöslichen Substanzen könnte sogar das Gegenteil der Fall sein. Auf der Oberfläche liegende Substanz wirkt wie ein hydrophober Überzug und erschwert dem Elutionsmedium, in den Prüfkörper einzudiffundieren. Dies hätte jedoch auf das Profil der Freisetzung einen ähnlichen Einfluss, dass nämlich ein Prüfkörper mit hohem Wirkstoffgehalt eine verzögerten  $t_{\max}$  aufweist.

Abbildung 40 zeigt nun die Ergebnisse eines Versuchs, bei dem zwei verschiedene Dosierungen an Methotrexat in ein GOL-L-1:18 Polymer eingearbeitet wurden.

Die eluierten Mengen an Methotrexat verhalten sich proportional zu der eingesetzten Dosierung, es wird also bei der höheren Dosierung etwa doppelt so viel freigesetzt. Bei beiden Dosierungen tritt das Freisetzungsmaximum am zweiten Tag auf. Dieses Freisetzungsprofil legt den Schluss nahe, dass es zu keiner beschleunigten Quellung des Prüfkörpers durch den beim Gentamicin-Sulfat beschriebenen Effekt kommt. Auch scheint eine 10%ige Beladung das Stäbchen an der Oberfläche nicht so stark zu hydrophobisieren, dass die

Wasseraufnahme dadurch behindert wird. Andererseits ist die Löslichkeit des Methotrexates in Puffer pH 7,4 (10 mg/ml) noch nicht so gering, als dass diese für eine Hydrophosphisierung ausreichend wäre.



**Abbildung 40** Methotrexat-Freisetzung aus Polymer-Stäbchen mit unterschiedlicher Wirkstoff-Beladung; fraktionierte Darstellung

▲ : 5% MTX

■ : 10% MTX

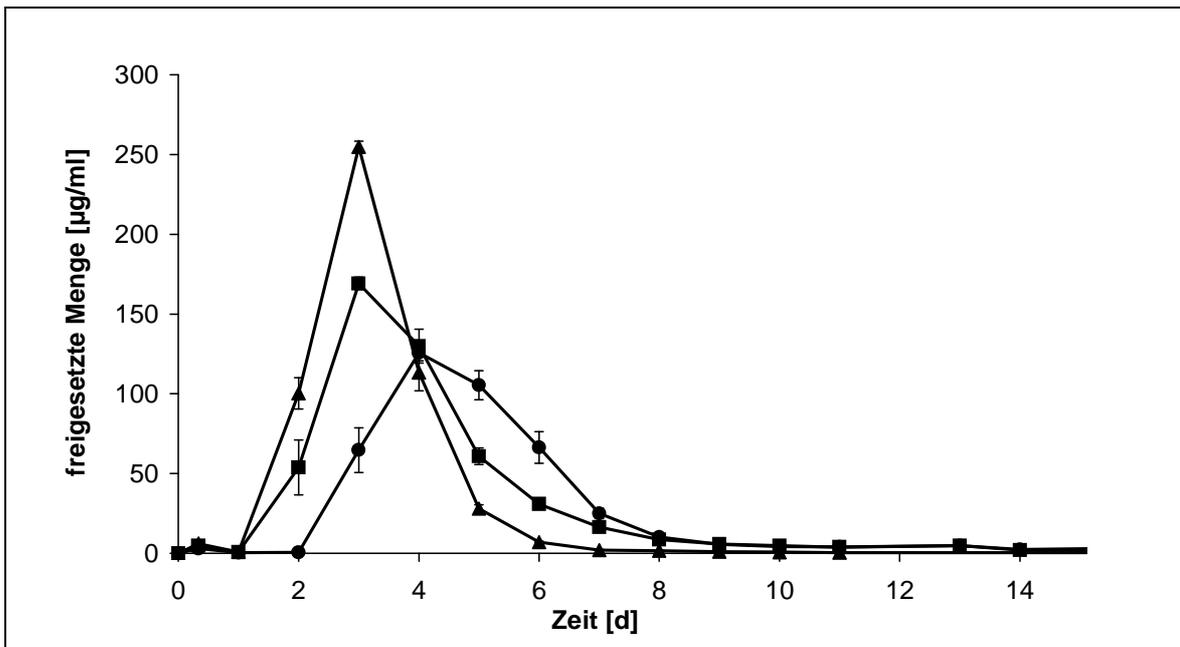
### I.3.3.2 Einfluss der Stereoisomerie der Milchsäure

Wie in Kapitel I.3.2.1 bei der Beschreibung des Wasseraufnahmeverhaltens der Polymere schon gezeigt wurde, nehmen die Polymere auf Basis von DL-Lactid Wasser deutlich schneller auf. Welchen Einfluss dies auf die Wirkstofffreisetzung hat, wurde anhand des Gentamicin-Sulfates und der Methotrexat-Säure untersucht. Es wurden hierzu Stäbchen mit unterschiedlichen Anteilen an GOL-DL-1:18-Polymer in einem GOL-L-1:18-Polymer hergestellt und ihre Freisetzung untersucht.

Zur Untersuchung kamen folgende Mischungen:

- GOL-L-1:18 / GOL-DL-1:18 100:0
- GOL-L-1:18 / GOL-DL-1:18 70:30
- GOL-L-1:18 / GOL-DL-1:18 85:15

### I.3.3.2.1 Gentamicin



**Abbildung 41 Gentamicin-Freisetzung aus Polymer-Stäbchen mit unterschiedlichen DL-Lactid-Anteilen und 5% Gentamicin; fraktionierte Darstellung**

▲ : GOL-L-1:18 / GOL-DL-1:18 100:0    ■ : GOL-L-1:18 / GOL-DL-1:18 85:15  
 ● : GOL-L-1:18 / GOL-DL-1:18 70:30

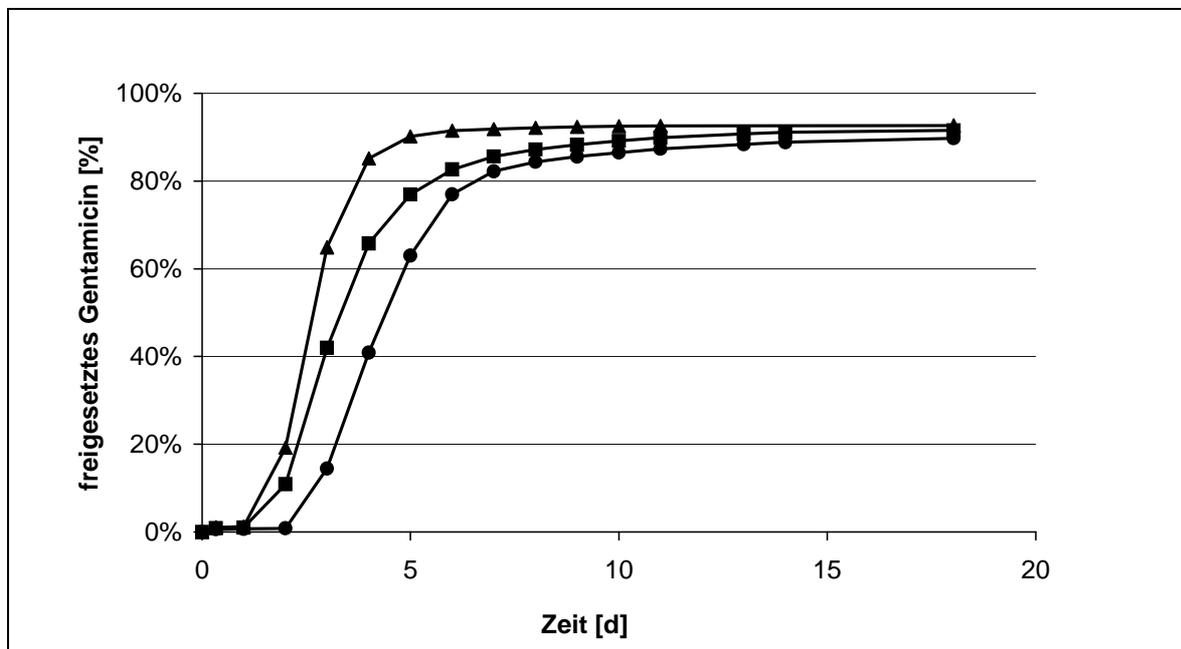
Die drei Freisetzungskurven in Abbildung 41 zeigen das Freisetzungsverhalten dieser Polymere, das sich jeweils um den 15% DL-Anteil, beginnend bei 0%, unterscheidet. Bei dem reinen L-Lactid Polymer findet man einen beinahe symmetrischen Freisetzungsspeak am dritten Tag. Schon der Zusatz von 15% DL-Lactid führt zu einer deutlich veränderten Freisetzung, die zwar immer noch, bedingt durch die Abnahmeintervalle, am Tag drei ihr Maximum hat, aber im Ausmaß deutlich tiefer liegt. Im weiteren Verlauf sinken die freigesetzten Gentamicinmengen langsamer ab als beim reinen L-Lactid. Beim dritten Polymer mit 30% DL-Anteil ist dieses Profil noch ausgeprägter. Hier erfolgt die maximale Freisetzung erst am Tag vier.

Auch hier dürfte das veränderte Quellungsverhalten durch den DL-Anteil für die verschiedenen Freisetzungsprofile verantwortlich sein. Die Verlängerung des

Diffusionsweges erklärt das erniedrigte Maximum bei gleichzeitiger Verbreiterung der Freisetzungskurve.

Eine gewisse Analogie findet man in der Chromatographie. Lange Laufzeiten führen hier aus statistischen Gründen ebenfalls zur Erniedrigung und Verbreiterung des Peaks im Vergleich zu kurzen Laufzeiten. Die Fläche unter dem Peak verändert sich hierbei nicht.

Eine Berechnung der Flächen unter den Freisetzungskurven wurde nicht durchgeführt, sie ergibt sich aber durch Addition der an den einzelnen Tagen freigesetzten Mengen an Gentamicin. Abbildung 42 zeigt die gleichen Versuchsergebnisse in kumulierter Darstellung bei Angabe der prozentualen Freisetzung an Gentamicin.



**Abbildung 42** Gentamicin-Freisetzung aus Polymer-Stäbchen mit unterschiedlichen DL-Lactid-Anteilen und 5% Gentamicin; kumulierte Darstellung

▲: GOL-L-1:18 / GOL-DL-1:18 100:0    ■: GOL-L-1:18 / GOL-DL-1:18 85:15  
●: GOL-L-1:18 / GOL-DL-1:18 70:30

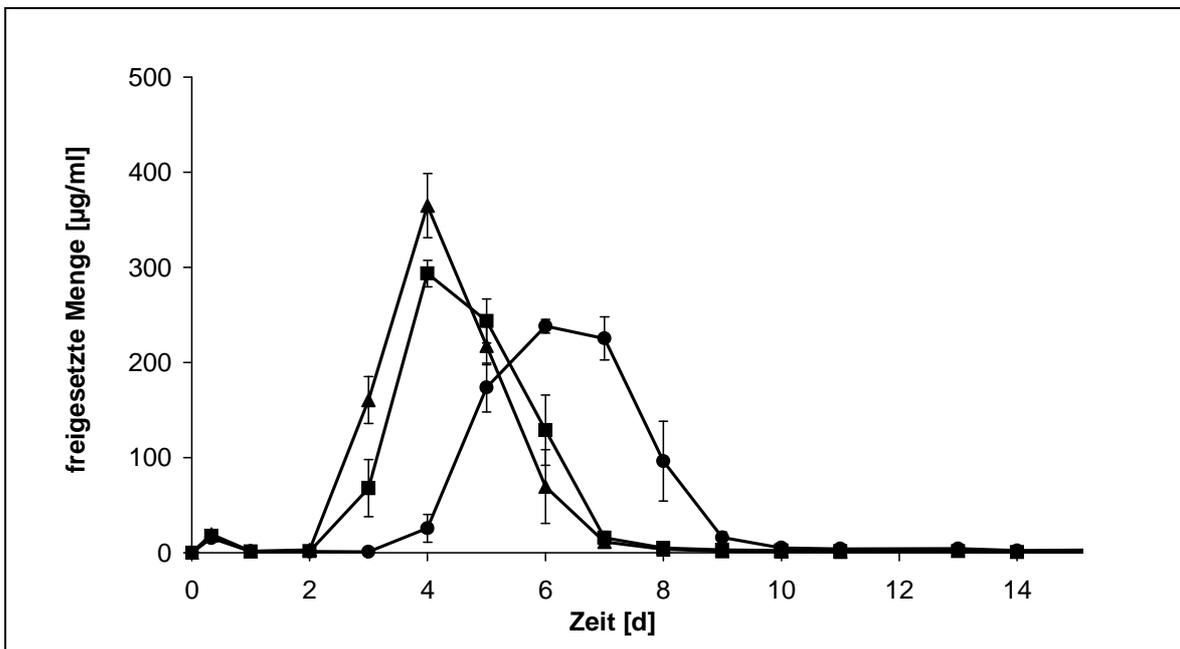
Alle drei Polymere haben nach 18 Tagen über 90% des enthaltenen Gentamicins freigesetzt.

Mit den gleichen Polymermischungen wurde ein analoger Versuch durchgeführt, bei dem die Beladungsrate auf 10 % verdoppelt wurde. Abbildung 43 zeigt die dazugehörigen Freisetzungskurven.

Prinzipiell unterscheidet sich das Freisetzungsverhalten der unterschiedlich hoch beladenen Polymerstäbchen nur in der absoluten Höhe der Freisetzung, das Profil der Kurven ähnelt sich stark.

Auch hier erreicht die Freisetzung nach 18 Tagen über 90%.

Was auch hier auffällt ist, dass bei höherer Beladungsrate das Maximum der Freisetzung später erreicht wird. Liegt dieses Maximum bei der 5%-igen Beladung zwischen 3 und 4 Tagen, erreichen die Stäbchen mit 10% Gentamicin-Gehalt die maximale Freisetzung nach 4 bis 6 Tagen.



**Abbildung 43** Gentamicin-Freisetzung aus Polymer-Stäbchen mit unterschiedlichen DL-Lactid-Anteilen und 10% Gentamicin

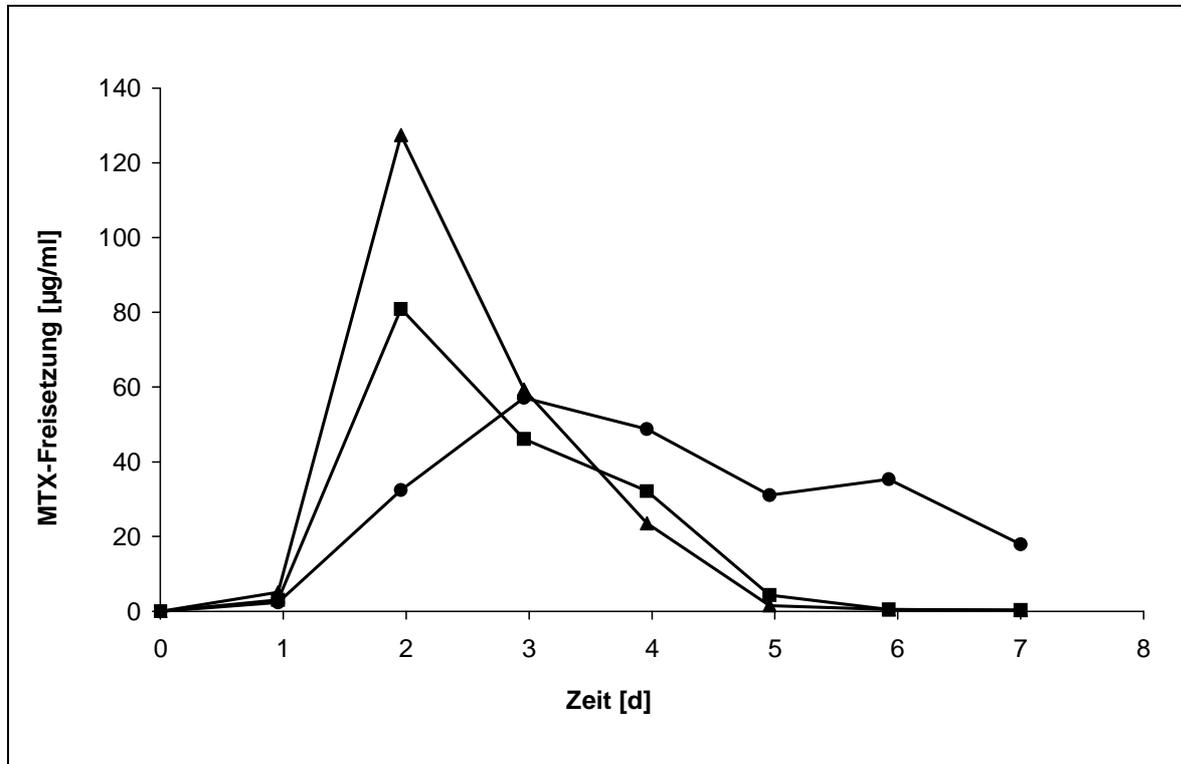
▲ : GOL-L-1:18 / GOL-DL-1:18 100:0    ■ : GOL-L-1:18 / GOL-DL-1:18 85:15  
 ● : GOL-L-1:18 / GOL-DL-1:18 70:30

### I.3.3.2.2 Methotrexat

Vergleicht man das Freisetzungsprofil des Methotrexats (Abbildung 44) mit dem des Gentamicin-Sulfates bei den identischen Polymerzusammensetzungen (Abbildung 41) wird deutlich, dass der Einfluss der Stereoisomerie der Monomere (L- bzw. DL-Lactid) auf die Freisetzung deutlich höher zu sein scheint, als unterschiedliche Wirkstoffeigenschaften. Die Profile der beiden Freisetzung ähneln sich sehr stark.

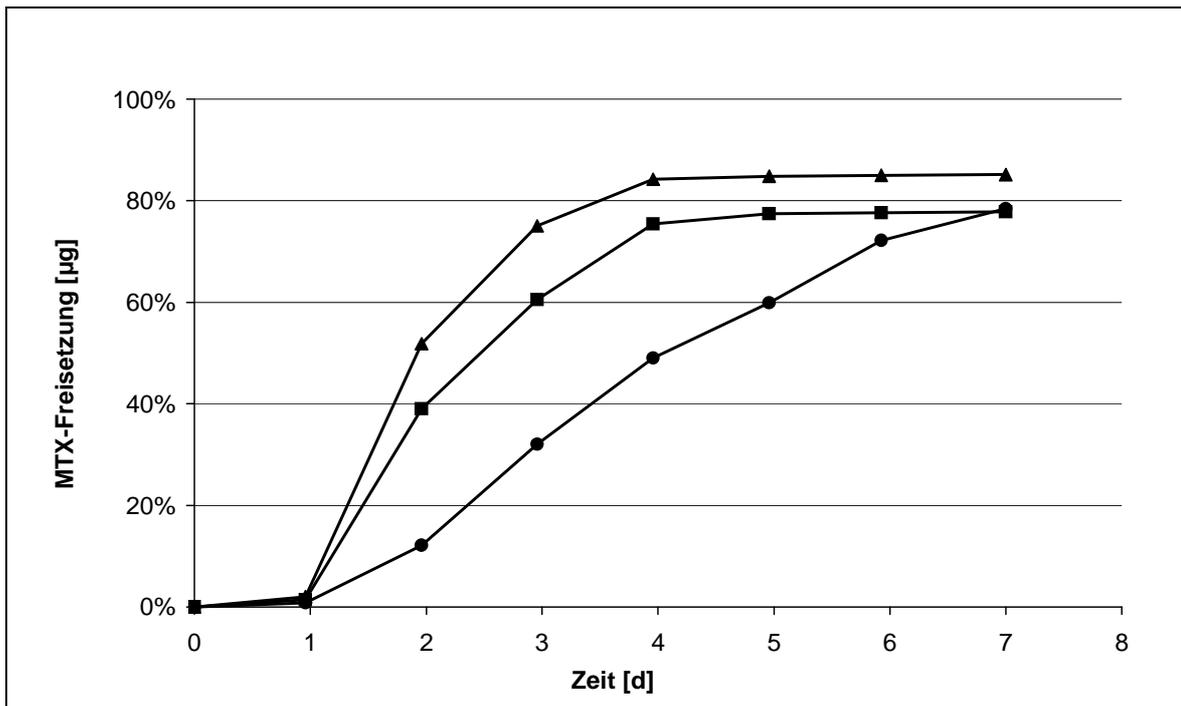
Wie bei der Freisetzung des Gentamicin-Sulfats haben die unterschiedlichen Polymereismischungen keinen Einfluss auf die insgesamt freigesetzte Menge an

Methotrexat. Die kumulierte Darstellung in Abbildung 45 verdeutlicht dies. Auch hier verschieben sich die Maxima der Freisetzung mit zunehmendem DL-Lactidgehalt zu späteren Zeitpunkten hin bei gleichzeitiger Verringerung der dabei freigesetzten Wirkstoffmenge.



**Abbildung 44** Methotrexat-Freisetzung aus Polymer-Stäbchen mit unterschiedlichen DL-Lactid-Anteilen und 5% Methotrexat;

▲ : GOL-L-1:18 / GOL-DL-1:18 100:0    ■ : GOL-L-1:18 / GOL-DL-1:18 85:15  
● : GOL-L-1:18 / GOL-DL-1:18 70:30



**Abbildung 45 Methotrexat-Freisetzung aus Polymer-Stäbchen mit unterschiedlichen DL-Lactid-Anteilen und 5% Beladung; kumulierte Darstellung**

▲ : GOL-L-1:18 / GOL-DL-1:18 100:0    ■ : GOL-L-1:18 / GOL-DL-1:18 85:15  
 ● : GOL-L-1:18 / GOL-DL-1:18 70:30

Die Freisetzungsuntersuchungen mit Methotrexat wurden im Gegensatz zu denen mit Gentamicin-Sulfat nur über einen Zeitraum von 7 Tagen durchgeführt, da – zumindest bei den Mischungen L / DL 100:0 und L / DL 70:30 – keine nennenswerte Freisetzung mehr erfolgte. Betrachtet man die Freisetzung des Gentamicin-Sulfats in dem entsprechenden Zeitraum von 7 Tagen, so unterstreicht dies die Ähnlichkeit der beiden Freisetzungsprofile.

Es fällt auf, dass etwa nur 80% des in den Polymerstäbchen enthaltenen Methotrexates freigesetzt wurde. Dies stimmt mit der Beobachtung überein, dass die Polymerstäbchen am Ende der Freisetzungsuntersuchung noch eine deutliche Orange-Färbung besaßen.

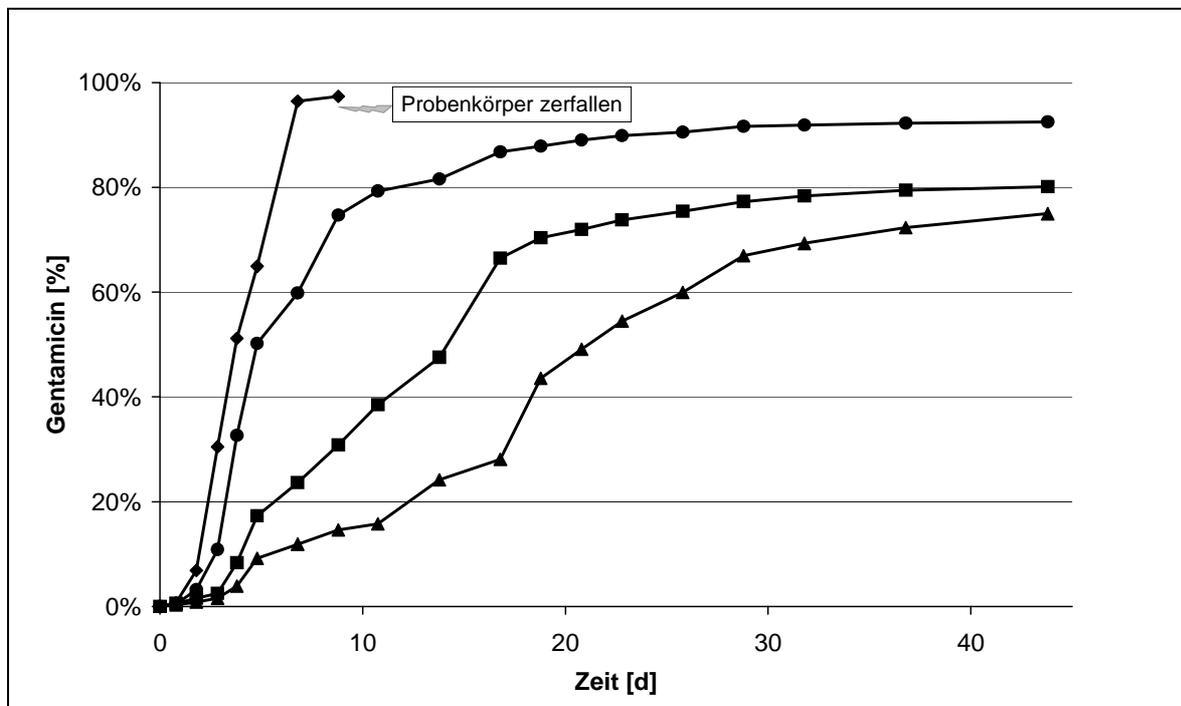
### I.3.3.3 Einfluss des Lactid / Glycolidgehaltes

#### I.3.3.3.1 Gentamicin

Wie schon unter anderem in Kapitel I.3.2.3.2 erläutert, führt die Copolymerisation mit Glycolid zu hydrophileren Polymeren. Dies hatte auf verschiedene Polymereigenschaften wie zum Beispiel die Wasseraufnahme einen Einfluss,

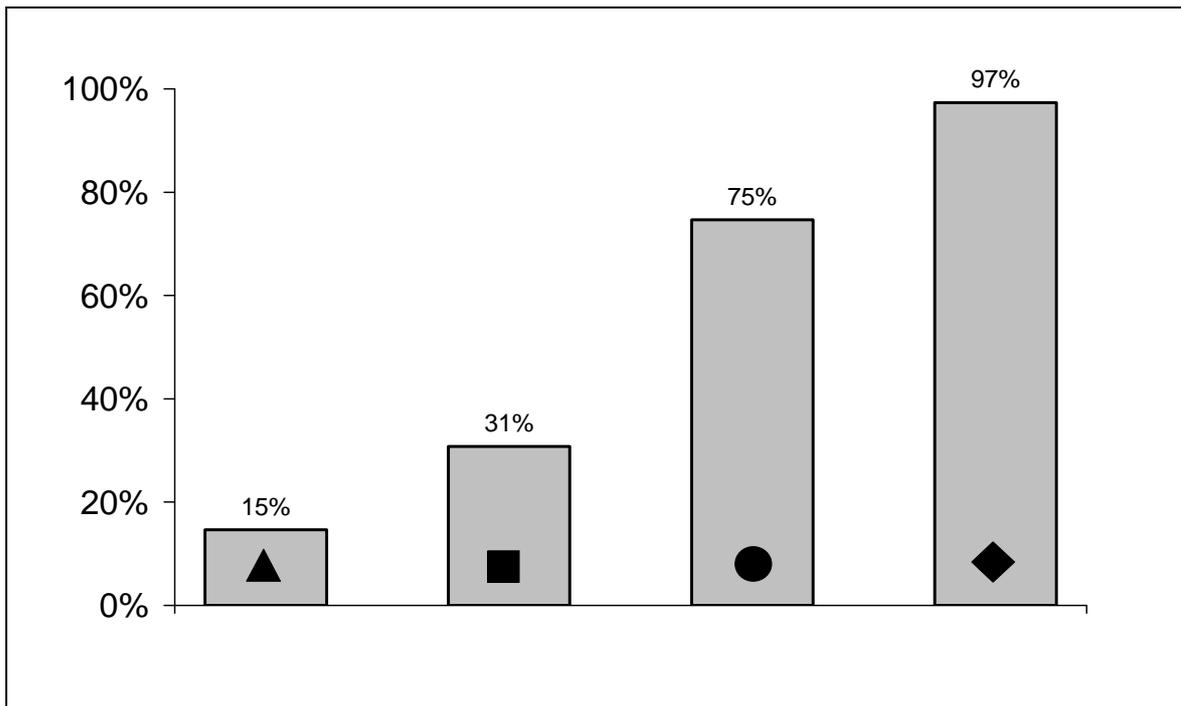
resultierte aber letztendlich in einer schnelleren Degradation. In welchem Ausmass ein Einfluss auf die Freisetzung von Gentamicin-Sulfat besteht, wurde im nächsten Versuch untersucht.

Abbildung 46 zeigt die Freisetzungprofile verschiedener Polymerstäbchen, die sich in ihrem Glycolidgehalt unterschieden. Die Beladungsrate mit Gentamicin-Sulfat betrug 5%. Wie schon bei anderen Untersuchungen beobachtet, werden erst nach einer Zeit von etwa 2 bis 4 Tagen höhere Konzentrationen an Gentamicin freigesetzt. Nach dieser Initialphase verhalten sich die Polymere aber deutlich unterschiedlich. Die Freisetzungsgeschwindigkeit hängt direkt mit dem Glycolidgehalt im Polymer zusammen. Je höher dieser ist, desto schneller wird das Gentamicin freigesetzt. Dies wird besonders deutlich, wenn man die freigesetzte Wirkstoffmenge zu einem bestimmten Zeitpunkt betrachtet. In der Abbildung 47 ist dies für den Tag 9 der Untersuchung dargestellt.



**Abbildung 46** Gentamicin-Freisetzung aus Stäbchen unterschiedlicher Polymere mit 5%iger Beladung

- |                   |                        |
|-------------------|------------------------|
| ▲ : GOLG-DL-1:18  | ■ : GOLG-DL-1:13,5:4,5 |
| ● : GOLG-DL-1:9:9 | ◆ : GOLG-DL-1:4,5:13,5 |



**Abbildung 47 Kumulierte -Freisetzungsmenge an Gentamicin am neunten Untersuchungstag**

▲ : GOL-DL-1:18  
● : GOLG-DL-1:9:9

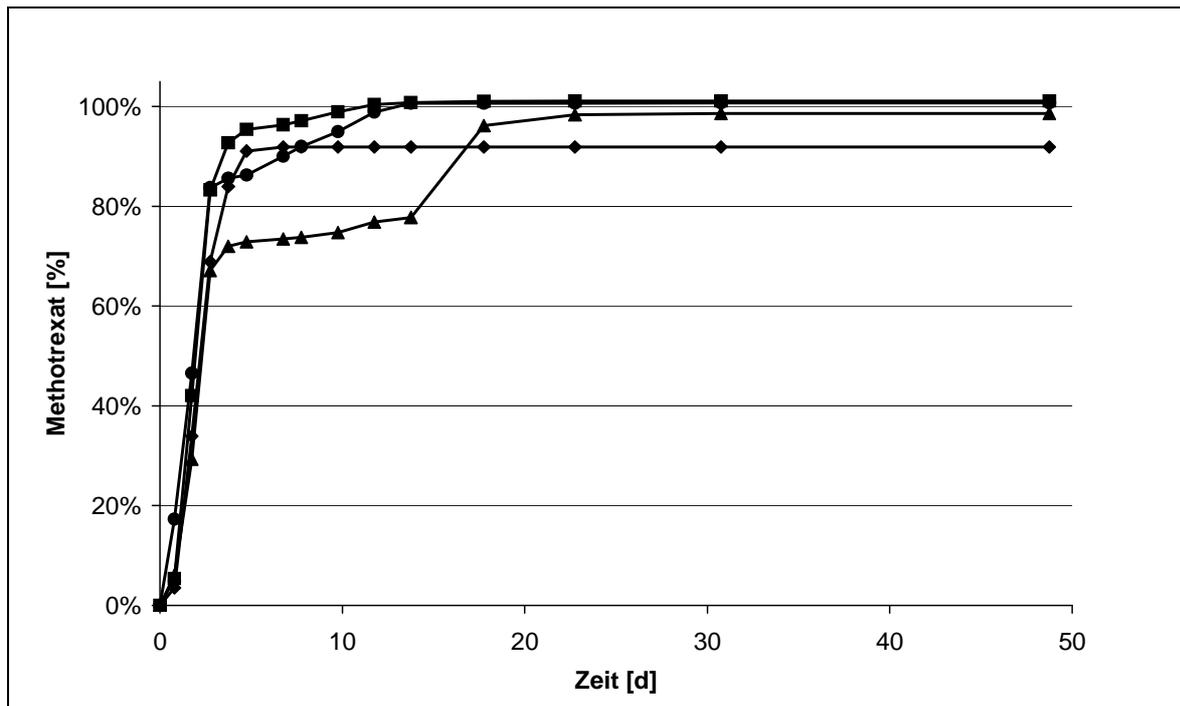
■ : GOLG-DL-1:13,5:4,5  
◆ : GOLG-DL-1:4,5:13,5

### I.3.3.3.2 Methotrexat

Von Methotrexat war aufgrund seiner geringeren Wasserlöslichkeit ein anderes Freisetzungsverhalten zu erwarten. Es wurde deshalb unter den gleichen Versuchsbedingungen wie beim vorigen Gentamicin-Versuch die Methotrexat-Freisetzung untersucht.

Erstaunlich war die relativ vollständige Freisetzung des Wirkstoffes innerhalb von 10 Tagen. Dabei zeigten sich kaum Unterschiede zwischen den verschiedenen Polymeren. Lediglich das GOL-DL-1:18 fiel etwas aus der Reihe mit einem zweiphasigen Freisetzungsverlauf.

Eine Interpretationsmöglichkeit dieses Ergebnisses wäre, dass trotz der geringeren Wasserlöslichkeit des Methotrexates die Affinität zum Elutionsmedium höher ist als zum Polymer. Das würde bedeuten, dass in einem gequollenen Polymerstäbchen die Verteilung des Wirkstoffes zwischen Polymer und Wasser deutlich zum Wasser hin verschoben ist. Deshalb dauert es beim Polymer mit der geringsten Hydrophilie in diesem Versuch - dem GOL-DL-1:18 - etwas länger, bis dort die Freisetzung vollständig ist. Grund für diese Verzögerung ist die längere Quellungsdauer dieses Polymers.



**Abbildung 48 Methotrexat-Freisetzung aus Stäbchen unterschiedlicher Polymere mit 5%iger Beladung**

- |                   |                        |
|-------------------|------------------------|
| ▲ : GOL-DL-1:18   | ■ : GOLG-DL-1:13,5:4,5 |
| ● : GOLG-DL-1:9:9 | ◆ : GOLG-DL-1:4,5:13,5 |

## I.4 Zusammenfassung

Bei den Untersuchungen mit den entwickelten Polymerstäbchen hat sich gezeigt, dass sich die Klasse der Polyol-oligolactide/co-glycoliden von herkömmlichen, reinen Polylactiden bzw. Polylactiden/co-glycoliden in einigen Punkten unterscheiden.

Bei keinem der Versuche wurde ein inhomogenes Abbauverhalten festgestellt, wie dies in der Literatur bei reinen Polylactiden/co-glycoliden beschrieben ist. Es kam also nicht zu einem durch Autokatalyse beschleunigten Polymerabbau im Inneren der Stäbchen, der sich dort akkumulierenden Milchsäure. Die höhere Hydrophilie der Glycerol-Polymere ermöglichte eine ausreichende Diffusion der Degradationsprodukte nach außen, was ein Zerplatzen der Stäbchen verhinderte.

Verschiedene Faktoren beeinflussten die Eigenschaften der Polymerstäbchen. So konnte die Wasseraufnahmefähigkeit durch das Verhältnis der Mischung von L-Polymeren zu DL-Polymeren sehr weit variiert werden. Das amorphe DL-Polymer ermöglicht eine erleichterte Wasseraufnahme gegenüber der reinen teilkristallinen L-Variante.

---

Die Co-Polymerisation mit Glycolid bot eine weitere Möglichkeit, die Eigenschaften der Polymere zu beeinflussen. So stieg bei den Polymeren mit gleichem Glycerin/Monomer-Verhältnis die Hydrophilie in der Reihe GOL-DL-1:18 < GOL-DL-1:13,5:4,5 < GOL-DL-1:9:9 < GOL-DL-1:4,5:13,5 an.



## **Thema II**

Entwicklung eines Freigabesystems für  
ein cyclisches Peptid



## II.1 Einführung

Peptide gewinnen in der systemischen Pharmako-Therapie unterschiedlichster Krankheiten zunehmend an Bedeutung. Aufgrund ihrer Empfindlichkeit gegenüber den Verhältnissen im Magen-Darm-Trakt schließt sich eine orale Applikation jedoch meistens aus. Da es aber, wie zum Beispiel beim Insulin, keine Alternative in der Therapie gibt, muss die tägliche Injektion in Kauf genommen werden. Müssen solche empfindlichen Peptide über einen längeren Zeitraum verabreicht werden, stellt die Behandlung für den Patienten eine Einschränkung der Lebensqualität dar.

Eine Möglichkeit, die Verabreichung dieser Stoffe zu erleichtern, ist die Suche nach einem alternativen Applikationsweg. So wird derzeit versucht, die hohe Permeabilität der Nasenschleimhaut zu nutzen und Insulin mittels eines Nasensprays zu verabreichen, was jedoch das Problem einer kontrollierten Resorption und damit einer exakten Dosierung aufwirft.

Für Substanzen, die sich nicht auf diesem Wege applizieren lassen, wäre eine parenterale Depot-Arzneiform eine mögliche Alternative [101, 102]. Einmal appliziert, würde ein solches System über mehrere Wochen seinen Wirkstoff abgeben, ohne dass der Patient auf die regelmäßige Einnahme zu achten hätte.

Eine solche Retard-Formulierung wäre aber nicht nur in der Therapie von großem Nutzen, sondern schon in der Entwicklung der Arzneistoffe. Hierbei ist es im Rahmen von Kinetik-Studien notwendig, Versuchstieren über einen bestimmten Zeitraum neue Arzneistoffe zu verabreichen, um deren Metabolismus zu untersuchen. Für solch eine Anwendung wäre eine gleichbleibende Abgabe des Arzneistoffs über längere Zeit hilfreich.

Für ein bei der Merck KGaA in der Entwicklung befindliches Peptid wurde erwogen, ein Freigabesystem für Tierstudien zu entwickeln. Wegen der kurzen Halbwertszeit des Peptides von 15 Minuten musste den Versuchstieren das Peptid ständig nachinjiziert werden, um relativ gleichmäßige Wirkstoffspiegel zu erreichen. Aus diesem Grund bestand Bedarf nach einem System, mit einem definierten Freisetzungsverhalten. Es sollte ein Serumspiegel von 300 ng/ml im Steady State erreicht werden, wobei initial ein kurzfristig deutlich höherer Serumspiegel durchaus erwünscht war.

Auf der Suche nach einem geeigneten Freigabesystem für die Peptide musste im Vorfeld der Freisetzungsforschungen die Vielzahl der möglichen Kombinationen aus Polymer, Geometrie des Formkörpers und Zumischungen von

Hilfsstoffen eingegrenzt werden. Zum Zeitpunkt der Untersuchungen standen die Prüfsubstanzen in nur sehr begrenztem Umfang zur Verfügung. Zwar war durch das Herstellungsverfahren der Prüfkörper ein sehr sparsamer Umgang mit den Peptiden möglich, dennoch war die Menge für weitreichende Untersuchungen zu gering.

Der Gewichtsverlauf der Prüfkörper bei Einlagerung in Puffer schien besonders deshalb als Auswahlkriterium geeignet zu sein, da die Versuche zügig durchzuführen waren und so ein schnelles Ergebnis erwartet werden konnte.

Bei der zu applizierenden Substanz handelte es sich um ein cyclisches Penta-Peptid mit der internen Bezeichnung EMD 66203. Bei den Freisetzung-untersuchungen wurden noch andere Peptide dieser Klasse verwendet. Diese hatten die Bezeichnung EMD 84332 und EMD 121974.

Durch die cyclische Struktur zeigt dieses Peptid im Vergleich zu seinen linearen Analoga eine ausgeprägte Stabilität gegenüber physikalisch-chemischen Einflüssen. Trotz dieser Tatsache wurde bei der Entwicklung des Freisetzung-systems auf eine möglichst geringe thermische Belastung großen Wert gelegt. Es sollte prinzipiell die Möglichkeit untersucht werden, auch thermisch sehr labile Substanzen mit diesem System zu applizieren.

## **II.2 Materialien und Methoden**

Viele Substanzen und Methoden, die im vorigen Kapitel Verwendung fanden, wurden auch für die Untersuchungen, die in diesem Kapitel beschrieben werden, benötigt. Deshalb sind hier nur die Substanzen, Gerätschaften oder Methoden aufgeführt, die zusätzlich verwendet wurden.

### **II.2.1 Substanzen**

#### **II.2.1.1 Polymere**

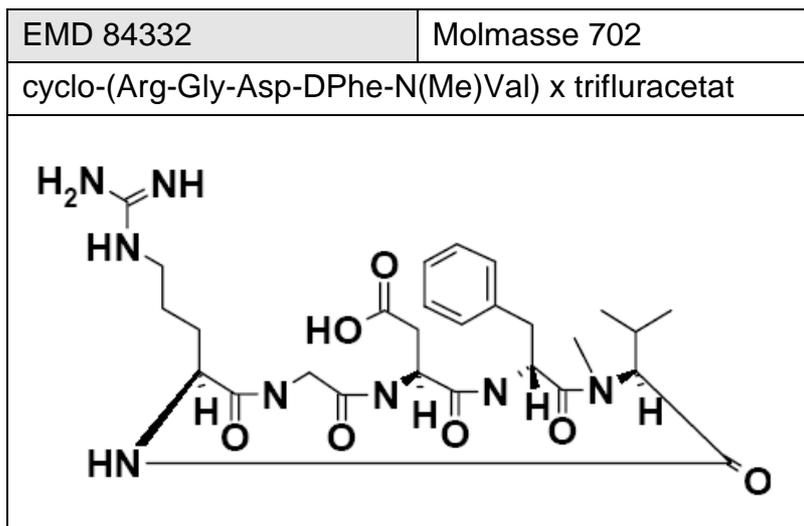
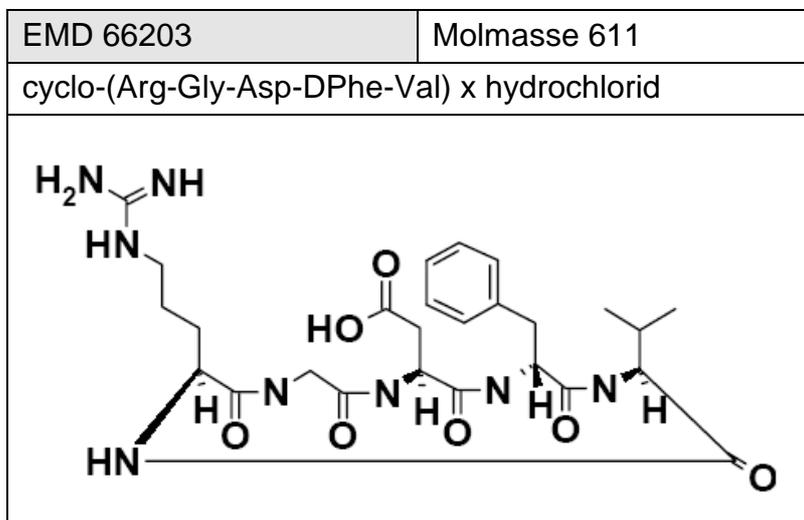
Für die Herstellung der Stäbchen und Presslinge wurden die in Tabelle 10 aufgeführten Polymere verwendet.

Tabelle 10 Verwendete Polymere

Polymer	Charge
GOL-L-1:13	Hfm 94/80
GOL-L-1:9:3	Hfm 95/23
GOL-L-1:18	Hfm 95/63
GOL-DL-1:18	96 Hfm 1

### II.2.1.2 Peptide

Die verwendeten Peptide haben folgende Strukturformel



EMD 121974	Molmasse 588
Peptid identisch mit EMD 84332, jedoch liegt es als inneres Salz vor	

### II.2.1.3 Sonstige Substanzen

**Tabelle 11**    **Verwendete Substanzen**

Substanz	Hersteller
Arginin, lyophilisiert.	Merck KGaA
Glucose	Merck KGaA
Lactose	Merck KGaA

### II.2.2 Geräte

**Tabelle 12**    **Verwendete Geräte**

Gerät	Hersteller
Hydraulik-Pressen HMP 128-84 (Pressdruck 0 - 40 kN)	Ritter AG, Karlsruhe
Materialprüfungsgerät (Pressdruck 0 - 10 kN)	Instron Deutschland GmbH, Darmstadt
Tabletten Presswerkzeug	Weber, Remshalden
Miniatur-Presswerkzeug	Eigenbau Merck KGaA
Teflonschläuche Innendurchmesser 3mm, Außendurchmesser 5mm	Bender & Hobein, Bruchsal

### II.2.3 Methoden

#### II.2.3.1 Analytik der Peptide

Für die Analytik des Peptides stand eine HPLC-Anlage von Merck-Hitachi zur Verfügung und hatte folgende Ausstattung:

Säule:            Lichrospher 100 RP8 (5 $\mu$ ) 125-4

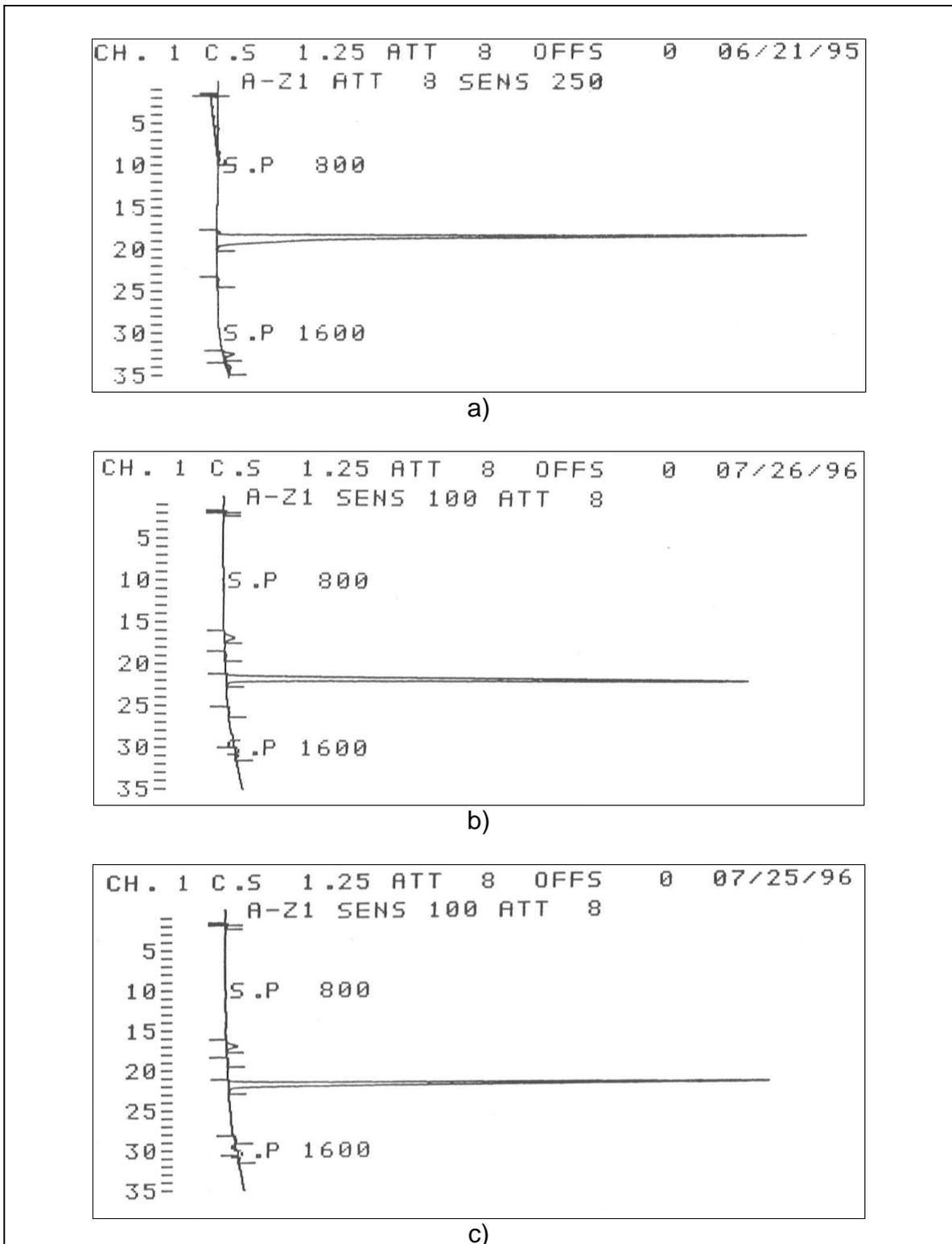
Fließmittel:    A: 0,01 M Phosphatpuffer pH 7,0

                      B: 60% 0,005 M Phosphatpuffer pH 7,0 /40% 2-Propanol

Gradient: 1% - 70% B, 35 min

Fluss: 0,7 ml/min

Detektion: UV 215 nm



**Abbildung 49 HPLC-Chromatogramme der Peptide**

a) EMD 66203    b) EMD 84332    c) EMD 121974

Die Retentionszeit betrug in diesem System für EMD 66203 etwa 18 Minuten, für EMD 84332 und EMD 121974 etwa 22 Minuten. Abbildung 49 zeigt typische Chromatogramme der Substanzen.

### II.2.3.2 Herstellung der Presslinge

Wie bereits erwähnt zeigt dieses Peptid eine für diese Substanzklasse relativ hohe Thermostabilität. Dennoch wäre eine Herstellung der Prüfkörper wie in Kapitel I beschrieben (Aufziehen der Polymerschmelze in Teflonschläuche) mit einer zu hohen thermischen Belastung verbunden. Aus diesem Grunde schien hier das Verpressen [103] eines Polymer/Wirkstoffgemisches die geeignetste Herstellungsmethode zu sein. Um in der Formgebung der Prüfkörper etwas flexibler zu sein, wurde das Polymer/Wirkstoffgemisch in zwei unterschiedlichen Verfahren verpresst:

- a) in einer Tablettenpresse
- b) in Teflonschläuchen

Für beide Varianten wurde das Polymer in der Schlagbalkenmühle gemahlen und mittels Analysensieben klassiert, so dass die Korngröße zwischen 125  $\mu\text{m}$  und 250  $\mu\text{m}$  lag. Hierzu wurde der zu untersuchende Hilfs- oder Wirkstoff eingemischt wie es schon in Kapitel I.2.3.3 beschrieben wurde.

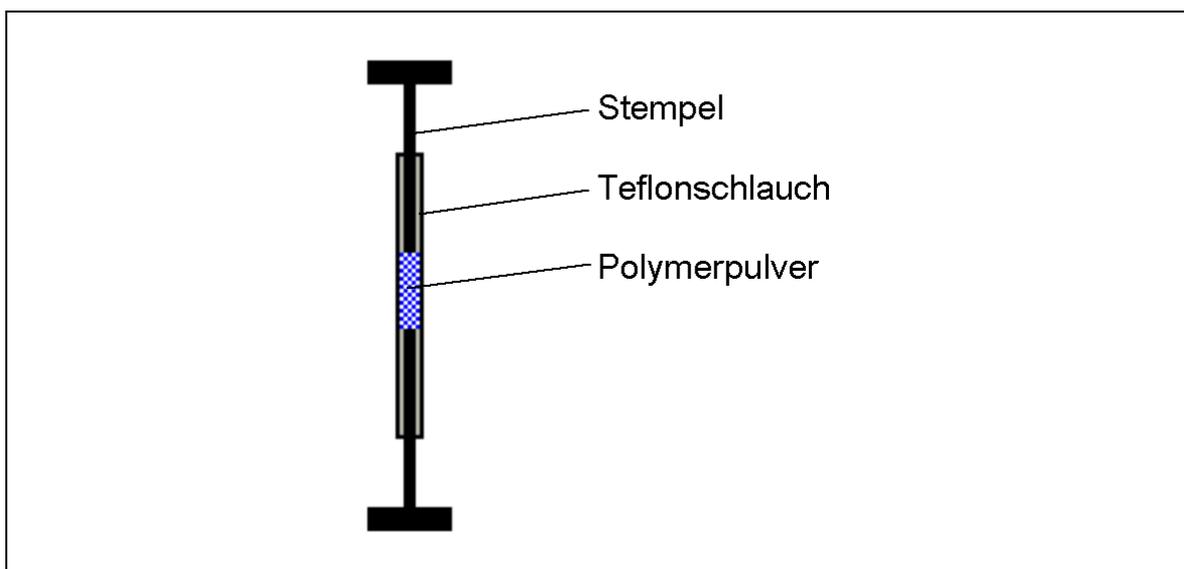
Zur Herstellung von Polymertabletten wurde das Polymer/Wirkstoffgemisch eingewogen und in die **Tablettenpresse** (Abbildung 50a) überführt. Verpresst wurde entweder in einer Hydraulikpresse mit Druckanzeige oder in einem Materialprüfungsgerät. Letzteres hatte den Vorteil, dass der Pressdruck sehr exakt vorgegeben werden konnte. Die so erhaltenen Tabletten hatten einen Durchmesser von 10 mm und die Steghöhe betrug etwa 1 bis 2 mm in Abhängigkeit von der Füllmenge der Tablettenpresse. Wurde wirkstofffreies Polymerpulver verpresst, erhielt man glasklare Tabletten (Abbildung 50b).



**Abbildung 50 a) Tablettenpresswerkzeug b) Wirkstofffreie Polymertablette**

Um Polymerstäbchen zu erhalten, wurde das Polymer/Wirkstoffgemisch in einen **Teflonschlauch** gefüllt und bei 50°C für 30 s in einen Wärmeschrank gelegt. Anschließend wurden an beiden Enden des Teflonschlauches die Stempel eingeführt, die gesamte Anordnung (Abbildung 51) in eine Hydraulikpresse gestellt und für etwa 30 s einem geringen Druck ausgesetzt.

Man erhielt so Stäbchen mit einer Länge von etwa 1 cm und einem Durchmesser von 3 mm. Auch hier wurden mit reinem, wirkstofffreiem Polymer glasklare Stäbchen erhalten.



**Abbildung 51 Stempelwerkzeug zur Herstellung der Polymerstäbchen**

### II.2.3.3 Wasseraufnahme und Degradation

Beim Einlegen der Prüfkörper in Wasser laufen zwei Prozesse ab, die einen Einfluss auf das Gewicht des Prüfkörpers haben. Zum einen ist dies die Wasseraufnahme ins Innere des Körpers, zum anderen das Herauslösen von Degradationsprodukten und wasserlöslichen Bestandteilen. Beide Prozesse überlagern sich und ergeben ihrem zeitlichen Verlauf eine Resultante, die über die Eigenschaften eines Freigabesystems Informationen liefern kann.

Für diese Untersuchung wurden die Prüfkörper genau gewogen und in Rollrandgläschen gelegt. Dann wurden 20 ml auf 37°C vortemperierter Puffer hinzugefügt. Die Lagerung erfolgte bei 37°C, wobei die Gläschen einmal täglich vorsichtig umgeschüttelt wurden. Zu jedem Prüfzeitpunkt wurden die Prüfkörper entnommen und das oberflächlich anhaftende Wasser mit einem nicht fuselnden Tuch vorsichtig entfernt. Nach dem Wiegen ( $G_e$ ) wurden die Prüfkörper in das Medium zurückgegeben.

Die Gewichtszu- bzw. abnahme wurde nach Gleichung 5 berechnet.

$$GV[\%] = \frac{(G_e - G_a) * 100}{G_a}$$

#### Gleichung 5 Berechnung der prozentualen Wasseraufnahme

GV: Gewichtsverlauf  $G_a$ : Anfangsgewicht  $G_e$ : Gewicht nach Entnahme

## II.3 Ergebnisse und Diskussion

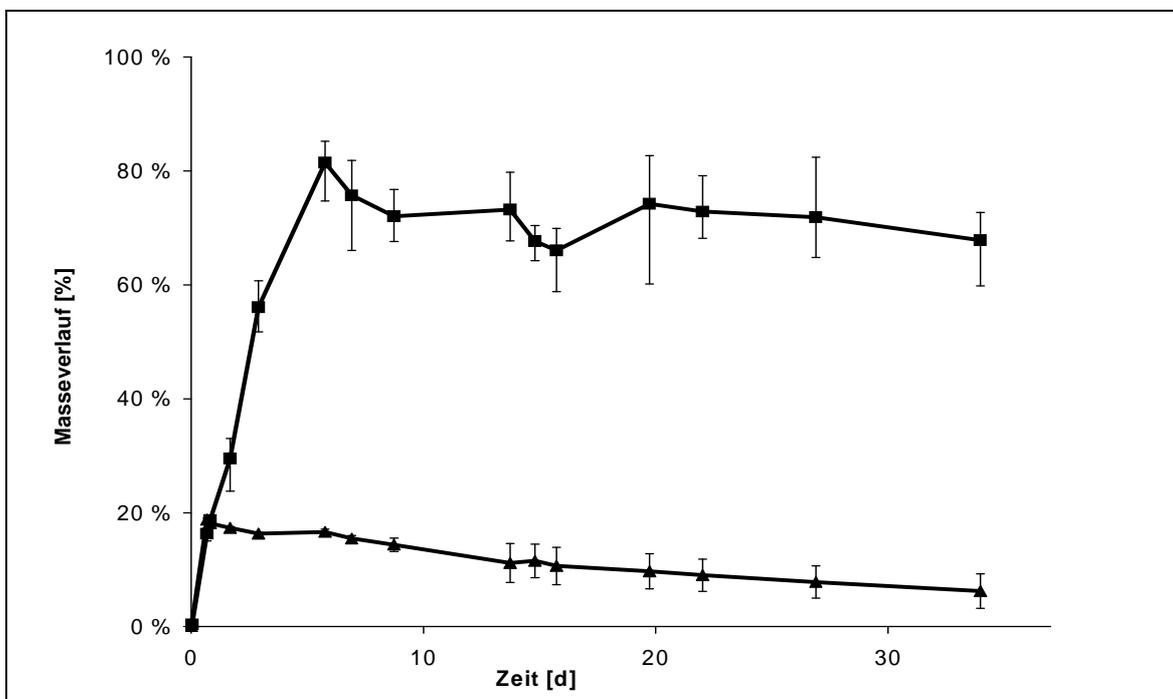
### II.3.1 Wirkstofffreie Prüfkörper

#### II.3.1.1 Polymerstäbchen

Die Untersuchungen begannen mit stäbchenförmigen Prüfkörpern ohne Wirkstoff. Es wurde das unterschiedliche Verhalten von Polymeren auf Basis von L- bzw. DL-Lactiden untersucht. Abbildung 52 zeigt den unterschiedlichen Gewichtsverlauf von Polymerstäbchen aus GOL-L-1:18 bzw. GOL-DL-1:18.

Zwei Dinge fallen hier besonders auf: Zum einen nimmt das Gewicht des DL-Polymer-Stäbchens nach kurzer Zeit (etwa 5 Tagen) um 80% zu. Dies ist deutlich mehr, als bei dem L-Polymer-Stäbchen, welches nur eine Zunahme von 20% zeigt.

Zum anderen werden hier die beiden sich überlagernden Prozesse – Wasseraufnahme einerseits und Abgabe von wasserlöslichen Degradationsprodukten andererseits – deutlich sichtbar. Nach einem frühen Maximum (1 bzw. 5 Tage) nimmt das Gewicht der Prüfkörper wieder linear ab. Dies kann als Anzeichen für die abgeschlossene Quellung und die beginnende Degradation betrachtet werden.



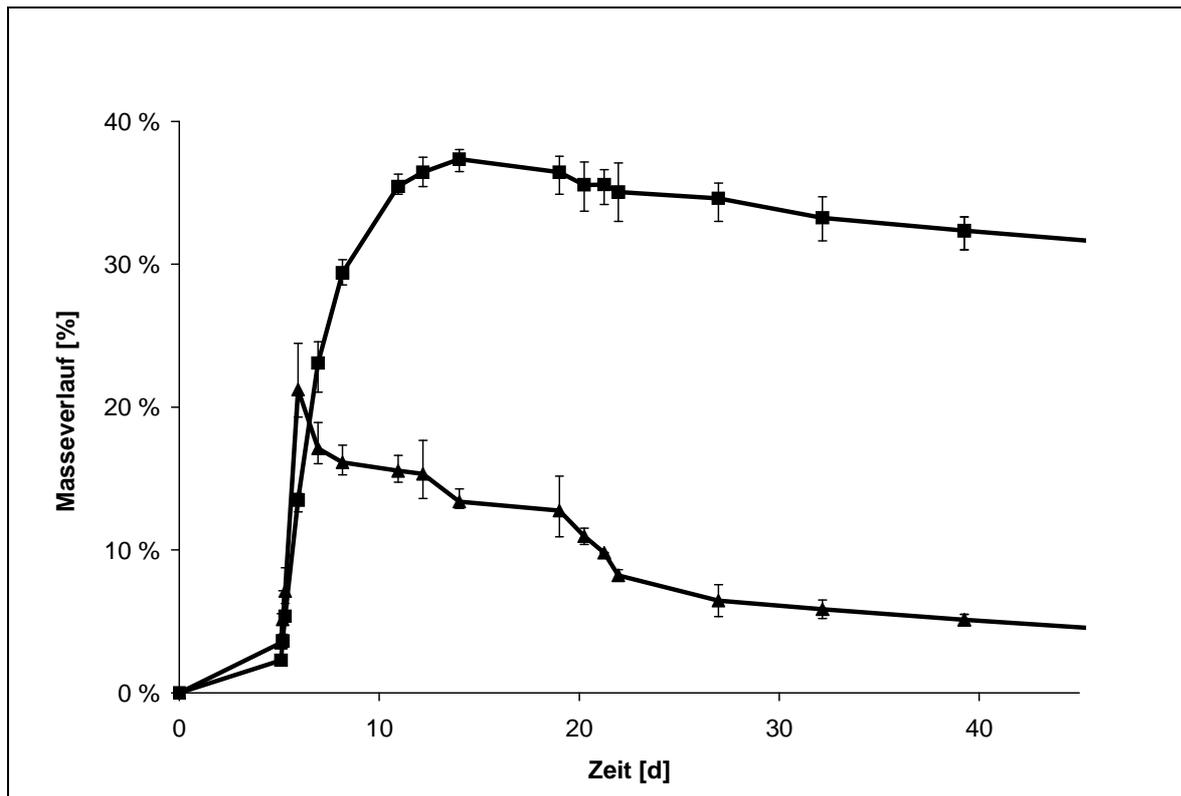
**Abbildung 52 Einfluss der Stereoisomerie auf den Gewichtsverlauf bei Polymerstäbchen**

▲ : GOL-L-1:18

■ : GOL-DL-1:18

Eine Möglichkeit, die Wasseraufnahme in den Prüfkörpern zu erhöhen, ist die Zugabe von wasserlöslichen Stoffen, die nach ihrem Herauslösen Poren hinterlassen. Diese Vergrößerung der inneren Oberfläche führt zu einem höheren Wasseranteil im Polymer. Ein inkorporierter Wirkstoff würde so schneller und in größerem Ausmaß nach außen gelangen können.

Abbildung 53 zeigt Stäbchen aus GOL-L-1:18 mit und ohne Arginin als Porenbildner. Der Effekt ist deutlich zu sehen. Die Gewichtszunahme der Stäbchen steigt von 20% im Maximum auf knapp 40% beim argininhaltigen Stäbchen an. Ist der Einfluss auf die Wasseraufnahme noch sehr deutlich, erkennt man bei der Masseabnahme im weiteren Verlauf der Untersuchung kaum einen Unterschied zwischen den unterschiedlichen Stäbchen. Die Kurven fallen annähernd parallel ab.



**Abbildung 53** Masseverlauf bei GOL-L-1:18 Stäbchen mit und ohne Arginin

▲ : ohne Arginin

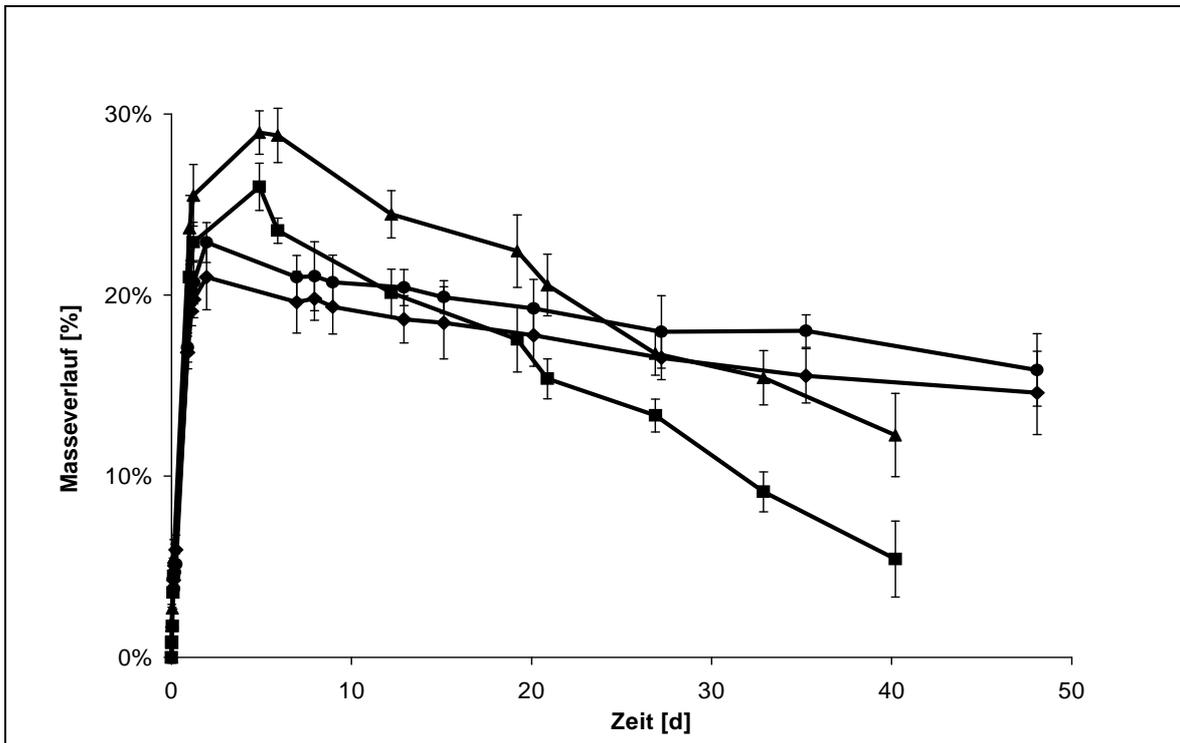
■ : mit 5% Arginin

### II.3.1.2 Polymer-Tabletten

Das Verpressen des Polymerpulvers ist mit dem Kompaktieren von Pulvern, wie es üblicherweise in der Tablettenherstellung stattfindet, nicht unmittelbar vergleichbar. Während es bei der Tablettierung von Pulvern zu Verzahnungen an den Grenzflächen der Pulverkörner kommt und auf diese Weise ein Zusammenhalten erreicht wird, spielen beim Verpressen der hier behandelten Polymerpulver noch andere Prozesse eine Rolle. Das glasklare Aussehen der Polymertabletten lässt erkennen, dass die Grenzen zwischen den einzelnen Pulverkörnern beim Verpressen insoweit aufgehoben werden, dass durchscheinendes Licht nicht mehr gebrochen wird. Das Pulver fließt zu einem kompakten Formkörper zusammen.

Es stellte sich nun die Frage, in wie weit der Pressdruck auf die Wasseraufnahmefähigkeit einen Einfluss hat. Um dies zu untersuchen, wurden vier unterschiedliche Serien von Formkörpern aus GOL-L-1:18 hergestellt, bei deren Verpressung der Pressdruck variiert wurde. In Abbildung 54 lassen sich zwei Gruppen unterscheiden. Die eine Gruppe von Tabletten (Gruppe I) wurde mit

einem relativ geringen Pressdruck in Höhe von 2 und 5 kN hergestellt. Gruppe II wurde bei einem deutlich höheren Druck von 30 bzw. 40 kN verpresst.

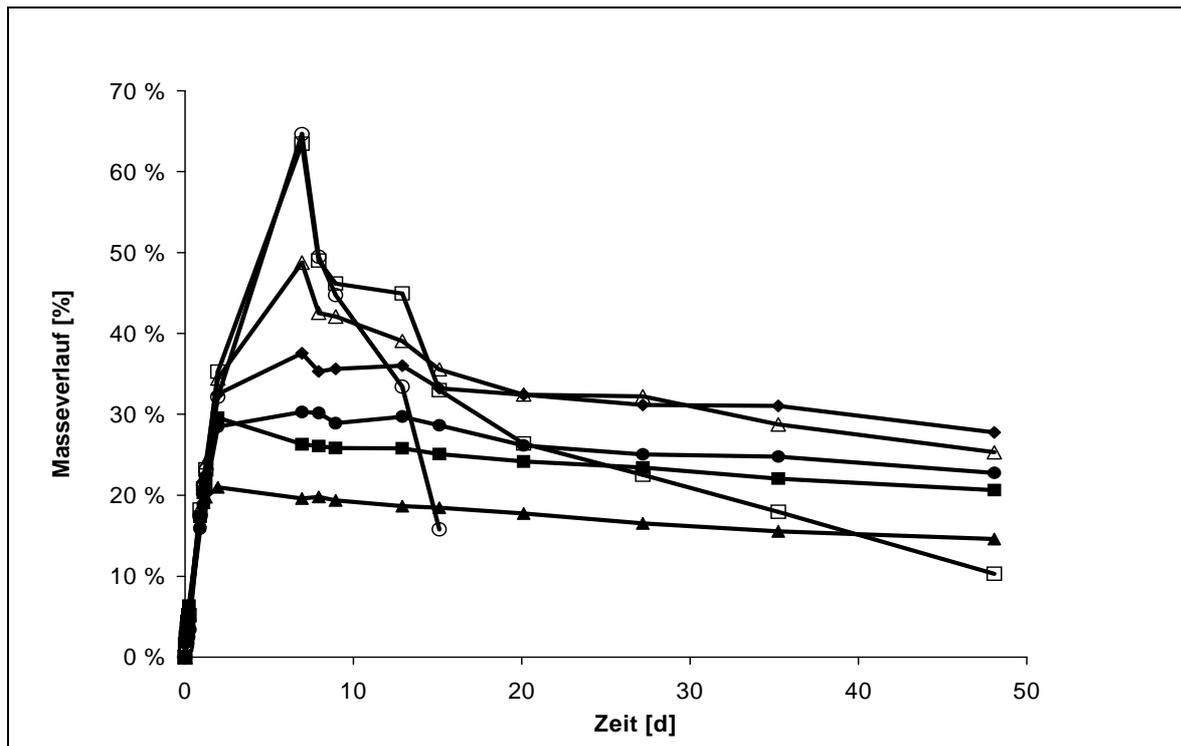


**Abbildung 54 Einfluss des Pressdruckes auf den Masseverlust bei der Quellung von Polymertabletten**

▲ : Pressdruck 2 kN                      ■ : Pressdruck 5 kN,  
● : Pressdruck 30 kN                     ◆ : Pressdruck 40 kN

Während die Unterschiede zu Beginn, bezüglich der Wasseraufnahme sowohl innerhalb, als auch zwischen diesen Gruppen vergleichsweise gering waren (<5%), unterschieden sich die Gruppen nach Abschluss der initialen Phase in ihrem Gewichtsverlauf.

Die Masseabnahme verläuft innerhalb der Gruppen parallel, wobei die Proben der Gruppe I schneller an Masse verlieren, als die der Gruppe II. Der höhere Pressdruck scheint die Tabletten so stark zu komprimieren, dass die Wasseraufnahme erschwert ist und damit das Herausdiffundieren der Degradationsprodukte verzögert ist. Insgesamt ist dieser Effekt aber nicht stark ausgeprägt.



**Abbildung 55 Einfluss der Stereoisomerie auf den Masseverlauf, Polymertabletten aus GOL-1:18**

- |                     |                    |
|---------------------|--------------------|
| ▲ : DL-Anteil: 0%   | ■ : DL-Anteil: 10% |
| ● : DL-Anteil: 20%  | ◆ : DL-Anteil: 30% |
| △ : DL-Anteil: 50%  | □ : DL-Anteil: 66% |
| ○ : DL-Anteil: 100% |                    |

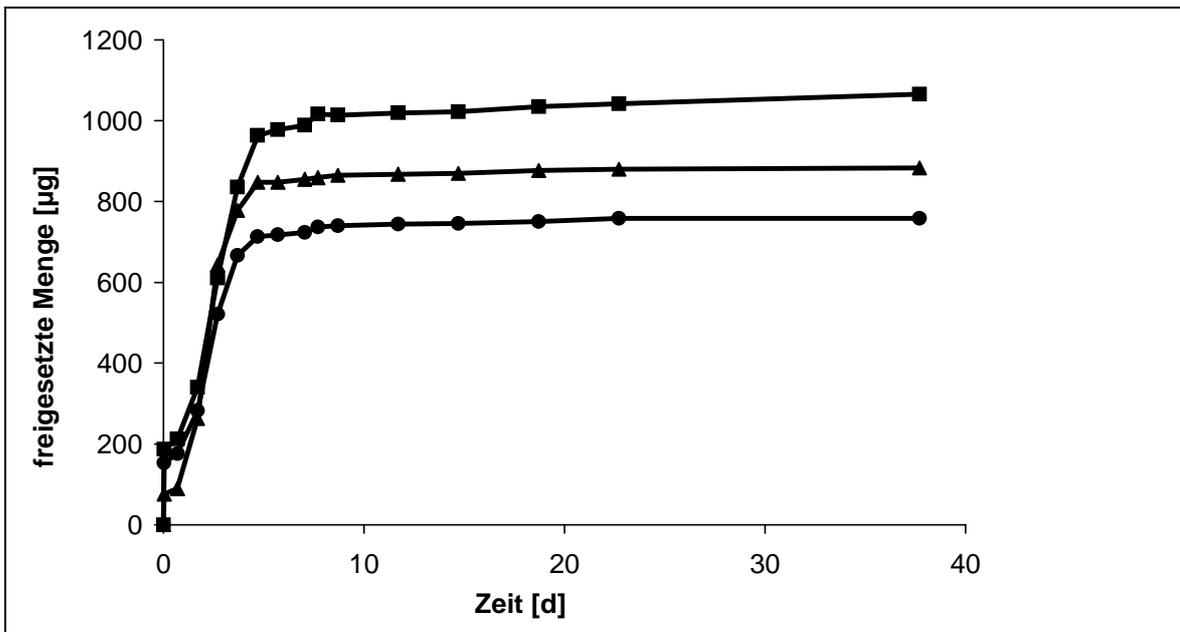
Während bei den Polymerstäbchen nur die Extrema der möglichen Variabilität – nämlich die reine L- bzw. DL-Form – untersucht wurden, kamen bei den Polymertabletten auch verschiedene Mischungen zwischen den reinen Formen zur Untersuchung. Die Ergebnisse in Abbildung 55 zeigen, dass ein zunehmender DL-Gehalt die Wasseraufnahme begünstigt, und dass durch entsprechende Wahl des L/DL-Verhältnisses die Wasseraufnahmefähigkeit eingestellt werden kann.

## II.3.2 Arzneistofffreisetzung

### II.3.2.1 Polymerstäbchen

Die ersten Freisetzungsversuche mit den Peptiden wurden an Polymerstäbchen aus GOL-L-1:18 durchgeführt. Es galt, einen ersten Eindruck über das Freisetzungsverhalten zu bekommen. Es wurde mit relativ niedrigen Beladungsraten gearbeitet, da – wie erwähnt – das Peptid nur in begrenztem Umfang zur Verfügung stand. Es wurde deshalb durch Zugabe eines Porenbildners – in diesem Fall Lactose – versucht, die Freisetzung zu verbessern. Aus

Abbildung 56 ist ersichtlich, dass dies nur in geringem Umfang gelang. Ausgehend von der mittleren Kurve (5% Beladung, kein Porenbildner) erbrachte die Zugabe von 7% Lactose eine Steigerung der freigesetzten Menge nach 10 Tagen von immerhin 15%. Der Versuch, durch weitere Zugabe von Lactose Peptid einzusparen, misslang. Bei einer Beladung von 4% EMD 66203 und 17% Lactose lag die Freisetzung nach 10 Tagen etwa 10% unter der der Stäbchen mit 5% ohne Lactose-Zusatz.



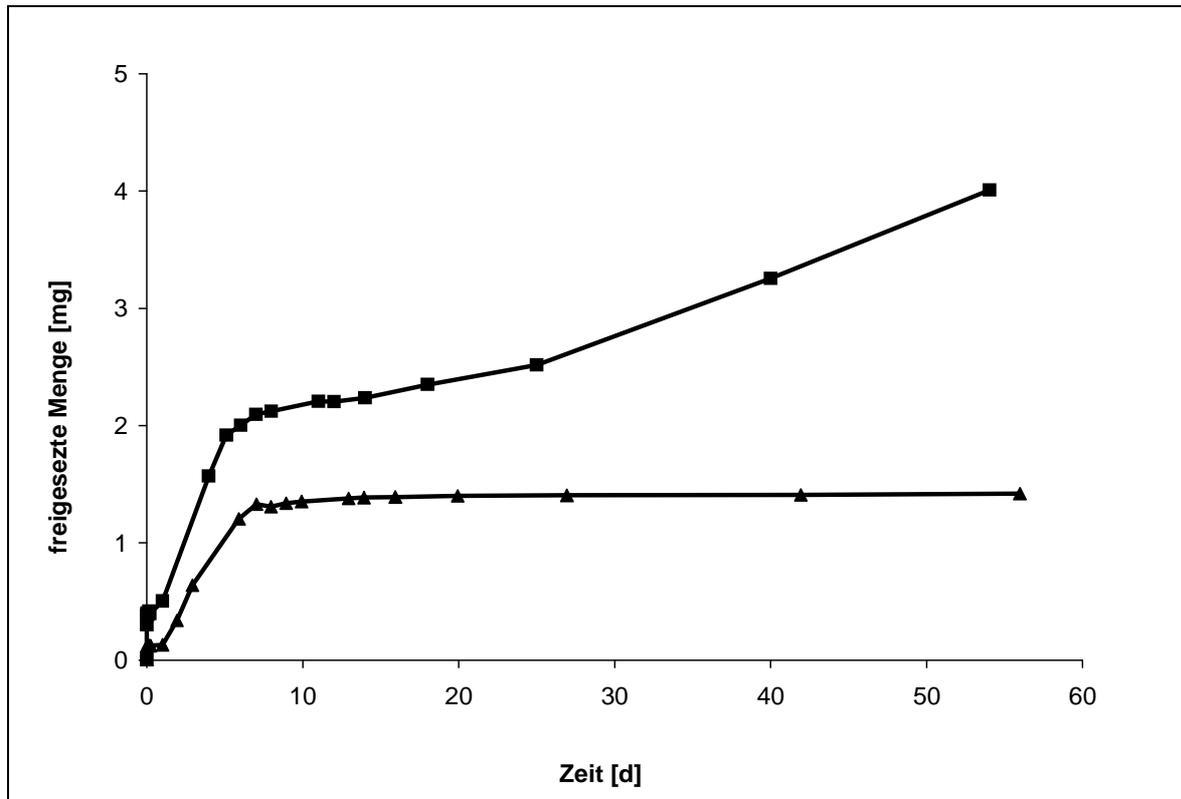
**Abbildung 56 Freisetzung von EMD 66203 aus GOL-L-1:18 Stäbchen 2% und 5%**

▲ : 5% ohne Zusatz  
 ■ : 5% + 7% Lactose-Zusatz  
 ● : 4% + 17% Lactose-Zusatz

In einem weiteren Versuch wurde, um die Freisetzung zu erhöhen, ein Polymer mit niedrigerer Molmasse verwendet. Zum Einsatz kam ein GOL-L-1:13, an dem zwei Dosierungen untersucht wurden. Abbildung 57 zeigt das Ergebnis. Erwartungsgemäß liegt die Freisetzung bei den Stäbchen mit der 5%igen Beladung über der der 2%igen. Auffällig ist, dass nach etwa 10 Tagen aus den Stäbchen der niedrigeren Beladung kaum mehr etwas freigesetzt wird, die höher beladenen hingegen geben kontinuierlich das Peptid ab. Dies kann dahingehend gedeutet werden, dass das Peptid selbst seine eigene Freisetzung durch Porenbildung erleichtert. Dieser Effekt ist um so deutlicher, je höher die Beladung des Polymers mit wasserlöslichen Substanzen ist.

Vergleicht man die Freisetzung aus GOL-L-1:13 Stäbchen (Abbildung 57) mit der aus GOL-L-1:18 Stäbchen (Abbildung 56) bei jeweils 5%iger Beladung ohne

Zusatzstoffe, fällt auf, dass das niedermolekulare Polymer nach 10 Tagen etwa doppelt so viel Peptid freigesetzt hat.



**Abbildung 57 Freisetzung von EMD 66203 aus GOL-L-1:13 Stäbchen 2% und 5%**

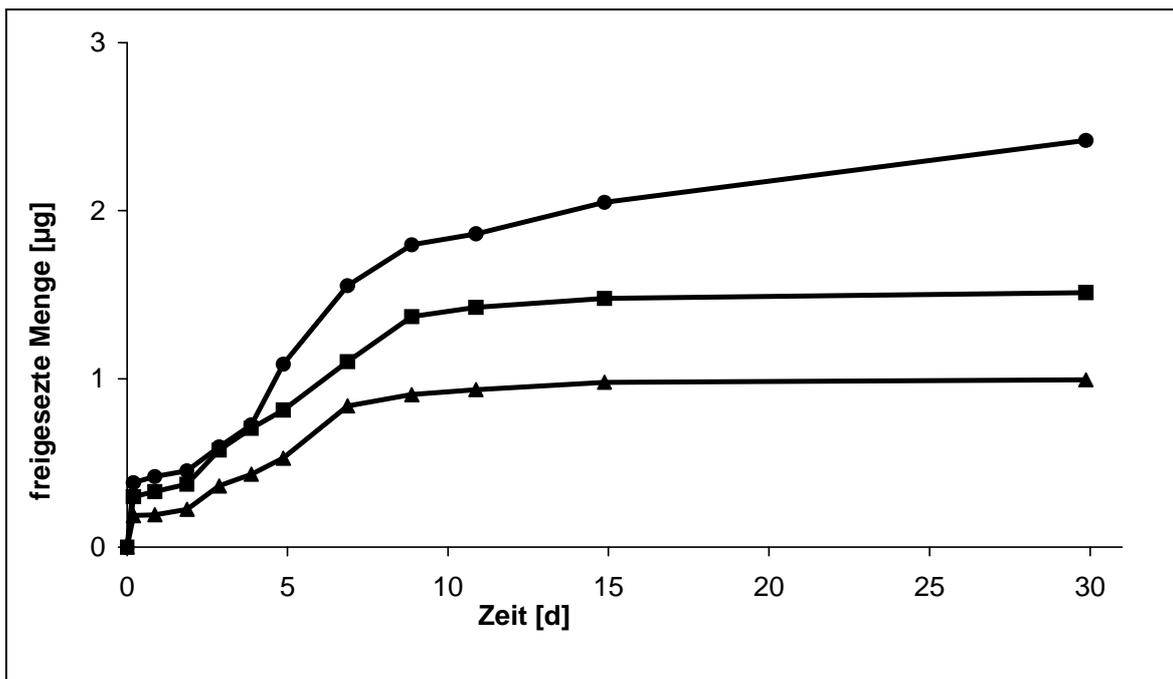
▲ : 2% EMD 66203

■ : 5% EMD 66203

Die Wahl eines niedermolekularen Polymers schien ein geeigneter Weg zu sein, die Freisetzung bei gleicher Beladungsrate zu erhöhen. Nun wurde versucht, durch die Wahl eines hydrophileren Polymers die Peptidabgabe weiter zu verbessern. Anstelle des reinen Lactid-Polymers wurde im folgenden Versuch ein GOLG-L-1:9:3 verwendet.

Abbildung 58 zeigt jedoch, dass die Freisetzung aus einem Co-Glycolid-Polymer gegenüber einem reinen Lactid-Polymer gleicher Molmasse schlechter zu sein scheint. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass das Peptid eine größere Affinität zu hydrophilen Polymeren hat.

Durch Zugabe von Lactose konnte auch hier erwartungsgemäß die Freigabe verbessert werden. Auch die Erhöhung der Beladungsrate von 5% auf 9% zeigte eine deutliche Verbesserung.



**Abbildung 58 Freisetzung von EMD 66203 aus GOL-L-1:9:3**

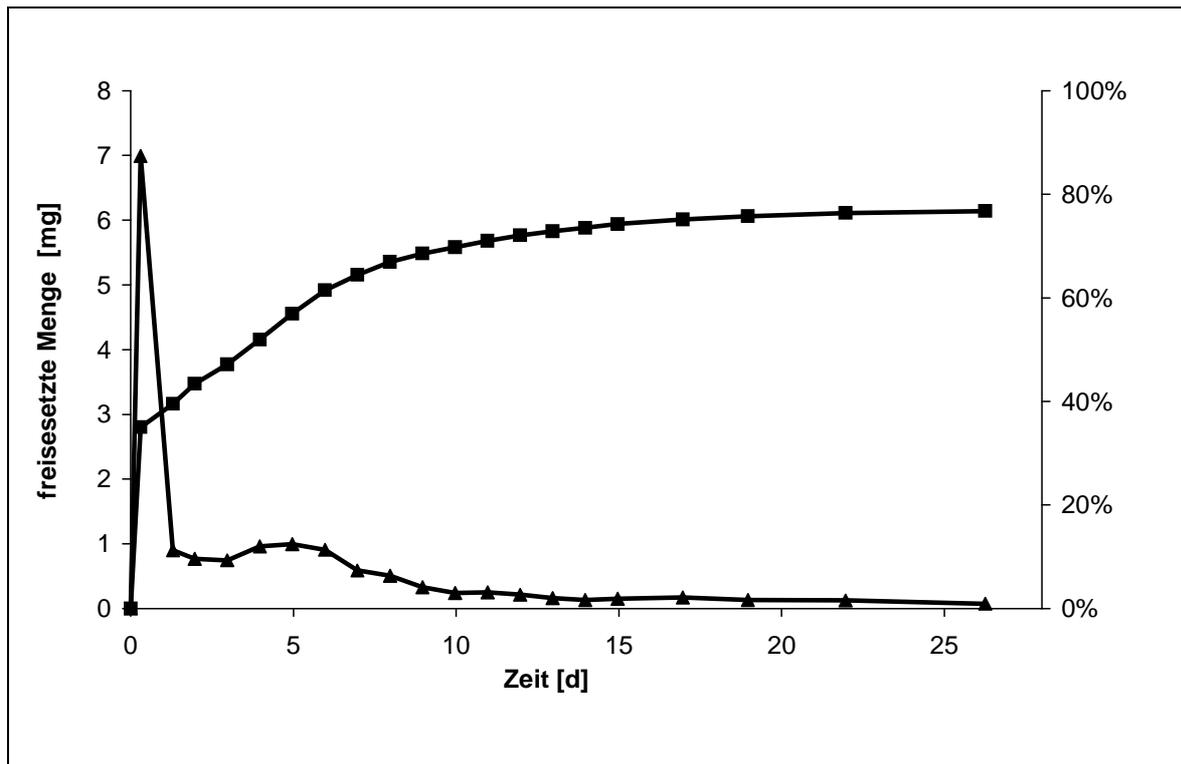
▲ : 5% EMD 66203

■ : 5% EMD 66203 + 9% Lactose

● : 9% EMD 66203

Wie eingangs erwähnt, bestanden klare Vorgaben für die Freisetzungskinetik des für das Tiermodell zu entwickelnden Systems. Diese lagen bezüglich der Dosis in den ersten Tagen deutlich über dem, was bisher erreicht werden konnte. Deshalb wurden nun Stäbchen untersucht, die eine deutlich höhere Beladung als die bisher untersuchten hatten. Außerdem wurde wieder das GOL-L-1:18 mit seiner höheren Molmasse verwendet. Dies wurde notwendig, da die Formkörper aus GOL-L-1:13 oder GOL-L-1:9:3 bei 37°C zu weich wurden und ihre Form verloren. Was im in-vitro Versuch mit seinen standardisierten Bedingungen noch zu akzeptieren war, wäre im Tierversuch nicht mehr reproduzierbar gewesen. Das Implantat wäre nach kurzer Zeit unter der Haut des Tieres zerrieben worden und eine kontrollierte Freisetzung wäre nicht mehr möglich gewesen.

Abbildung 59 zeigt die Freisetzung von EMD 66203 aus einem GOL-L-1:18 mit 20%iger Beladung. Zum einen ist eine deutlich höhere Wirkstoffmenge zu Beginn der Freisetzung festzustellen, zum anderen erfolgt die Abgabe von EMD 66203 in viel größerem Umfang. Werden in dem vorigen Versuch maximal 50% des enthaltenen Wirkstoffes freigesetzt, sind es hier knapp 80%. Der hohe Anteil an leicht wasserlöslichem Wirkstoff führt bei der Elution zur Bildung von Poren in der Polymermatrix, infolgedessen das weitere Herauslösen von Wirkstoff aus dem Inneren des Polymerstäbchens erleichtert wird.



**Abbildung 59 Freisetzung von EMD 66203 aus GOL-L-1:18 Stäbchen 20%**

▲ : fraktionierte Darstellung

■ : prozentuale, kumulierte Darstellung

### II.3.2.2 Polymertabletten

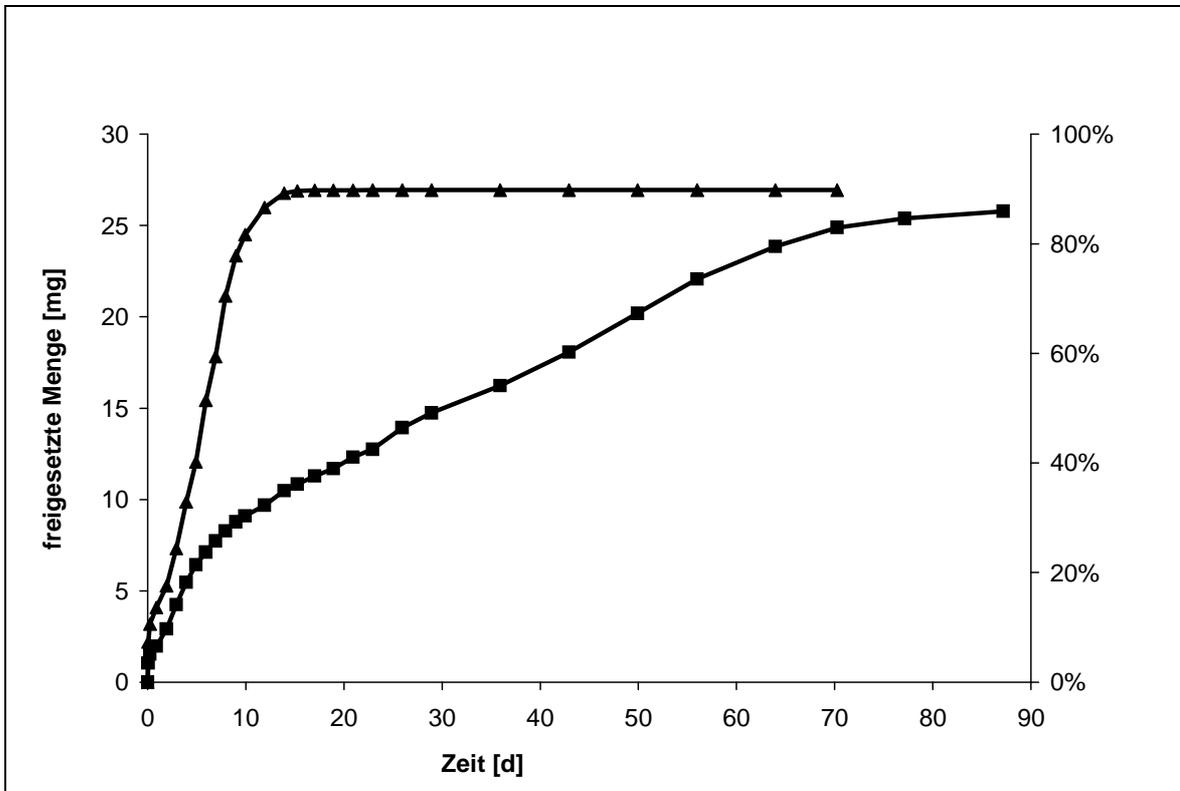
Mit einer Beladungsrate von 20% lag man bei den Polymerstäbchen an der Obergrenze der mechanischen Stabilität. Es waren also keine höheren Dosierungen möglich, da eine einfache Verlängerung der Stäbchen – was eine simple Möglichkeit der Dosiserhöhung wäre – ebenfalls aus mechanischen Gründen nicht möglich war. Bei Stäbchenlängen von deutlich mehr als 10 mm lieferte das Herstellungsverfahren inhomogene Stäbchen. Reichte der Druck an den Rändern aus, um ein klares Stäbchen zu bekommen, zeigten sich in der Stäbchenmitte noch Polymerpulveranteile.

Deshalb wurden nun Polymertabletten mit EMD 66203 hergestellt, die durch ihr höheres Gewicht absolut betrachtet mehr Peptid aufnehmen konnten. Während die Stäbchen üblicherweise eine Masse von etwa 100 mg besaßen, lag das Gewicht der Polymertabletten bei 150 mg - 200 mg.

Im Folgenden wurden Polymertabletten mit einer Beladung von 15% untersucht. Als Polymere wurde einerseits reines GOL-L-1:18 verwendet, andererseits ein Gemisch von GOL-L-1:18 / GOL-DL-1:18 im Verhältnis 66:33.

In Abbildung 60 zeigt sich das grundsätzlich unterschiedliche Freisetzungsprofil. Ist bei dem reinen L-Polymer nach etwa 12 Tagen die Freisetzung

abgeschlossen, wird das Peptid bei dem DL-Polymer über einen Zeitraum von über 80 Tagen kontinuierlich abgegeben. Beide erreichen eine beinahe vollständige Freisetzung des inkorporierten Wirkstoffes.



**Abbildung 60 Peptid-Freisetzung aus GOL-L-1:18 / GOL-DL-1:18-Tabletten unterschiedlicher Zusammensetzung; 15%ige Beladung**

▲: GOL-L-1:18

■: GOL-L-1:18 / GOL-DL-1:18 66:33

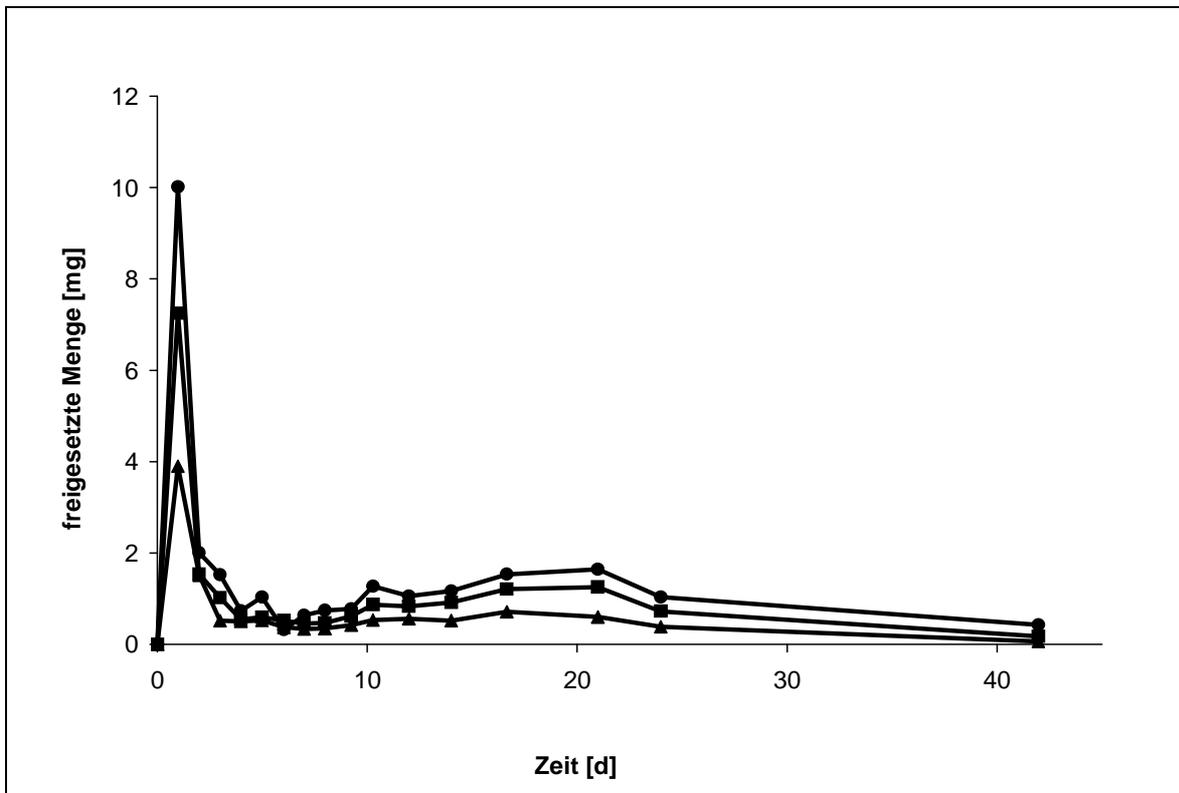
### II.3.2.3 Freisetzungsprofil der Prüfkörper

Auf Basis der Kenntnisse über die Polymere und das Freisetzungverhalten der Peptide zur damaligen Zeit wurden nun für den Implantationsversuch Polymer-tabletten hergestellt. Für diesen Zweck schien das GOL-L-1:18 das geeignetste Polymer zu sein. Es war bei 37°C über lange Zeit formstabil und zeigte eine hohe initiale Freisetzung.

Als Beladungsraten wurden 15%, 20% und 25% gewählt. Im Gegensatz zu den Polymerstäbchen war hier eine Beladungsrate von mehr als 20% möglich, da die Tablettenform an sich eine größere mechanische Stabilität aufweist.

Abbildung 61 zeigt die Freisetzungsprofile dieser Tabletten in fraktionierter Darstellung. In Abhängigkeit von der Beladungsrate werden am ersten Tag sehr hohe Dosen an EMD 66203 erreicht, die zum dritten Tag hin recht schnell abfallen. Nach einer kurzen Phase recht niedriger Freisetzung steigt die Abgabe

- wiederum abhängig von der Beladungsrate - leicht an, um nach etwa 3 Wochen wieder abzusinken.

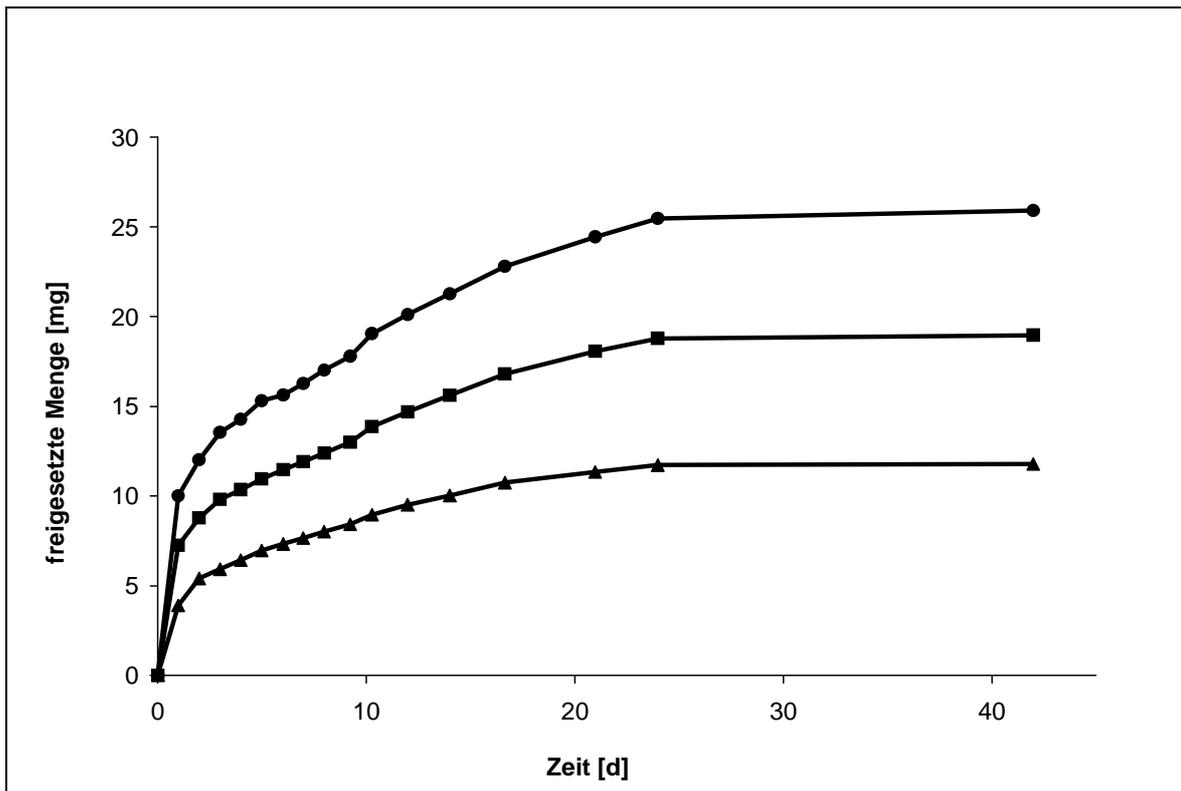


**Abbildung 61 Freisetzung von EMD 66203 GOL-L-1:18 Tabletten, fraktionierte Darstellung**

▲ : 15% EMD 66203                      ■ : 20% EMD 66203  
● : 25% EMD 66203

In Abbildung 62 sind dieselben Freisetzungprofile in kumulierter Darstellung zu sehen. Hier wird noch einmal die hohe Freisetzung zu Beginn und die gleichmäßig niedrige Abgabe im weiteren Verlauf deutlich.

Dieses Profil schien geeignet für die geplanten Tierversuche, weil innerhalb des ersten Tages eine Abgabe von etwa 5 mg bis 10 mg des Peptides erfolgte und sich daran eine kontinuierliche Freisetzung bis etwa zum zwanzigsten Tag anschloss.



**Abbildung 62 Freisetzung von EMD 66 203 GOL-L-1:18 Tabletten, kumulative Darstellung**

▲ : 15%  
● : 25%

■ : 20%

## II.4 Zusammenfassung

Es wurde deutlich, dass die bisher verwendeten Polymerstäbchen für eine solche Anwendung nicht geeignet waren. Sie boten der zur Applikation notwendigen Menge an Peptid eine zu geringe Menge an Polymermatrix, was zu einer hohen Beladungsrate führte. Die Folge war ein mechanisch instabiles System, das nach Implantation zerbrechen könnte und so den Wirkstoff unkontrolliert freisetzen würde. Aus diesem Grund wurde ein Verpressungsverfahren gewählt, um Tabletten beziehungsweise stäbchenförmige Presslinge als Applikationssystem zu erhalten. Für beide Varianten wurde das Polymer gemahlen, die zu untersuchenden Hilfs- oder Wirkstoffe eingemischt und dann verpresst.

Es hat sich bei den Untersuchungen gezeigt, dass eine gleichmäßige Freisetzung über mehrere Tage mit diesen resorbierbaren Trägersystemen nicht ohne weiteres möglich war, da sich zweiphasige Verläufe in der Freisetzung zeigten.

Im ersten Teil des zweiphasigen Verlaufs wurde eine große Menge des Wirkstoffes zusammen mit der niedermolekularen Komponente ausgespült. In der zweiten Phase wurde der Wirkstoff im Zuge der Degradation der höhermolekularen Komponente langsam freigesetzt.

Während der Einfluss des Pressdruckes bei Erstellen der Prüfkörper eher von untergeordneter Bedeutung für die Freisetzung war, erhöhte die Zumischung von leicht wasserlöslichen Substanzen oder die Verwendung von hydrophileren Polymeren (DL-Lactide anstelle von reinen L-Lactiden) die Freisetzung des Peptides deutlich.

Mit Tabletten dieser Zusammensetzung wurden zunächst orientierende Implantationsversuche durchgeführt, die aber zeigten, dass die verwendeten Polymere zu langsam resorbierten und teilweise zu lokalen Reizungen bei den Mäusen führten. Es wurde von einer weiteren Entwicklung abgesehen.

## **Thema III**

Halbfeste Zubereitungen aus  
bioresorbierbaren Polyestern



### III.1 Einführung

Die Applikation von festen Arzneimitteldepots in Form von Stäbchen oder Tabletten erfolgt subcutan oder im Verlauf von chirurgischen Eingriffen durch Einbringen in den OP-Situs. Im Falle von sehr dünnen Stäbchen ist die subcutane Applikation mittels eines Trokars, einer im Prinzip etwas vergrößerten Injektionsnadel, noch relativ leicht möglich. Haben die Systeme etwas größere Ausmaße, erfolgt die Applikation durch einen minimalinvasiven Eingriff. Die Anwendung mikropartikulärer Systeme hat hier einen deutlichen Vorteil, da mit üblichen Injektionsnadeln appliziert werden kann, jedoch sind die verabreichbaren Dosen sehr gering und deshalb nur für hochwirksame Substanzen wie Hormone geeignet. Außerdem haben mikropartikuläre Systeme den Nachteil, dass sie bei auftretenden Nebenwirkungen nicht mehr entfernt werden können.

Injizierbare, halbfeste Applikationssysteme [104, 105, 106, 107] nehmen in diesem Zusammenhang eine Zwischenstellung ein. Sie sind leicht durch eine etwas dickere Kanüle zu injizieren, bilden aber dann in der Subcutis ein weiches, aber zusammenhängendes Depot. Solche Systeme lassen sich auch zur lokalen Applikation von Wirkstoffdepots im Verlauf von Operationen einsetzen [108].

Da sich die in dieser Arbeit untersuchten Polymere durch eine gute Einstellbarkeit der Molmasse auszeichnen, war es möglich, halbfeste Polymersysteme zu erhalten. Es wäre nun die direkte Synthese eines Materials mit gewünschter, niedriger Viskosität denkbar [109]. Eine solche Substanz wäre allerdings wasserlöslich und eine retardierte Abgabe eines Wirkstoffes wäre nur für eine sehr kurze Zeit zu erreichen.

Um nun dennoch zu einem Material mit gewünschter Viskosität zu gelangen, wurden zwei Polymere mit sehr unterschiedlichen Molmassen gemischt. Das niedermolekulare Polymer dient in einem solchen System als Weichmacher, der Depoteffekt wird durch das höhermolekulare Polymer erreicht.

## III.2 Materialien und Methoden

### III.2.1 Substanzen

Wie schon in Kapitel II fanden auch hier viele Substanzen und Methoden der vorigen beiden Kapitel Verwendung. Deshalb werden wiederum nur die Substanzen, Gerätschaften oder Methoden aufgeführt, die zusätzlich verwendet wurden.

#### III.2.1.1 Polymere

Erstmals werden hier Polymere verwendet, die als Alkoholkomponente nicht das Glycerin enthalten. Es wurde ersetzt durch das Ethylenglycol bzw. 1,2-Propandiol. Tabelle 13 zeigt die verwendeten Polymere.

**Tabelle 13**    **Verwendete Polymere**

<b>Polymer</b>	<b>Charge</b>
GOL-DL-1:0,5	96/Da/661
GOL-L-1:1	Hfm 94/83
GOL-L-1:3	Hfm 94/9
GOL-DL-1:1:3	95/Hfm/52
GOL-L-1:4	95/Hfm/79
EOL-L-1:0,5	Hfm 94/87
EOL-L-1:1	Hfm 94/88
POL-DL-1:1	97/Da/10

**Tabelle 14**    **Verwendete Polymermischungen**

Nr.	Komponente 1	Komponente 2	Anteils- verhältnis	Aussehen
1	POL-DL-1:1	GOL-DL-1:3	30:70	klar
2	POL-DL-1:1	GOL-L-1:6	40:60	klar
3	POL-DL-1:1	GOL-L-1:13	50:50	getrübt
4	POL-DL-1:1	GOL-DL-1:18	60:40	klar
5	EOL-L-1:0,5	GOL-L-1:6	70:30	klar
6	EOL-L-1:0,5	GOL-DL-1:18	50:50	getrübt
7	POL-DL-1:1	GOLG-DL-1:9:3	50:50	klar
8	POL-DL-1:1	GOL-DL-1:18	60:40	klar
9	POL-DL-1:1	GOL-L-1:4	30:70	klar
10	POL-DL-1:1	GOL-DL-1:1:3	30:70	klar
11	POL-DL-1:1	GOLG-DL-1:9:9	60:40	klar
12	POL-DL-1:1	GOLG-DL-1:9:3	55:45	klar
13	GOL-L-1:1	GOL-DL-1:1:3	50:50	klar

Aus diesen Polymeren wurden sieben verschiedene Mischungen hergestellt. Tabelle 14 zeigt die verwendeten Rezepturen.

### III.2.1.2 Arzneistoffe

**Tabelle 15**    **Verwendete Arzneistoffe**

Polymer	Hersteller
Gentamicin-Sulfat	Merck KGaA
Methotrexat Säure, mikronisiert	Biosyn
EMD 121974 (cykl. Oligopeptid)	Merck KGaA

## III.2.2 Geräte

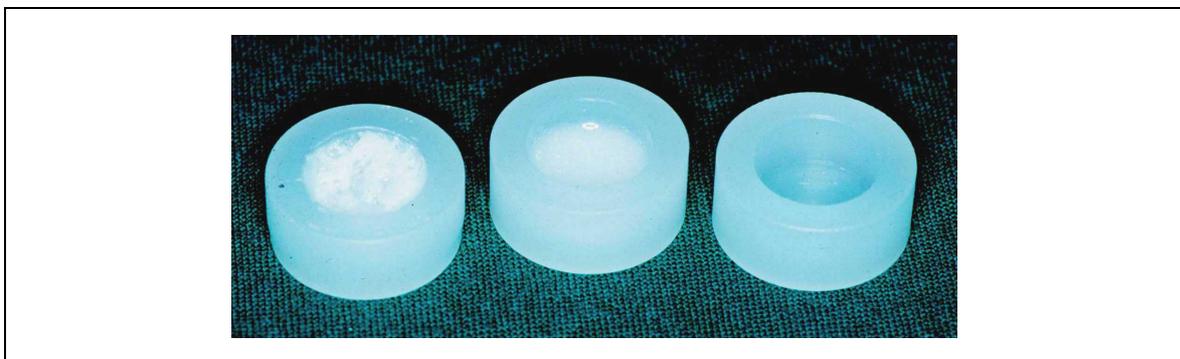
**Tabelle 16**    **Verwendete Geräte**

Gerät	Hersteller
Fantaschale	Kress + Meinberg
pH-Messelektrode CG 843	Schott, Mainz
Eichpuffer, pH 4,66 und pH 6,88	Merck KGaA

### III.2.2.1 Prüfkörper

Bei festen Prüfkörpern ist es relativ einfach, standardisierte Untersuchungsbedingungen zu schaffen. Die Testkörper behalten größtenteils ihre Form, und der Wechsel des Testmediums war relativ simpel. Bei den hier getesteten halbfesten Zubereitungen gestaltet sich die Standardisierung etwas schwieriger. Würden die Substanzen einfach in ein Rollrandglas gegeben werden, würde sich durch Verlaufen am Glasboden die Oberfläche der Substanz ständig vergrößern. Außerdem wäre der Wechsel des Freisetzungsmediums nicht durch einfaches Dekantieren möglich.

Aus diesen Gründen wurden für die folgenden Untersuchungen kleine runde Töpfchen (Abbildung 63) aus Polyethylen verwendet. Sie waren einfach und in mehreren standardisierten Größen verfügbar, konnten leicht befüllt und gereinigt werden und hatten einen geringen Prüfsubstanzbedarf. Der Wechsel des Freisetzungsmediums geschah einfach durch Herausnehmen des Töpfchens aus dem Rollrandglas mittels einer Pinzette. Das Elutionsmedium wurde dekantiert und durch frisches, vortemperiertes ersetzt. Danach wurde das Töpfchen wieder eingesetzt.



**Abbildung 63**    **Polyethylen-Töpfchen zur Untersuchung halbfester Zubereitungen**

Die Prüfkörper hatten alle eine Höhe von 10 mm und unterschieden sich nur in ihrem Innendurchmesser. Dieser betrug 8,0 mm, 11,3 mm und 13,8 mm, was einer Fläche im Prüfkörper von 50 mm<sup>2</sup>, 100 mm<sup>2</sup> und 150 mm<sup>2</sup> entspricht.

### **III.2.3 Methoden**

#### **III.2.3.1 Herstellung der halbfesten Zubereitungen**

Bevor die Abbau- und Freisetzungsversuche begannen, wurden die in Tabelle 14 aufgeführten Polymermischungen hergestellt. Hierzu wurde die niedermolekulare Komponente in einer Fantaschale vorgelegt und in einem Trockenschrank auf etwa 60°C erwärmt. Danach wurde das zuvor in der Schlagbalkenmühle pulverisierte und mittels Analysensiebe klassierte Polymerpulver der niedermolekularen Komponente sukzessive zugegeben. Nach Erweichen des Pulvers wurde jeweils kräftig gerührt und so eine homogene Mischung erhalten. Nach vollständiger Einmischung wurden zwei Stunden bei 60°C im Vakuum eventuell eingearbeitete Luftbläschen entfernt.

#### **III.2.3.2 Messung des pH-Wert-Verlaufes**

Um den Verlauf des pH-Wertes zu untersuchen, wurden die Mischungen 8 - 13 nicht wie üblich in Puffer pH 7,4 sondern in 20 ml bidestilliertem Wasser eingelagert. Um den pH-Wert potentiometrisch bestimmen zu können, wurde dem Elutionsmedium zur Messung geringe Mengen (0,5%) an Kochsalz zugegeben. Vor jeder Messreihe wurde die Elektrode mittels zwei Eichpufferlösungen mit einem pH-Wert von 4,66 und 6,88 kalibriert.

#### **III.2.3.3 Messung des Milchsäure-Verlaufes**

Die Untersuchungen zum Verlauf der Milchsäurekonzentration wurden in 20 ml isotonischem Phosphatpuffer durchgeführt. Die Bestimmung der Monomeren Milch- und Glycolsäure erfolgte wie in Kapitel I.2.3.4.4 beschrieben.

## III.3 Ergebnisse und Diskussion

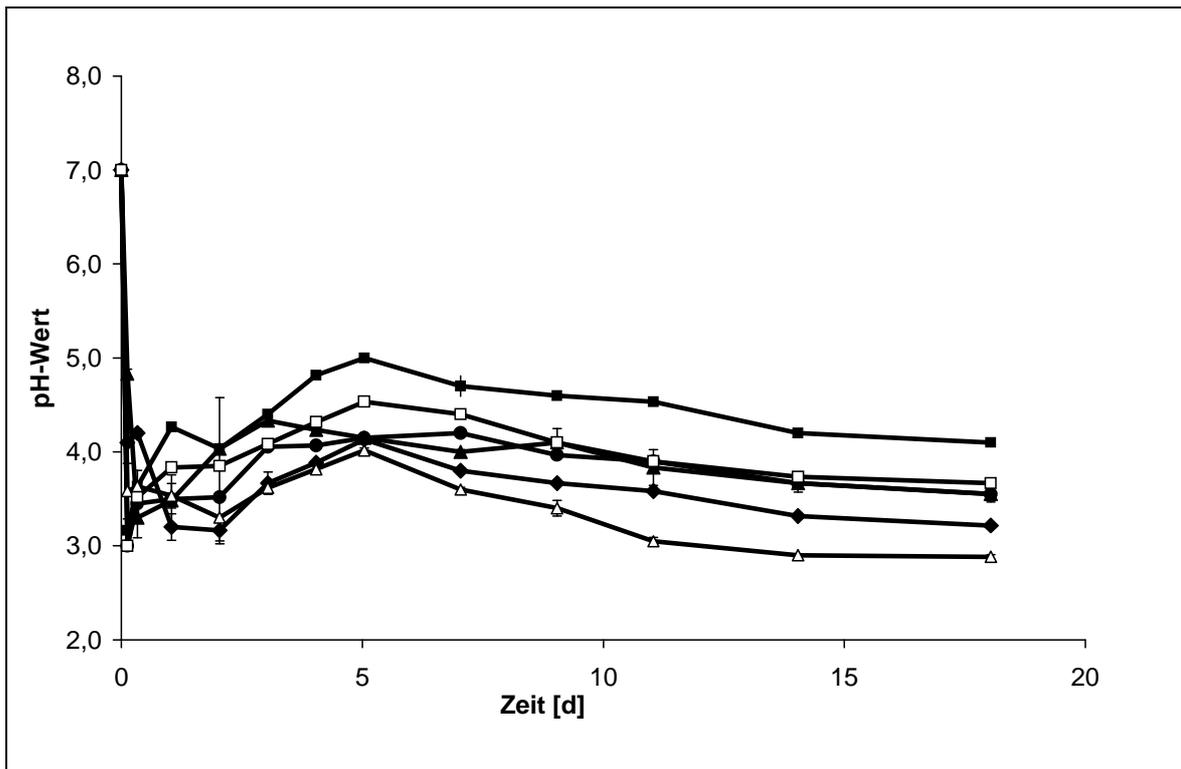
### III.3.1 Degradationsuntersuchungen wirkstofffreier Polymer-Mischungen

#### III.3.1.1 Verlauf des pH-Wertes

Durch die Anwesenheit von niedermolekularen, wasserlöslichen Polymeren war zu erwarten, dass die Degradation sehr schnell und in großem Umfang einsetzen würde. Die Folge wäre ein rasches Absinken des pH-Wertes durch die freiwerdende Milch- bzw. Glycolsäure.

Wie in Abbildung 64 zu sehen, sank der pH-Wert innerhalb weniger Stunden bis auf Werte zwischen 3 und 4 ab. Nach ein bis zwei Tagen stieg der Wert an und erreichte am 5. Tag einen Bereich zwischen 4 und 5. Danach sank der pH-Wert innerhalb von insgesamt 18 Tagen langsam ab. Eine Erklärung für dieses Profil könnte sein, dass zuerst die wasserlösliche Komponente aus dem System herausgelöst wird und das schnelle Abfallen des pH-Wertes bewirkt. Der Anteil der niedermolekularen Komponente im System sinkt ab und auch die beginnende Degradation des höhermolekularen Polymers vermag den pH-Wert nicht auf dem niedrigen Anfangswert zu halten. Erst nach dem 5. Tag wird so viel Milch- bzw. Glycolsäure frei, dass der pH-Wert des Freisetzungsmilieus wieder etwas mehr ins Saure verschoben wird.

Die Mischungen untereinander unterscheiden sich im Verlauf ihres pH-Wertes um bis zu 1,5 pH-Stufen. Es ist bei diesen Stoffgemischen sehr viel schwieriger, Gesetzmäßigkeiten des Abbauverhaltens zu entdecken, als dies bei den reinen Polymerstäbchen der Fall war. Es spielt dabei sowohl das Abbauverhalten der einzelnen Komponenten, als auch deren gegenseitige Beeinflussung eine Rolle. Diese Wechselwirkungen sind sowohl physikalischer als auch chemischer Natur. Durch das schnelle Herauslösen der niedermolekularen Komponente kommt es zu einer Oberflächenvergrößerung, die in einem schnelleren Abbau der zweiten Komponente resultiert. Ein hoher Anteil der wasserlöslichen Komponente bewirkt durch ihren schnellen Abbau ein Absinken des pH-Wertes, der seinerseits katalytisch die Degradation der zweiten Komponente fördert.



**Abbildung 64** pH-Wert-Verlauf im Elutionsmedium

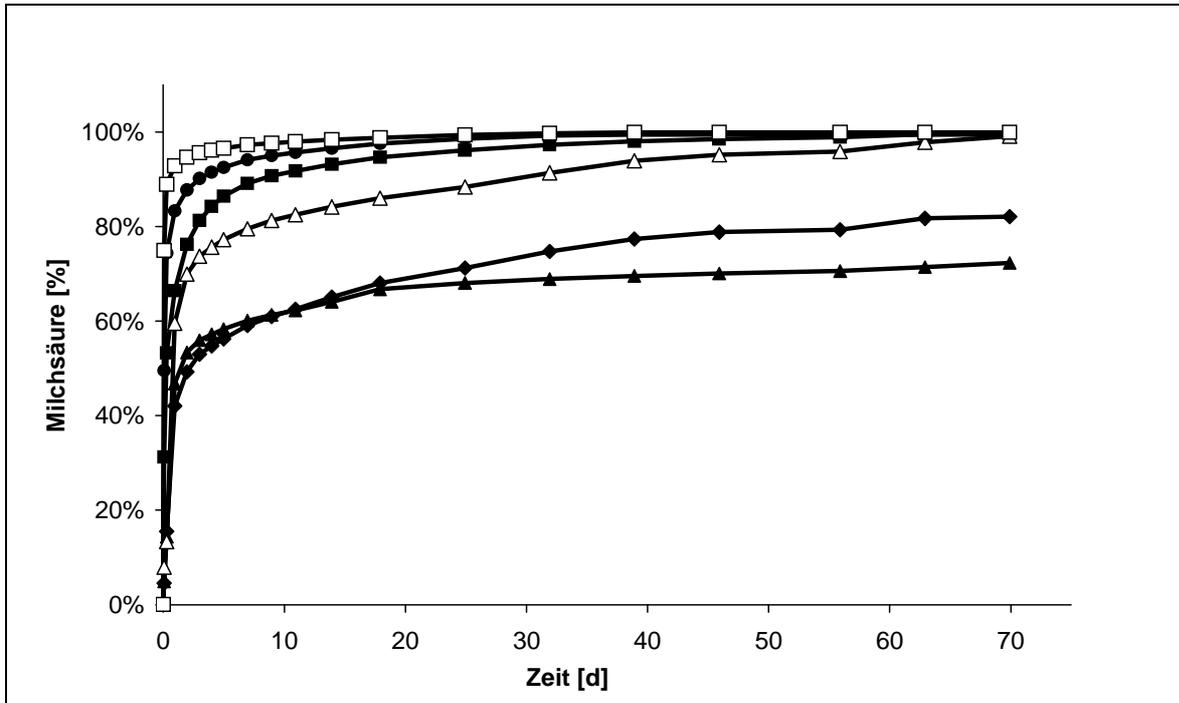
- |                 |                 |
|-----------------|-----------------|
| ▲ : Mischung 8  | ■ : Mischung 9  |
| ● : Mischung 10 | ◆ : Mischung 11 |
| △ : Mischung 12 | □ : Mischung 13 |

### III.3.1.2 Verlauf der Milchsäurekonzentration im Medium

Der schnelle Abfall des pH-Wertes zu Beginn der Untersuchung liegt in den schnell freiwerdenden  $\alpha$ -Hydroxy-Säuren begründet. Deren Konzentrationsverlauf während des Abbaus wurde im folgenden untersucht.

In Abbildung 65 sind die Milchsäurekonzentrationen der verschiedenen Polymermischungen über einen Zeitraum von 70 Tagen dargestellt. Um den Unterschied zwischen Mischungen klarer darzustellen, wurde die Skalierung der y-Achse erst bei 40% begonnen. Wie die Untersuchung des pH-Wertes vermuten ließ, steigen die Milchsäurekonzentrationen innerhalb der ersten beiden Tage bei sämtlichen Mischungen sehr schnell an. Ab dem dritten Tag zeigen sich jedoch deutliche Unterschiede, die sich in erster Linie auf die Molmasse der zweiten Komponente zurückführen lassen. Betrachtet man das Ausmaß der Milchsäurefreisetzung am 10. Tag, so steigt in der Reihe GOL-L-1:18, GOL-DL-1:9:9, GOL-DL-1:9:3, GOL-L-1:4 und GOL-DL-1:1:3 die Menge der freigesetzten Milchsäure an. Bei Polymeren mit ähnlichen Molmassen werden die hydrophileren, also glycolsäure-

haltigen Polymere schneller degradiert. Bei Mischungen mit identischer zweiter Komponente erreicht diejenige schneller die komplette Degradation, die den höheren Anteil an wasserlöslichem Polymer hat. Konkret bedeutet dies, dass Mischung 13 geringfügig langsamer degradiert als Mischung 10 – beide enthalten GOL-DL-1:1:3 als zweite Komponente – weil letztere einen höheren Anteil der wasserlöslichen Komponente enthält.

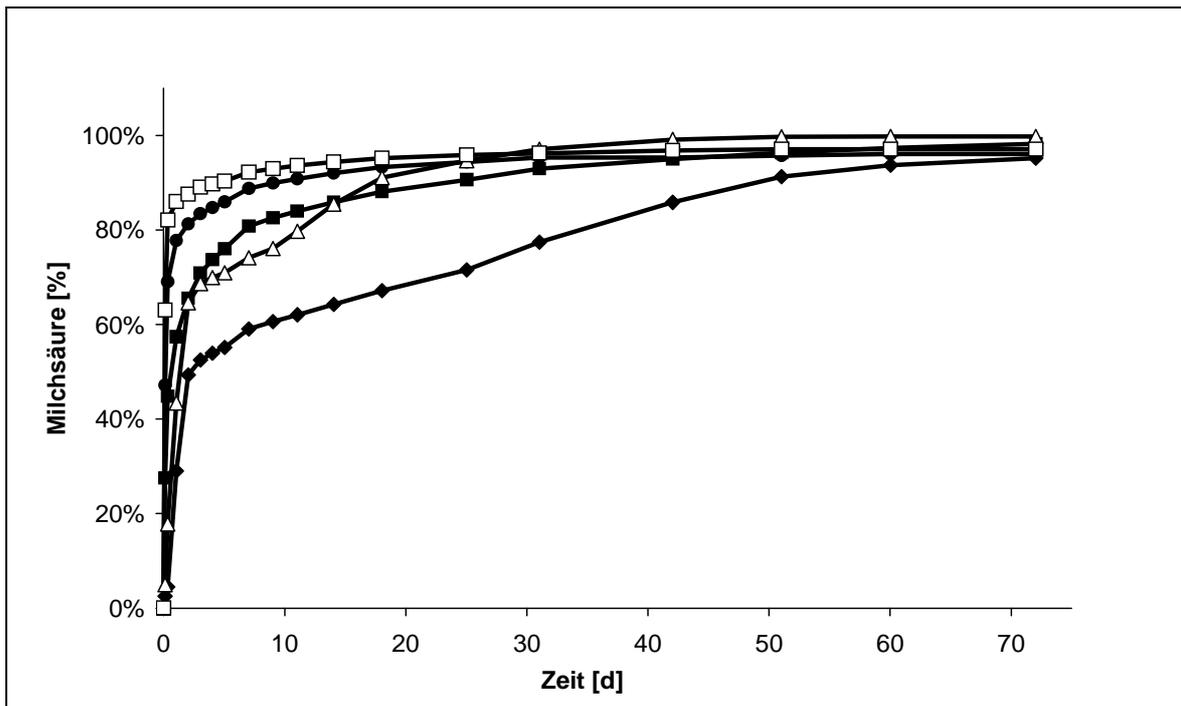


**Abbildung 65** Milchsäurefreisetzung Puffer pH 7,4

- |                 |                 |
|-----------------|-----------------|
| ▲ : Mischung 8  | ■ : Mischung 9  |
| ● : Mischung 10 | ◆ : Mischung 11 |
| △ : Mischung 12 | □ : Mischung 13 |

Das Abbauverhalten derselben Substanzen in bidestilliertem Wasser wurde in einem zweiten Versuch untersucht. Es ist kein grundsätzlich anderes Abbauprofil zu erkennen (Abbildung 66). Auffällig ist, dass nach 70 Tagen bei den Mischungen 8 und 11 der Abbau quasi komplett erfolgt ist, während beim Abbau in Puffer noch Reste 20% - 30%) vorhanden sind.

Ursache hierfür dürfte auch hier wieder sein, dass bereits freigesetzte Milch- bzw. Glycolsäure im Medium den pH-Wert erniedrigt und so den Abbau des restlichen Polymers autokatalytisch beschleunigt.



**Abbildung 66 Milchsäurefreisetzung Aqua bidest.**

- |                 |                 |
|-----------------|-----------------|
| ▲ : Mischung 8  | ■ : Mischung 9  |
| ● : Mischung 10 | ◆ : Mischung 11 |
| △ : Mischung 12 | □ : Mischung 13 |

### III.3.2 Arzneistofffreisetzung

Um zu klären, in wie weit die Oberfläche der dem Medium ausgesetzten Mischung einen Einfluss auf die Freisetzung von Wirkstoffen hat, wurde eine Mischung (Nr. 5; EOL-L-1:0,5 / GOL-L-1:6 70:30) mit einem Gentamicingehalt von 2% in Prüfkörpern mit drei unterschiedlichen Innendurchmessern untersucht. Es wurden immer solche Mengen der Mischung in die Prüfkörper eingefüllt, dass immer die gleiche Schichtdicke (etwa 2 mm) erhalten wurde. In Abbildung 67 sind die Freisetzungsprofile dieses Versuches zu sehen. Der Großteil des inkorporierten Wirkstoffes ist nach etwa 10 Tagen bei allen drei Mischungen freigesetzt. Nach 40 Tagen verhalten sich die kumulierten freigesetzten Mengen entsprechend der Oberflächen der Mischungen in den Prüfkörpern. Quantifizieren lässt sich dies in der freigesetzten Menge des Wirkstoffes pro Quadratmillimeter Freisetzungsfläche, dem Quotienten aus beiden Zahlen. Dieser sieht für die drei verschiedenen Prüfkörper folgendermaßen aus:

50 mm <sup>2</sup>	39,0 mg/mm <sup>2</sup>
100 mm <sup>2</sup>	39,2 mg/mm <sup>2</sup>
150 mm <sup>2</sup>	40,5 mg/mm <sup>2</sup>



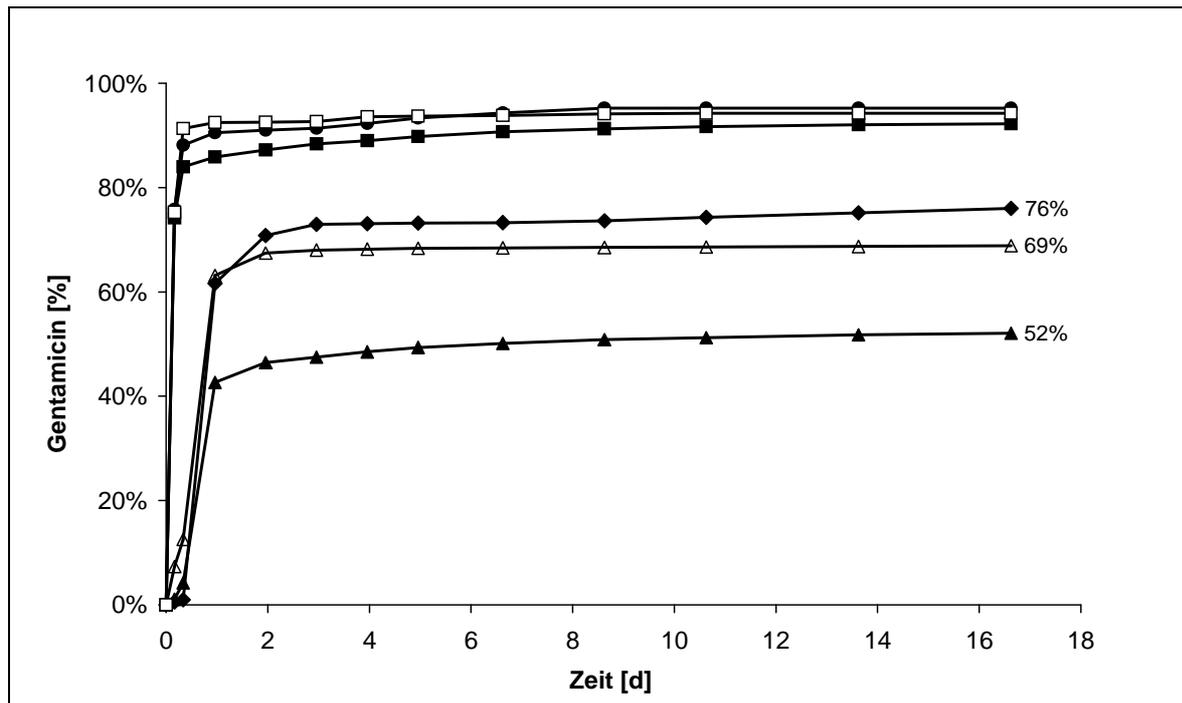


Mischung 8 40%

Mischung 11 30%

Mischung 12 33%

Dieses Ergebnis zeigt auch, dass sich der Wirkstoff gleichmäßig zwischen den beiden Polymerkomponenten verteilt. Würde sich zum Beispiel das Gentamicin-Sulfat zu einem deutlich höheren Teil in der niedermolekularen Komponente befinden, dann wäre die Gentamicin-Freisetzung - unabhängig von der gefundenen Restmenge an Polymer - in allen Fällen hoch.



**Abbildung 69** Gentamicin-Freisetzung bei 2%iger Beladung aus verschiedenen Mischungen

▲ : Mischung 8	■ : Mischung 9
● : Mischung 10	◆ : Mischung 11
△ : Mischung 12	□ : Mischung 13

Der gleiche Versuchsansatz wurde auch mit Methotrexat durchgeführt. Es sollte geklärt werden, ob ein schwer in wasser löslicher Wirkstoff ein anderes Freisetungsverhalten aus den Polymer-Mischungen zeigt. Die Beladungsrate betrug ebenfalls 2%.

Das Freisetzungsprofil des Methotrexat (Abbildung 70) ähnelt dem des Gentamicin. Die Mischungen mit relativ niedermolekularen Polymeren zeigen keinen Retardierungseffekt, das enthaltene Methotrexat wird innerhalb eines Tages vollständig freigesetzt. Wie schon beim Gentamicin-Sulfat zeigen die

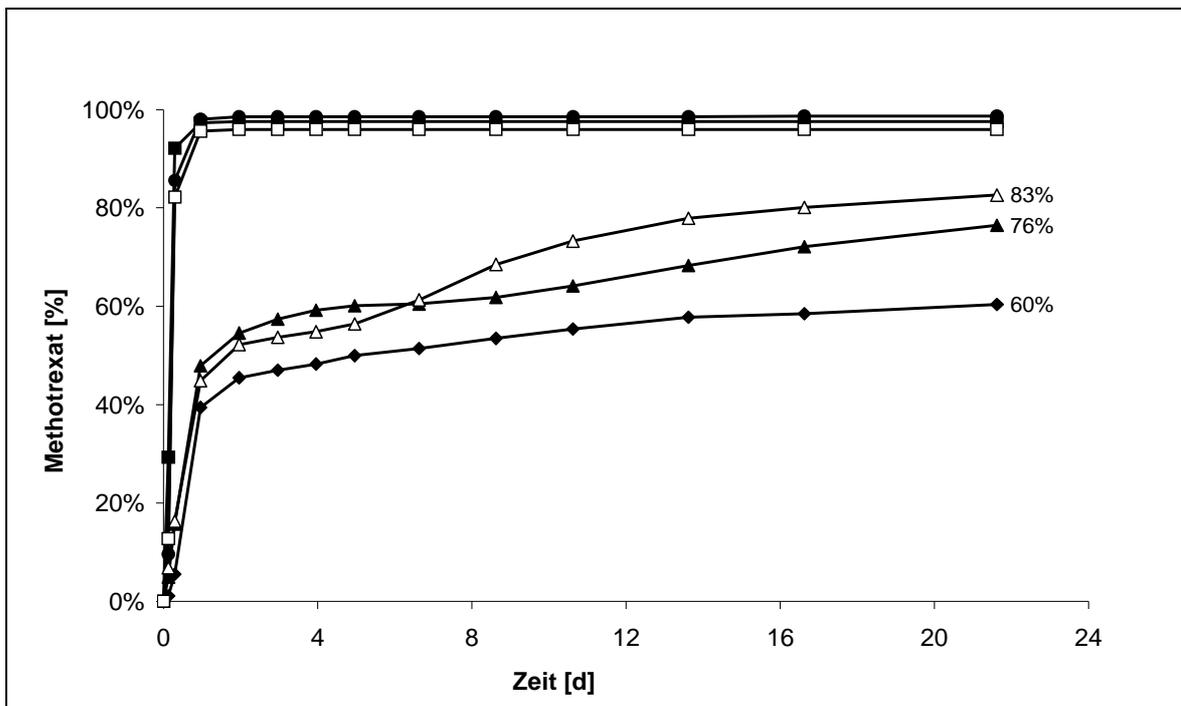
Mischungen 8, 11 und 12 ein davon abweichendes Profil. Innerhalb der ersten beiden Tage wurden etwa 50% des Wirkstoffes freigesetzt, gefolgt von einer Phase mit langsamer Abgabe. Auch hier wurden Restmengen von Polymer in den Prüfkörpern gefunden:

Mischung 8 32%

Mischung 11 33%

Mischung 12 33%

Hier stimmen die gefundenen Restanteile nicht so deutlich mit den nicht freigesetzten Methotrexat-Mengen überein. Ob es sich hier um Abweichungen im Rahmen des analytischen Bestimmungsfehlers der Wirkstoffe handelt, oder ob sich hier tatsächlich ein unterschiedliches Verteilungsverhalten des Wirkstoffes in den Polymeren zeigt, lässt sich anhand der Ergebnisse dieser Versuche nicht schlüssig beantworten. In beiden Fällen scheint die Verteilung des Wirkstoffes zwischen den Phasen der Mischung ähnlich.

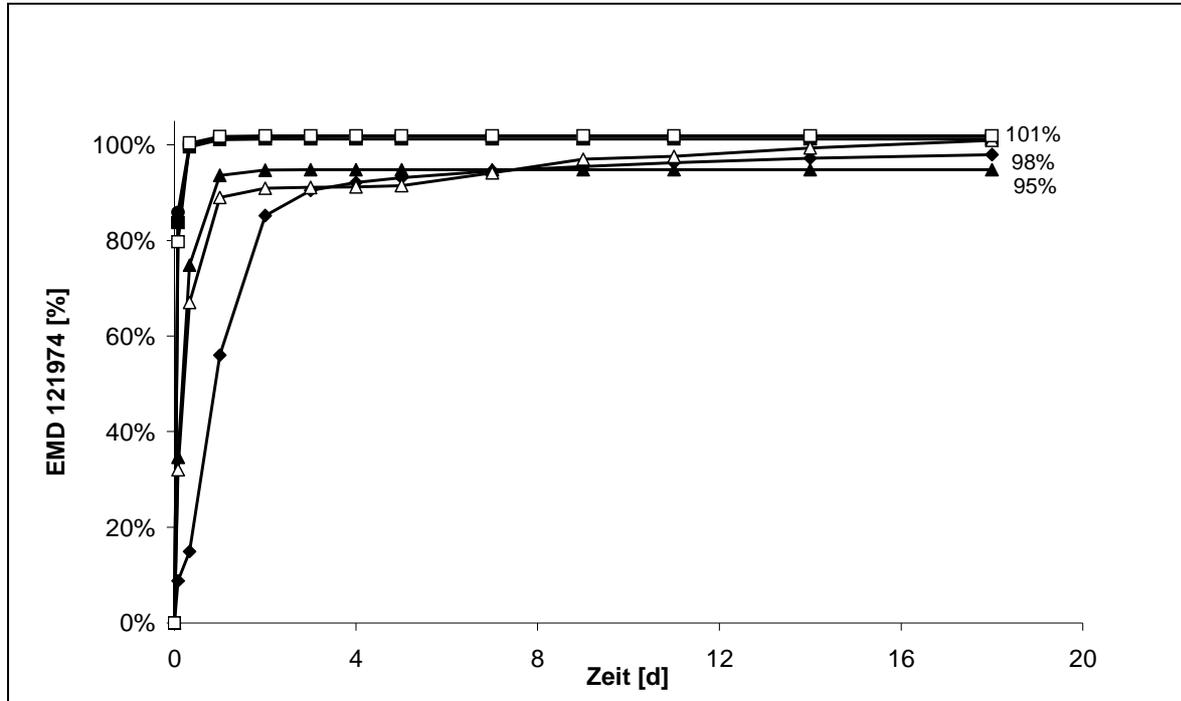


**Abbildung 70 Methotrexat-Freisetzung bei 2%iger Beladung aus verschiedenen Mischungen**

- |                 |                 |
|-----------------|-----------------|
| ▲ : Mischung 8  | ■ : Mischung 9  |
| ● : Mischung 10 | ◆ : Mischung 11 |
| △ : Mischung 12 | □ : Mischung 13 |

Bei einer Beladungsrate von 10% zeigte sich bei dem gut wasserlöslichen cyclische Peptid EMD 121974 im ansonsten gleichen Versuchsansatz ein etwas anderes Bild (Abbildung 71). Zwar zeigen die Mischungen mit den niedermolekularen Polymeren wieder eine sehr schnelle und vollständige

Freigabe des Wirkstoffes, doch scheinen die anderen drei Mischungen ebenfalls ein solches Profil zu zeigen. Es bleiben auch hier nach Abschluss der Untersuchung Restmengen an Substanz im Prüfkörper zurück, doch ist die Wirkstoffabgabe bei allen Mischungen quasi komplett. Dieses Verhalten ist mit großer Wahrscheinlichkeit auf die höhere Beladungsrate bei diesem Versuch zurückzuführen.



**Abbildung 71 Freisetzung von EMD 121974 bei 10%iger Beladung aus verschiedenen Mischungen**

- |                 |                 |
|-----------------|-----------------|
| ▲ : Mischung 8  | ■ : Mischung 9  |
| ● : Mischung 10 | ◆ : Mischung 11 |
| △ : Mischung 12 | □ : Mischung 13 |

### III.4 Zusammenfassung

Die Freisetzung des gut wasserlöslichen Gentamicinsulfats erfolgte aus den Systemen mit einem hohen Anteil an niedermolekularem Polymer sehr schnell und vollständig. Systeme mit überwiegend höhermolekularem Polymer gaben den Wirkstoff weniger schnell frei und es konnte gezeigt werden, dass der Wirkstoff sich in beiden Polymeren der Mischung verteilt.

Ein grundsätzlich anderes Verhalten konnte bei dem in Wasser schwerlöslichen Methotrexat nicht beobachtet werden. Die Verteilung zwischen der höher- und niedermolekularen Phase ähnelt der des Gentamicinsulfates.

Eine relativ hohe Beladungsrate mit einem hydrophilen Wirkstoff (EMD 121974) führte zu einer deutlich höheren Freisetzung aus dem höhermolekularen Teil des Polymergemisches, so dass insgesamt eine beinahe vollständige Freisetzung erreicht wurde.



## **Thema IV**

Herstellung eines bFGF-beschichteten  
Hydroxylapatit-Implantatkörpers



## IV.1 Einführung

Die Ursachen für Knochendefekte sind mannigfaltig: Unfälle, Tumore, angeborene Fehlbildungen oder Infektionen. Sie können entweder durch Knochen oder durch Knochenersatzmaterial gefüllt werden. Das Verwenden von eigenem Knochen (autologer Knochen) bei der Behandlung gilt als goldener Standard beim Füllen von Knochendefekten [110]. Limitiert wird diese Behandlung jedoch durch eine hohe Morbidität an der Entnahmestelle des Knochens und durch eine beschränkte Menge an entnehmbarem Knochen [110, 111]. In dieser Situation sind Knochenersatzmaterialien eine echte Alternative in der Behandlung von Knochendefekten. Unter verschiedenen anderen Optionen ist Hydroxylapatit (HA) ein viel verwendetes Material in der rekonstruktiven Chirurgie, nicht zuletzt wegen seiner exzellenten Biokompatibilität, kombiniert mit guten osteokonduktiven Eigenschaften [111, 112, 113, 114]. Der Knochenstoffwechsel wird stark durch lokale Wachstumsfaktoren beeinflusst [115]. Diese Faktoren können auch für therapeutische Zwecke genutzt werden [116].

HA kann als Träger für unterschiedliche Wachstumsfaktoren, wie das „bone morphogenetic protein“ (BMP) [117, 118] oder den „transforming growth factor- $\beta$ “ (TGF- $\beta$ ) [119, 120] dienen. Es entstehen hierdurch Komposit-Implantate, die die osteokonduktiven Eigenschaften des Trägers mit den osteoinduktiven Eigenschaften der Proteine verbindet, um die Knochenneubildung zu beschleunigen. bFGF zeigt ebenfalls beschleunigenden Effekte bei der Knorpel- und Knochenbildung während der Frakturheilung [121] und eine Induktion der Knochenbildung in einer demineralisierten Knochenmatrix [122].

Der „Basic fibroblast growth factor“ (bFGF) ist ein einkettiges Polypeptid bestehend aus 146 Aminosäuren und zeichnet sich durch eine hohe Affinität zu den Heparinen aus [123]. Es ist eines von 9 Peptiden aus der FGF- Familie [124]. Der Name kommt ursprünglich von der Fähigkeit dieser Peptide, die Bildung von Fibroblasten zu stimulieren [125, 126].

Das Beschichten von Implantaten mit bFGF kann das Einwachsen von Knochen beschleunigen [127, 128]. So konnte in einer Studie an Schweinen gezeigt werden, dass bFGF beschichtete HA-Implantate gegenüber unbeschichteten Implantaten eine deutlich schnellere Knochenneubildung und ein schnelleres Einwachsen zeigen [129]. Trotz der guten knöchernen Integration war in dieser Studie an einigen Implantaten ein ungleichmäßiges Einwachsen des Knochens zu erkennen, was auf die ungleichmäßige Beschichtung mit bFGF und in Folge dessen auf eine nicht kontrollierte Freisetzung zurückgeführt wurde.

Die Frage, ob eine Beschichtung mit einem resorbierbaren Polymer die Freisetzung des Wachstumsfaktors günstig beeinflussen könnte, sollte in dieser Tierstudie untersucht werden.

## IV.2 Materialien und Methoden

### IV.2.1 Substanzen

#### IV.2.1.1 Polymer

**Tabelle 17**    **Verwendete Polymere**

Polymer	Charge
GOL-L-1:12	96/Da/661

Als Beschichtungsmaterial für die Hydroxylapatit-Zylinder kam das Polymer GOL-L-1:12 zum Einsatz. Das Molekulargewicht betrug  $M_n = 2612$  und  $M_w = 3845$ . Die Glasübergangstemperatur lag bei  $T_g = 31,3^\circ\text{C}$ .

#### IV.2.1.2 Wachstumsfaktor bFGF (Basic fibroblast growth factor)

Der Wachstumsfaktor wurde von der Scios Company, Palo Alto, California, USA bezogen. Es handelte es sich um humanes, rekombinantes Material mit einem Molekulargewicht von 17 - 18 kDalton und einem isoelektrischen Punkt von 9,8.

#### IV.2.1.3 Hydroxylapatit-Zylinder

Die poröse Hydroxylapatit-Keramik (Endobon<sup>®</sup>; Biomet Merck, Darmstadt) wird aus spongiösem Rinderknochen gewonnen. In einem Pyrolyse-Prozess (24 Stunden bei  $450 - 550^\circ\text{C}$  und 5 Stunden bei  $700 - 900^\circ\text{C}$ ) werden die Knochen von organischem Material befreit. In einem anschließenden Sinterprozess (5 Stunden bei  $1200^\circ\text{C}$ ) wird der Knochen unter Erhalt der offenen, trabekulären Struktur in Hydroxylapatit umgewandelt. [130,131]. Das interkonnektierende Porensystem hat eine durchschnittliche Porosität von 45 - 85%

Zylinder mit einem Durchmesser von 9,55 mm und einer Länge von 10 mm wurden aus Knochenstücken gefräst, mit destilliertem Wasser gewaschen und autoklaviert. Nach Trocknung bei  $160^\circ\text{C}$  für 30 Minuten wurden die Zylinder auf Raumtemperatur abgekühlt.

## **IV.2.2 Methoden**

### **IV.2.2.1 Beschichtung**

#### **IV.2.2.1.1 bFGF-beschichtete Hydroxylapatit-Zylinder ohne Polymer**

16 Zylinder wurden mit 400 µl einer Lösung von 50 µg bFGF in Puffer (10 mM Citrat, 1 mM EDTA, pH 5,0; Scios Company, Palo Alto, California, US) betropft. Danach wurden die Zylinder lyophilisiert und unter sterilen Bedingungen verpackt.

#### **IV.2.2.1.2 bFGF-beschichtete Hydroxylapatit-Zylinder mit Polymer**

Die Beschichtungslösung für die polymerbeschichteten Zylinder wurde durch Lösen von 8 g Polymer in 26,6 ml Aceton hergestellt. Nach Sterilfiltration durch einen Membranfilter (Porenweite 0,22 µm) wurden 1,6 ml von dieser Lösung zu einem Vial mit 200 µg lyophilisiertem bFGF gegeben und mit einem Magnetrührer suspendiert. 400 µl dieser Beschichtungslösung wurde unter sterilen Bedingungen auf jeweils einen Zylinder aufgetropft. Nach Trocknen unter Vakuum wurden die Zylinder unter sterilen Bedingungen verpackt.

Somit hatten sowohl die Zylinder mit Polymerbeschichtung als auch die ohne eine Beladungsrate von 50 µg bFGF.

### **IV.2.2.2 Freisetzung des Wachstumsfaktors**

Die Bestimmung des bFGF im Freisetzungsmedium erfolgte mit einem Threshold<sup>®</sup> Immuno-Liganden-Assay (ILA, Molecular Devices Cooperation, Menlo Park, USA). Die Freisetzungspuren wurden durch Spülen der Zylinder mit 1 ml verdünntem ILA-Puffer gewonnen. Die Proben wurden nach 2h, 6h und 24h entnommen. Nach dem ersten Tag wurde nur noch einmal täglich über einen Zeitraum von 20 Tagen eine Probe gezogen.

### **IV.2.2.3 Studiendesign**

Diese Studie wurde an insgesamt 24 Schweine (mini-pigs) durchgeführt. Bei jedem Tier wurde am distalen Teil der beiden Femora ein subchondraler Defekt einer definierten Größe gesetzt. In jedem Tier wurde so jeweils ein Defekt mit einem beschichteten Zylinder mit Polymer und auf der gegenüberliegenden Seite ohne Polymer implantiert. Insgesamt wurden also 48 Implantate eingesetzt. Jeweils 12 Tiere wurden nach 6 beziehungsweise 12 Wochen getötet.

Dieses Studienprotokoll wurde vor Studienbeginn durch ein unabhängiges Gremium genehmigt.

#### **IV.2.2.4 Operation**

Die zylindrischen Defekte in den femuro-patellaren Gleitlagern mit einem Durchmesser von 9,5 mm wurden mit einer Diamanthohlfräse (DBCS<sup>®</sup>; Biomet Merck; Darmstadt, Germany) 10 mm tief geschliffen. Dies erfolgte unter Kühlung mit Kochsalzlösung. Die Zylinder mit einem Durchmesser von 9,55 mm wurden gemäß Studienprotokoll press-fit in diesen Defekt eingefügt. Besondere Beachtung wurde einem glatten Übergang zwischen Implantat und der Femorkondyle geschenkt. Abgesplittertes Keramikmaterial wurde sorgfältig mit isotonischer Kochsalzlösung weggespült.

#### **IV.2.2.5 Knochenmarkierung**

Um das Wachstum des Knochens in den histologischen Schnitten besser verfolgen zu können, wurde eine Fluochrome-Markierung durchgeführt. Hierzu wurden den Versuchstieren im Abstand von jeweils 6 Tagen vier verschiedene Farbstoffe subcutan verabreicht. Diese Farbstoffe lagern sich in den Knochen ab und ermöglichen bei der Histologie eine Zuordnung der Wachstumszonen zu unterschiedlichen Zeitpunkten.

- Oxytetracycline (Tag 6 bis 12; Dosierung: 20 mg/kg Körpergewicht)
- Alizarin Red (Tag 13 bis 19; Dosierung: 25 mg/kg Körpergewicht)
- Calcein Blue (Tag 20 bis 26; Dosierung: 25 mg/kg Körpergewicht)
- Calcein Green (Tag 27 bis 33; Dosierung: 25 mg/kg Körpergewicht)

Alle Tiere erhielten jeweils eine Injektion des jeweiligen Farbstoffes pro Tag. Bei der Tiergruppe, die erst nach 84 Tagen getötet wurden, erfolgte eine zusätzliche tägliche Injektion von Tetracyclin zwischen Tag 76 und 82.

#### **IV.2.2.6 Perfusion**

Die Fixierung der unteren Extremitäten erfolgte durch Perfusion mit Karnowsky-Lösung. Diese wurde in Vollnarkose des Tieres durchgeführt. In die Aorta wurden zuerst 2 l Kochsalzlösung und daran anschließend 1 l Karnowsky-Lösung infundiert. Beide Lösungen waren auf 37°C erwärmt. Eine Drainage wurde in der Vena cava inferior gelegt.

Nach der Fixierung der unteren Extremitäten wurde das Tier mit T61<sup>®</sup> getötet und beide distalen Femura vom angrenzenden Weichgewebe separiert.

#### **IV.2.2.7 Histologie und Histomorphometrie**

Nach der Entnahme der Knochen wurden diese unmittelbar zur weiteren Fixierung in Karnowsky-Lösung gegeben.

Von den fluorochrom-markierten Abschnitten wurden vom nicht dekalzifizierten Knochen Schnitte in einer Stärke von 500 µm gewonnen. Diese wurden 24 Tage lang in Technovit<sup>®</sup> (Technovit 7200 VLC<sup>®</sup>, Kulzer, Friedrichsdorf, Germany) eingebettet und dann für die Analyse gescannt.

Die Fluorochrom-markierten Abschnitte wurden auf den eingescannten Bildern markiert und mit dem gesamten Implantationsgebiet mittels eines Bildanalyse-Systems (Biocom 5000<sup>®</sup>; Biocom, Les Ulis, France) in Beziehung gesetzt.

Die vergleichende statistische Auswertung der Knochenbildung zwischen den verwendeten Gruppen wurde mittels Student's t-test (SPSS<sup>®</sup> für Windows 11.5, SPSS Software GmbH, München) durchgeführt. Unterschiede wurden bei einem p-Wert von <0,05 als signifikant betrachtet.

Eingebettete Proben wurden auf eine Schichtdicke von 40 – 80 µm heruntergeschliffen, um eine exakter Bestimmung zu ermöglichen [132]. Die Färbung erfolgte in diesem Fall mit Toluidin Blau und Fuchsin.

## IV.3 Ergebnisse

### IV.3.1 Beschichtung

Bei den rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen (Abbildung 72) fallen zwei Dinge auf. Zum einen geht durch die Beschichtung mit dem Polymer die raue Oberfläche des HA-Zylinders verloren. Zum anderen ist deutlich zu erkennen, dass Poren einer bestimmten Größe durch das Polymer nicht mehr ausgekleidet, sondern, komplett verschlossen werden. Die Größenordnung, bei der es zu einem Verschluss der Poren kommt, liegt bei ca. 200 - 300  $\mu\text{m}$ .

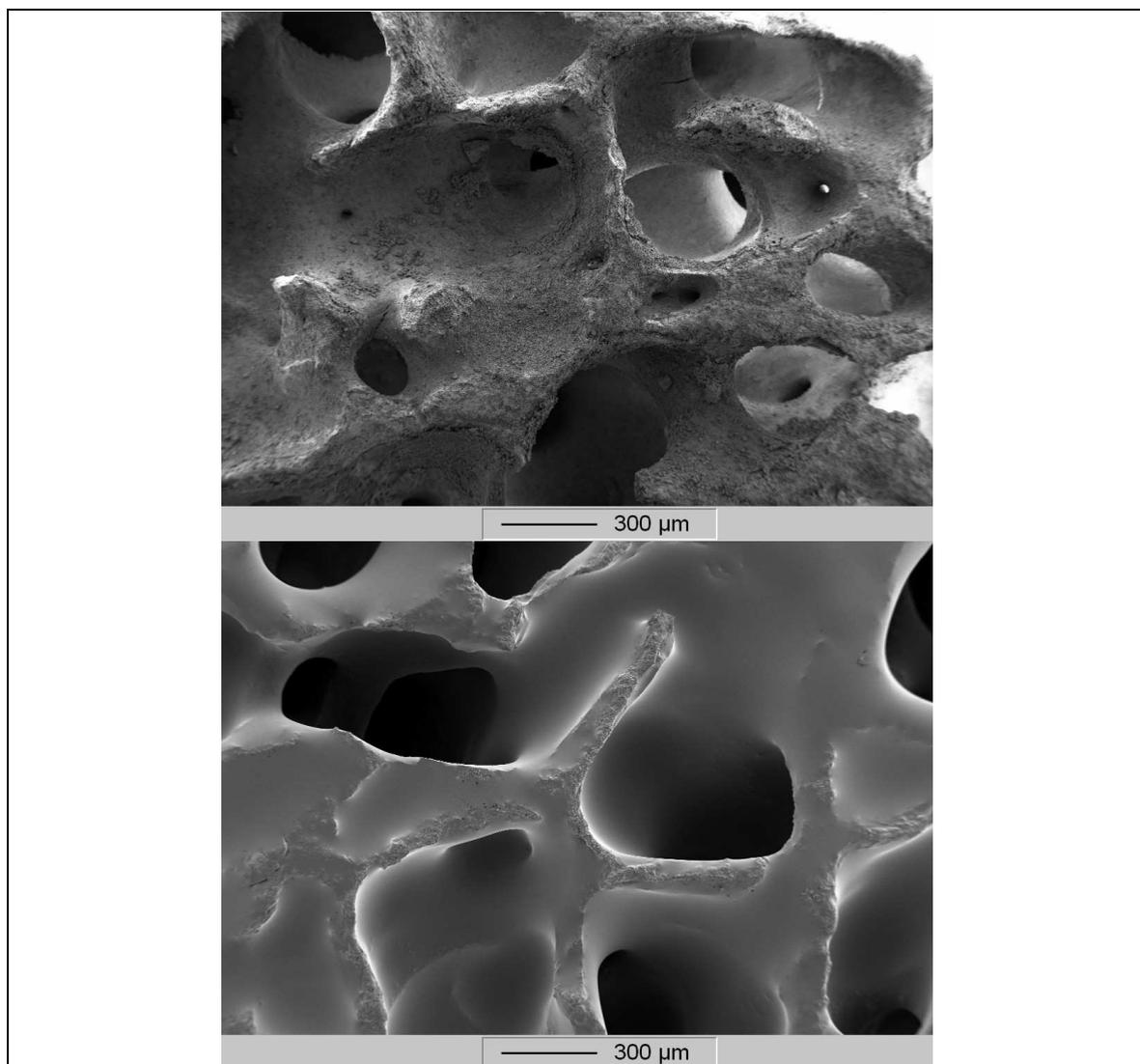


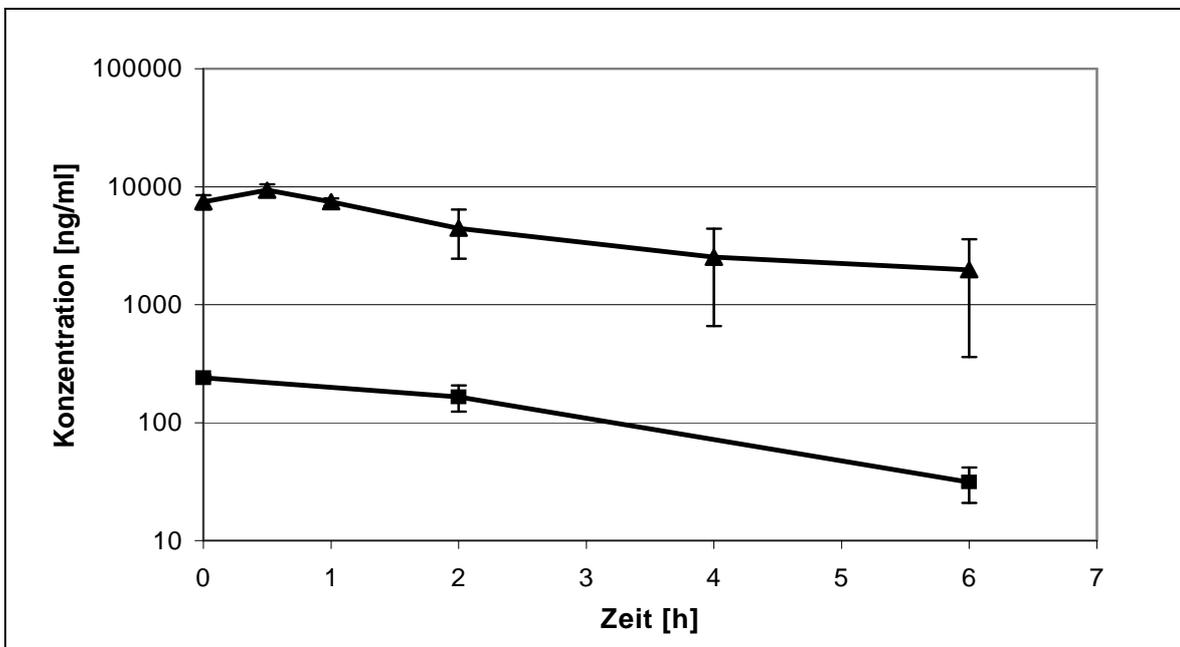
Abbildung 72 REM Aufnahmen unbeschichteter (oben) und beschichteter (unten) HA-Zylinder

### IV.3.2 Freisetzungsversuche

Untersuchungen im Vorfeld dieser Studie haben große Streuungen in der Freisetzung von reinem bFGF zwischen den einzelnen Zylindern gezeigt (Abbildung 73). Zylinder mit einer bFGF/Polymer-Beschichtung zeigten ein deutlich homogeneres Freisetzungsmuster mit nur sehr geringen Unterschieden zwischen den einzelnen Zylindern. Ein weiterer großer Unterschied zwischen diesen beiden Gruppen war die Höhe der Freisetzung. Die Menge an bFGF, die von Zylindern ohne Polymer freigesetzt wurde, war etwa 50 mal höher, als die von polymerbeschichteten Zylindern bezüglich der ersten 6 Stunden.

Die Freisetzungsversuche über 20 Tage zeigten, dass an den ersten 3 Tagen die Menge an bFGF, die von den bFGF/Polymer-beschichteten Zylindern freigesetzt wurde, niedriger war, als die von denen mit reinem bFGF beschichteten Zylindern. Ab dem 3. Tag zeigte sich ein umgekehrtes Bild (Abbildung 74). Innerhalb der ersten vier Tage fiel die Freisetzung von der reinen bFGF-Beschichtung rasch ab. Ab dem fünften Tag war kein bFGF mehr nachweisbar. Außerdem fielen auch hier die großen Unterschiede zwischen den einzelnen Zylindern auf. Wie schon in dem Versuch über 6 Stunden (Abbildung 73) war die Freisetzung von den bFGF/Polymer-beschichteten Zylindern gleichmäßiger.

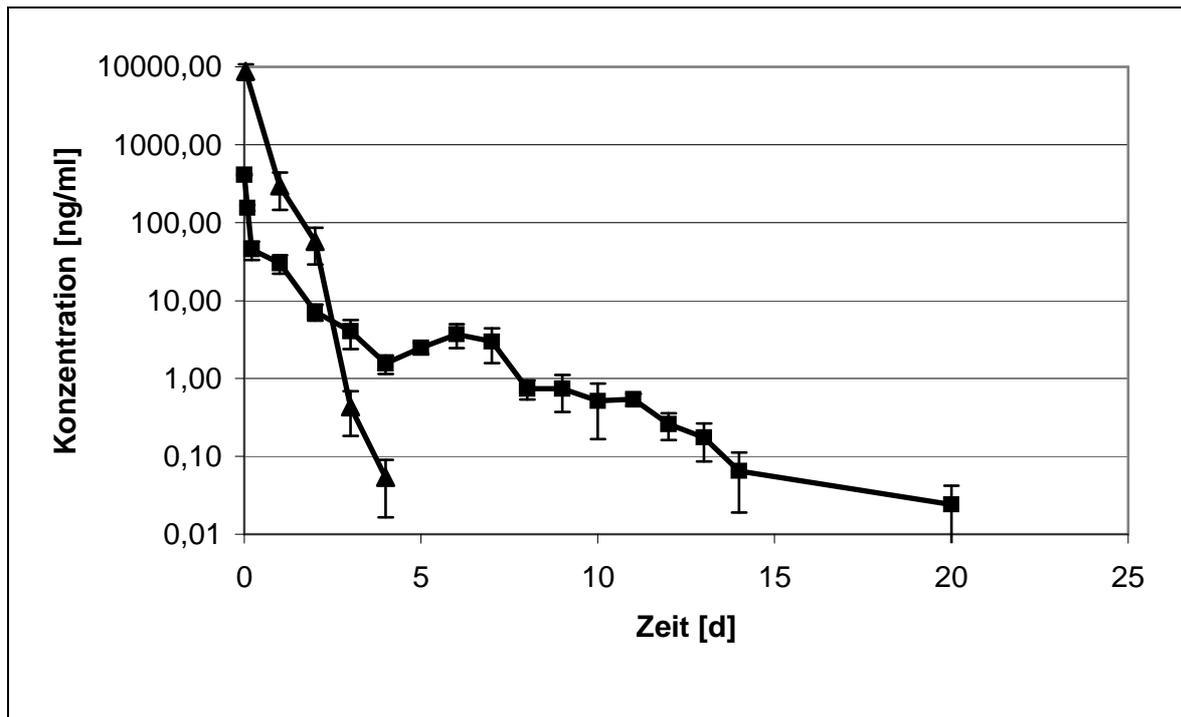
Ab dem 11. Tag fiel die bFGF-Freisetzung deutlich unter 1 ng/ml und konnte bis zum 20. Tag noch nachgewiesen werden.



**Abbildung 73** bFGF-Freisetzung von polymerbeschichteten und unbeschichteten Zylindern

▲ : unbeschichtete Zylinder

■ : beschichtete Zylinder



**Abbildung 74 bFGF-Freisetzung von polymerbeschichteten und unbeschichteten Zylindern über 20 Tage**

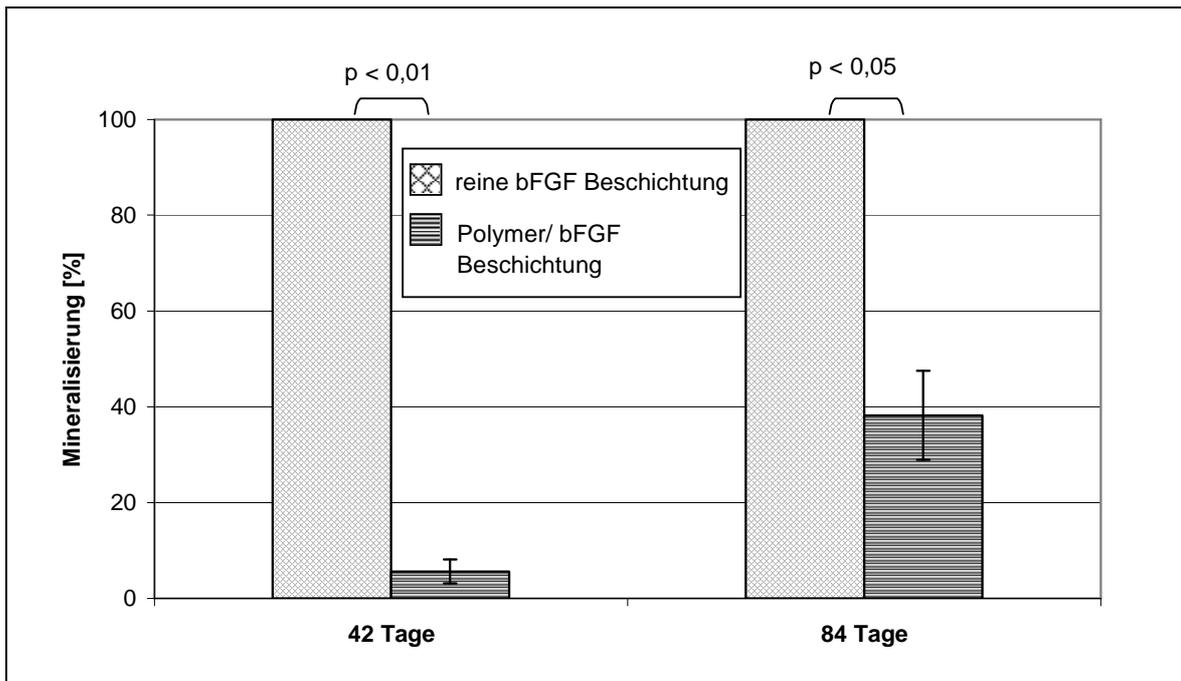
▲ : unbeschichtete Zylinder

■ : beschichtete Zylinder

### IV.3.3 Einwachsverhalten des Knochens

Im Vergleich zu den unbeschichteten Zylindern konnte bei den polymerbeschichteten Zylindern in der Histomorphometrie sowohl nach 42 Tagen ( $p < 0.01$ ) als auch nach 84 Tagen ( $p < 0.05$ ) eine deutliche Verzögerung beim Einwachsen des Knochens beobachtet werden.

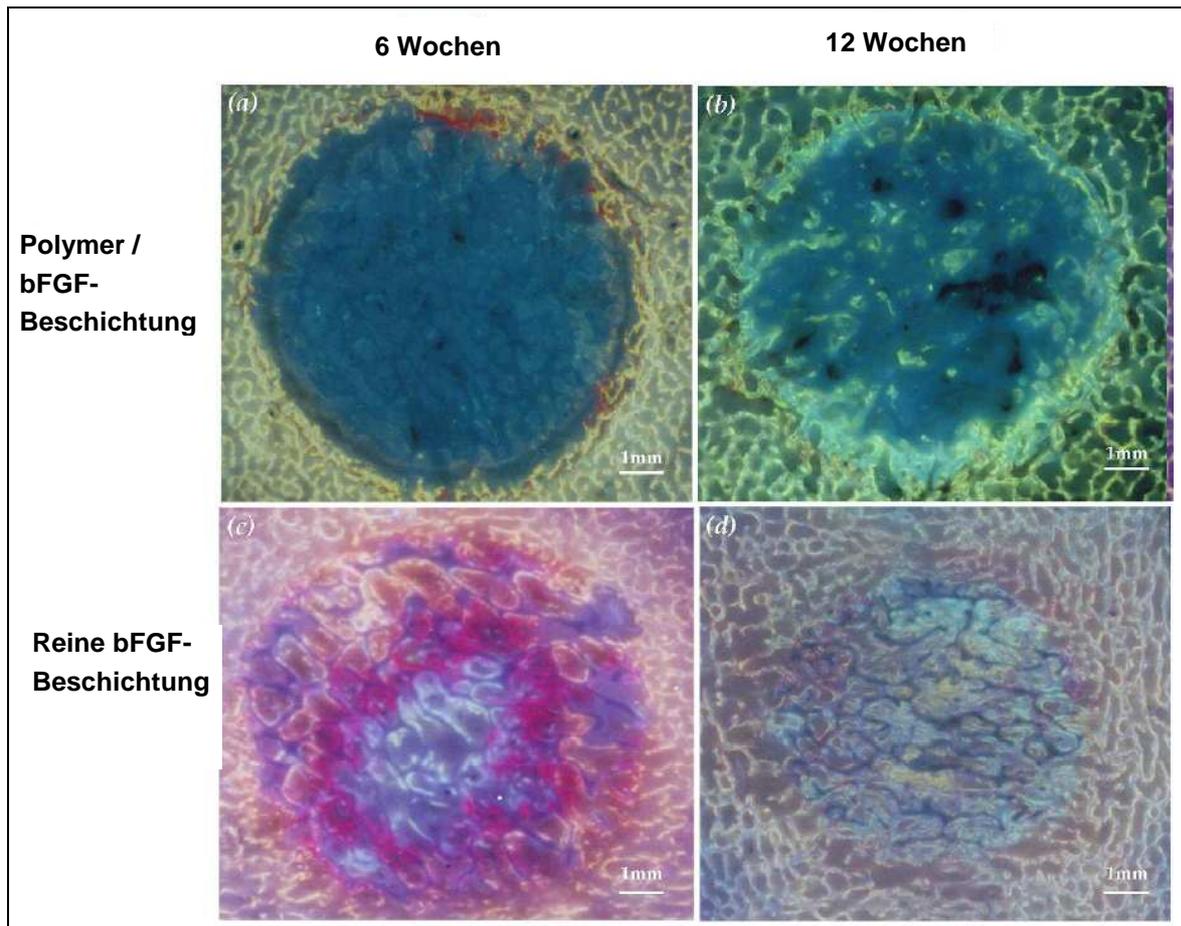
Bei den Zylindern ohne Polymerbeschichtung konnte schon nach 42 Tagen eine vollständige knöchernerne Integration und im Implantationsgebiet die Bildung von mineralisiertem Gewebe beobachtet werden. Zum gleichen Zeitpunkt zeigten die polymerbeschichteten Zylinder eine Mineralisierung von nur 5,6% ( $\pm 2,5\%$ ) und die knöchernerne Integration war auch noch nach 84 Tagen nur unvollständig (38,2%  $\pm 9,3\%$ ).



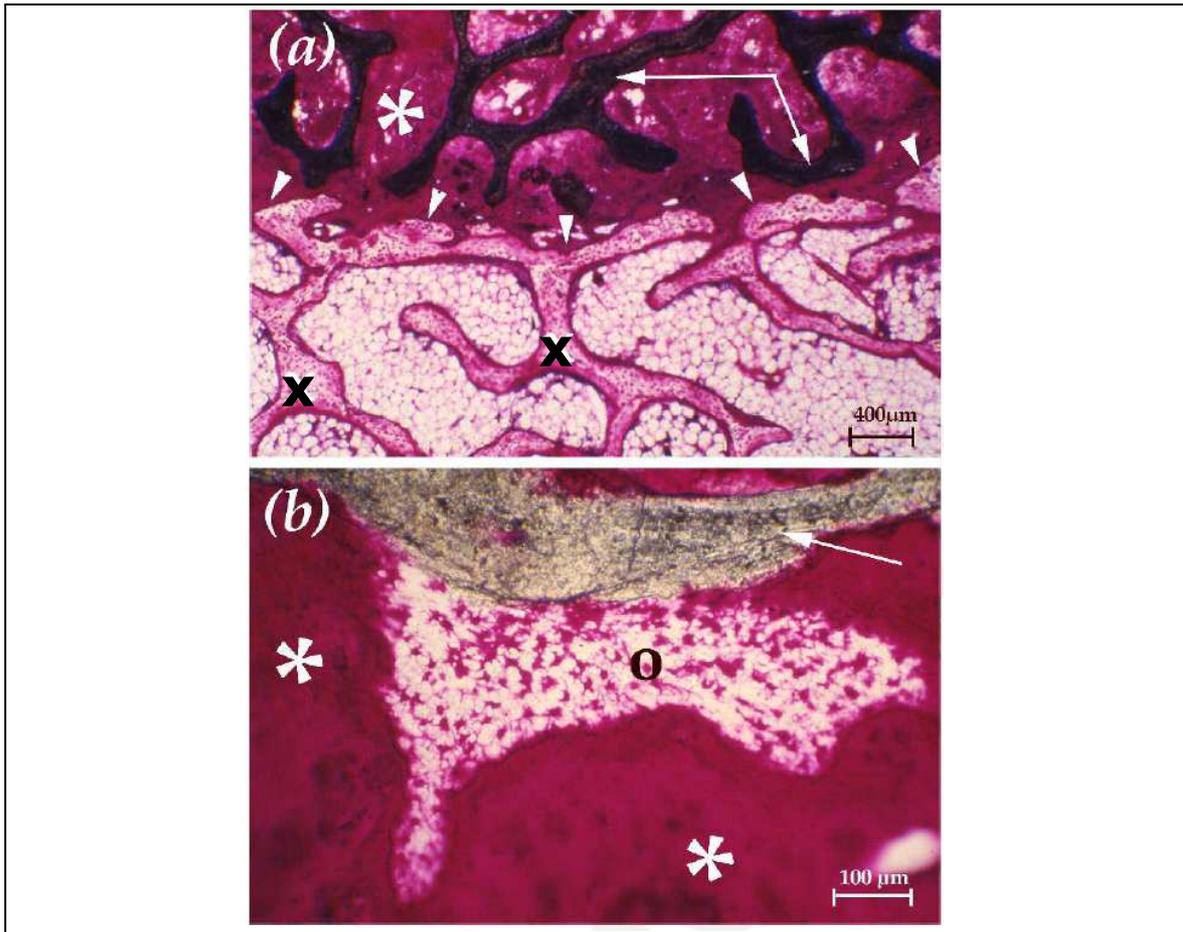
**Abbildung 75 Mineralisierung nach 42 und 84 Tagen**

Die unvollständige knöcherne Integration der polymerbeschichteten Zylindern war nach 42 Tagen auf die Randbezirke der Implantate beschränkt, ansonsten waren deutliche Lücken am Implantat/Knochen-Übergang zu sehen (Abbildung 76a). Nach 84 Tagen war das Implantat komplett vom Knochen umbaut, ein durchgängiges Einwachsen in die Poren war aber nicht zu beobachten (Abbildung 76b). An den Stellen, wo vereinzelt ein Einwachsen stattgefunden hatte, war dies sehr unregelmäßig. Die Reaktion des Knochengewebes am angrenzenden spongiösen Knochen war zu beiden Untersuchungszeitpunkten normal.

Bei den nicht mit Polymer beschichteten Zylindern war die knöcherne Integration nach 42 Tagen komplett abgeschlossen und an einzelnen Stellen konnte auch Knochenneubildung in die Poren des Implantates hinein beobachtet werden (Abbildung 76c). Nach 84 Tagen war die gesamt HA Struktur mit neu gebildetem Knochen ausgefüllt (Abbildung 76d), nur an wenigen Stellen im Inneren der Implantate konnten noch Unregelmäßigkeiten ausgemacht werden.



**Abbildung 76** Histologische Schnitte polymerbeschichtete und unbeschichteter Zylinder nach 6 und 12 Wochen



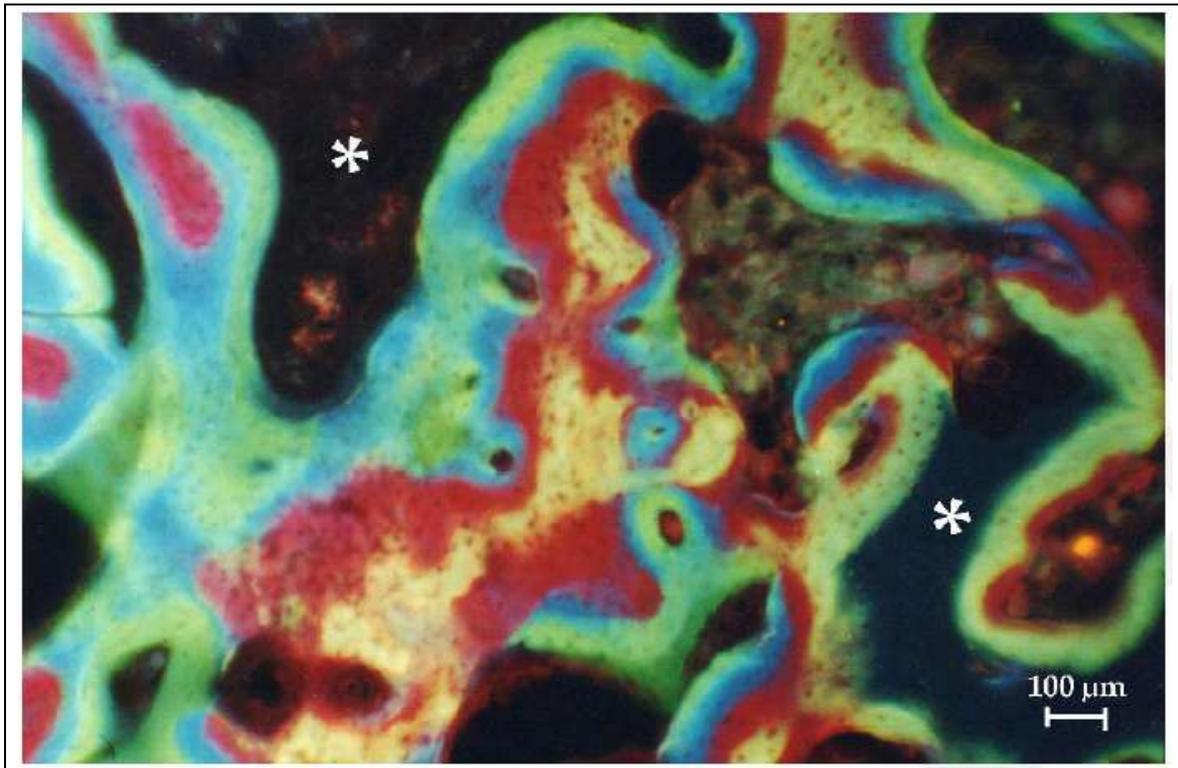
**Abbildung 77** Detailaufnahme eines histologischen Schnittes nach 42 und 84 Tagen

a) nach 42 Tagen  
 Sterne: Polymerreste  
 x: Knochen  
 Pfeile: HA Keramik  
 Pfeilspitzen: Übergang Knochen/  
 Polymer

b) nach 84 Tagen  
 Sterne: Polymerreste  
 Pfeile: HA Keramik  
 o: neu gebildeter Knochen

Genauere histologische Untersuchungen zeigten, dass das Polymer auch noch nach 42 Tagen als eine Art Barriere die Poren des Zylinders füllt und verschließt (Abbildung 77a).

In Abbildung 77b ist zu sehen, dass nach 84 Tagen in den Poren, in die der Knochen eingewachsen ist noch Polymer vorhanden ist. Nach dem gleichen Zeitraum waren die nicht mit Polymer beschichteten Implantate komplett mit neuem Knochen gefüllt (Abbildung 78).



**Abbildung 78 Zylinder ohne Polymerbeschichtung nach 84 Tagen**

Sterne: HA Keramik  
grün, blau rot gelb: neu gebildeter Knochen, gefärbt durch Fluorochrommarkierung

### IV.3.4 Diskussion

Der Hauptgrund für die Beschichtung der HA-Zylinder mit einem resorbierbaren Polymer war, eine gleichmäßigere Freisetzung des bFGF zu erhalten und das inhomogene Einwachsverhalten des Knochens in das Implantat zu verbessern. Dieses Phänomen der unregelmäßigen Knochenneubildung wurde nämlich in einer vorangegangene Studie, bei der unbeschichtete HA Zylinder mit bFGF-beschichteten verglichen wurde, nachgewiesen [129].

Die Freisetzungsversuche mit den bFGF beschichteten Zylinder ergaben in den ersten 6 Stunden eine hohe Variabilität. Dies ist sehr wahrscheinlich auf den biologischen Ursprung des Implantatmaterials zurückzuführen. Der HA Zylinder wird aus spongiösem Rinderknochen hergestellt, dessen Dichte und Porosität sehr stark abhängig von Einflüssen wie Alter, Ernährung, Geschlecht und Aktivität des Herkunftslandes ist. Ein wichtiger Faktor ist auch der Entnahmeort, da schon ein geringer Anteil an kortikalem Knochen die oben erwähnten Eigenschaften deutlich verändert. Diese natürliche Variation unter den Zylinder einer Herstellungscharge beeinflussen die bFGF-Adsorption auf den Zylindern, und erklären so die signifikanten Unterschiede in dessen Freisetzung und davon abhängig das Knocheneinwachsverhaltens.

Um dieses Problem der hohen natürlichen Variabilität zu umgehen, wurde ein resorbierbares Polymer als Träger für das bFGF eingesetzt. Dies führte dazu, dass das bFGF nicht mehr direkt auf dem HA-Implantat haftete und somit unabhängig vom stark variierenden Adsorptionsverhalten war. Die Freisetzung war lediglich durch das Diffusionsverhalten von bFGF im Polymer und dessen Abbaugeschwindigkeit gesteuert. Aus diesem Grund war darüber hinaus auch mit einer verlängerten Freisetzung zu rechnen.

Das Polymer wurde aufgrund seiner niedrigen Molmasse und einer trotzdem ausreichenden mechanischen Stabilität gewählt.

Die Freisetzungsversuche mit den bFGF/Polymer beschichteten Zylindern zeigten tatsächlich ein homogeneres Freisetzungsprofil und eine verlängerte Freisetzung über den 5. Tag hinaus. Dies bestätigt die These, dass die Desorptionsrate des bFGF von HA-Keramik in den ersten 4 Tagen höher ist als die Diffusionsgeschwindigkeit des bFGF im Polymer.

Wang et al. [133] zeigten in einem Knochenkammer-Model (Ratte), dass HA/Hyaluronsäure-Komposite mit einer Beladung von 50 µg pro Implantat und einem verzögerten Freisetzungsprofil nach 6 Wochen das Knochenwachstum hemmen, in einer geringeren Dosierung jedoch nicht.

Histomorphometrische Analysen ergaben eine deutliche Verzögerung des Knocheneinwuchses nach 42 und 84 Tagen. In den histologischen Präparaten war zu sehen, dass die Implantat-Poren nach 42 Tagen noch mit Polymer gefüllt waren und nach 84 Tagen das Polymer auch nur zum Teil abgebaut war. Die osteokonduktiven Eigenschaften von Hydroxylapatit sind hauptsächlich auf die Porengröße des Materials [134,135] und die Morphologie der Poren, wie zum Beispiel deren Interkonnektivität und die prozentuale Porosität [136] zurückzuführen. Eine Porengröße von mindestens 100 µm werden als Minimum für das Einwachsen von Blutgefäßen erachtet [137,138]. Aus diesen Gründen ist die Verzögerung beim Einwachsen des Knochens vor allem auf die veränderten Porengrößen beziehungsweise deren kompletten Verschluss zurückzuführen.

Das teilweise Einwachsen nach 12 Wochen kann auf die fortschreitende Degradation des Polymers in den Poren zurückgeführt werden, was dem umgebenden Knochen jetzt die Möglichkeit gibt einzuwachsen.

Unbeschichtete Endobon<sup>®</sup>-Zylinder haben in in vivo Studien eine gute Osteokonduktivität [129] bewiesen, was auf dessen vorteilhafte Porosität zurückzuführen ist. Deshalb ist das deutlich langsamere Einwachsen des Knochens in die Implantate mit hoher Wahrscheinlichkeit auf das verwendete Polymer zurückzuführen.



# Zusammenfassung



## Zusammenfassung

Die Eigenschaften, die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Co-Polymeren auf Basis von  $\alpha$ -Hydroxycarbonsäuren und Polyolen, unterscheiden sich deutlich von den entsprechenden reinen Polymeren ohne Polyolkomponente. Die Polymere dieser Klasse, die sich durch Variation der Parameter Alkoholkomponente, Alkohol/Lactid-Verhältnis, Lactid/Glycolid-Verhältnis, L/DL-Verhältnis ergibt sind äußerst vielfältig. Schwerpunktmäßig wurden Polymere untersucht, die als Carbonsäurekomponente Milch- und/oder Glycolsäure enthalten und bei denen Glycerin oder Ethylenglycol als Polyol verwendet wurde. Diese Arbeit verfolgte zum einen das Ziel, grundlegende Erkenntnisse über die neuartige Polymerklasse zu gewinnen und zum anderen die Eignung dieser Polymere als implantierbares Arzneistoffdepot zu untersuchen.

Dabei konnte – wie im **ersten** Teil dieser Arbeit beschrieben – nur ein Ausschnitt aus dem großen Spektrum der Polymere beispielhaft synthetisiert und untersucht werden. Von vornherein ausgeschlossen waren bei diesen Untersuchungen Polymere, deren Glasübergangstemperatur unter Raum- und über Körpertemperatur lagen. Es sollten so lagerstabile, aber nach Applikation ins Gewebe anpassungsfähige Formkörper erhalten werden.

Die Untersuchungen mit den entwickelten Polymerstäbchen haben gezeigt, dass sich die Klasse der Polyol-oligolactide/co-glycoliden von herkömmlichen, reinen Polylactiden bzw. Polylactiden/co-glycoliden in einigen Punkten unterscheidet.

So wurde bei keinem der Versuche ein inhomogenes Abbauverhalten festgestellt, wie dies in der Literatur bei reinen Polylactiden/co-glycoliden beschrieben ist. Es kam also nicht zu einem beschleunigten Polymerabbau im Inneren der Stäbchen durch Autokatalyse der sich dort akkumulierenden Milchsäure. Die Glycerol-Polymere scheinen eine ausreichende Diffusion der Degradationsprodukte nach außen zu gewährleisten. Dies ist eine wichtige Voraussetzung für die gleichmäßige Freisetzung von Wirkstoffen.

Die Eigenschaften der Polymerstäbchen ließen sich auf unterschiedliche Weise beeinflussen. So konnte ihre Wasseraufnahmefähigkeit durch das Verhältnis der Mischung von L-Polymeren zu DL-Polymeren sehr weit variiert werden. Das amorphe DL-Polymer ermöglicht eine erleichterte Wasseraufnahme gegenüber der reinen teilkristallinen L-Variante.

Die Co-Polymerisation mit Glycolid bot eine weitere Möglichkeit, die Eigenschaften der Polymere zu beeinflussen. So stieg bei den Polymeren mit gleichem

Glycerin/Monomer-Verhältnis die Hydrophilie in der Reihe GOL-DL-1:18 < GOL-DL-1:13,5:4,5 < GOL-DL-1:9:9 < GOL-L-1:4,5:13,5 an.

Die Versuche, die im **zweiten** Teil der Arbeit beschrieben werden, wurden im Rahmen der Entwicklung eines Applikationssystems für niedermolekulare Cyclo-oligo-peptide durchgeführt, die in der Krebstherapie eingesetzt werden sollten. Es wurde deutlich, dass die bisher verwendeten Polymerstäbchen für eine solche Anwendung nicht geeignet waren. Sie boten der zur Applikation notwendigen Menge an Peptid eine zu geringe Menge an Polymermatrix, was zu einer hohen Beladungsrate führte. Die Folge war ein mechanisch instabiles System, das nach Implantation zerbrechen könnte und so den Wirkstoff unkontrolliert freisetzen würde. Aus diesem Grund wurde ein Verpressungsverfahren gewählt, um Tabletten beziehungsweise stäbchenförmige Presslinge als Applikationssystem zu erhalten. Für beide Varianten wurde das Polymer gemahlen, die zu untersuchenden Hilfs- oder Wirkstoffe eingemischt und dann verpresst.

Bei den Untersuchungen zeigte es sich, dass eine gleichmäßige Freisetzung über mehrere Tage mit diesen resorbierbaren Trägersystemen nicht möglich war. Der Grund hierfür war ein zweiphasiger Verlauf der Freisetzung .

Im ersten Teil des zweiphasigen Verlaufs wurde eine große Menge des Wirkstoffes zusammen mit der niedermolekularen Komponente ausgespült. In der zweiten Phase wurde der Wirkstoff im Zuge der Degradation der höhermolekularen Komponente langsam freigesetzt.

Der Einfluss des Pressdruckes bei Erstellen der Prüfkörper war für die Freisetzung eher von untergeordneter Bedeutung, während eine vermehrte Zumischung von leicht wasserlöslichen Substanzen oder die Verwendung von hydrophileren Polymeren (DL-Lactide anstelle von reinen L-Lactiden) die Freisetzung des Peptides deutlich erhöhte.

Im **dritten** Teil der Arbeit wurde beispielhaft an den Substanzen Gentamicinsulfat, Methotrexat und einem Cyclo-Oligo-Peptid die Freisetzung aus 13 verschiedenen halbfesten Polymersystemen untersucht. Diese Systeme wurden durch Mischung von nieder- mit höhermolekularen Polymeren hergestellt. Die Menge an freigesetztem Arzneistoff korrelierte erwartungsgemäß mit der Oberfläche der Probenkörper.

Die Freisetzung des gut wasserlöslichen Gentamicinsulfats erfolgte aus den Systemen mit einem hohen Anteil an niedermolekularem Polymer sehr schnell und vollständig. Systeme mit überwiegend höhermolekularem Polymer gaben den

Wirkstoff weniger schnell frei und es konnte gezeigt werden, dass der Wirkstoff sich in beiden Polymeren der Mischung verteilt.

Das Freisetzungsverhalten bei dem in Wasser schwerlöslichen Methotrexat war nicht grundsätzlich anders. Die Verteilung zwischen der höher- und niedermolekularen Phase ähnelt der des Gentamicinsulfates.

Eine relativ hohe Beladungsrate mit einem hydrophilen Wirkstoff (EMD 121974) führte zu einer deutlich höheren Freisetzung aus dem höhermolekularen Teil des Polymergemisches, so dass insgesamt eine beinahe vollständige Freisetzung erreicht wurde.

Das im **vierten** Teil der Arbeit untersuchte Beschichten von Hydroxylapatit-Zylindern aus einer Kombination von bFGF mit einem Glycerin-L-1:13 Lactid Polymer führte zu einer gleichmäßigeren Freisetzung als bei Zylindern, die ohne Einsatz von Polymer beschichtet wurden. Außerdem war auch noch nach dem 5. Tag eine Freisetzung von bFGF zu beobachten. Eine signifikante Verzögerung des Einwachsens von Knochen in das Implantat nach 42 und 84 Tagen konnte bei der Gruppe mit bFGF/Polymer-Beschichtung histomorphologisch gezeigt werden.

Die Poren des Implantates waren mit dem Polymer gefüllt, was das Einwachsen in den ersten Wochen deutlich erschwerte. Erst nach Beginn der Degradation des Polymers war das Eindringen des umgebenden Knochen möglich.

Das Polymer GOL-L-1:12 war also aufgrund seiner langsamen Degradation für eine solche Anwendung ungeeignet. Für eine Verwendung als Beschichtungsmaterial sollte ein Polymer deutlich schneller degradieren und die Beschichtungsdicke müsste optimiert werden.

Die Charakterisierung der Polyol-oligolactide/co-glycoliden in dieser Arbeit hat gezeigt, dass es sich bei dieser Polymerklasse um eine sehr interessante Variante der resorbierbaren Polymere handelt. Die einfache Synthese, die gute Bioverträglichkeit und die in sehr weiten Bereichen variierbaren Eigenschaften machen diese Polymere zu vielversprechenden Kandidaten bei der Entwicklung von Arzneimittelträgern oder Medizinprodukten.



# Literaturverzeichnis



**Literaturverzeichnis**

- [1] Eppstein DA, Longenecker JP. Alternative delivery systems for peptides and proteins as drugs. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 1988; 5(2):99-139.
- [2] Androcur<sup>®</sup> Fachinformation Fa. Schering
- [3] Volon<sup>®</sup>A 40 Fachinformation Fa. Squibb-Heyden
- [4] Urbason<sup>®</sup> Fachinformation Fa. Hoechst
- [5] Benoit JP, Courteille F, Thies C. A physicochemical study of the morphology of progesterone-loaded poly(D,L-lactide) microspheres. *Intern Journal of Pharmaceutics* 1986; 29:95-102.
- [6] Cha Y, Pitt CG. A one-week subdermal delivery system for L-methadone based on biodegradable microcapsules. *J Controlled Release* 1988; 7:69-78.
- [7] Cha Y, Pitt CG. The acceleration of degradation-controlled drug delivery from polyester microspheres. *J Controlled Release* 1989; 8:259-265.
- [8] Juni K, Ogata J, Matsui N, et al. Control of release rate of bleomycin from polylactic acid microspheres by additives. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 1985 Apr.; 33(4):1609-1614.
- [9] Leelarasamee N, Howard SA, Malanga CJ, et al. Kinetics of drug release from polylactic acid-hydrocortisone microcapsules. *J Microencapsul* 1986 July; 3(3):171-179.
- [10] Okada H, Heyda T, Igari Y, et al. One-month release injectable microspheres of leuprolide acetate inhibit steroidogenesis and genital organ growth in rats. *Intern Journal of Pharmaceutics* 1989; 54:231-239.
- [11] Redmon MP, Hickey AJ, DeLuca PP. Prednisolone-21-Acetate Poly(glycolic acid) Microspheres: influence of matrix characteristics on release. *J Controlled Release* 1989; 9:99-109.
- [12] Ruiz JM, Tissier B, Benoit JP. Microencapsulation of peptide: a study of the phase separation of poly(D,L-lactic acid -co-glycolic acid) copolymers 50/50 by silicone oil. *Intern Journal of Pharmaceutics* 1989; 49:69-77.
- [13] Sanders LM, McRae GI, Vitale KM, et al. Controlled delivery of an LHRH analogue from biodegradable injectable microspheres. Syntex Research, Division of Syntex Inc, Institute of Pharmaceutical Sciences, Palo Alto, CA 94304 USA 1985;187-195.
- [14] Spenlehauer G, Vert M, Benoit JP, et al. Biodegradable cisplatin microspheres prepared by the solvent evaporation method: Morphology and release characteristics. *J Controlled Release* 1988; 7:217-229.

- [15] Wada R, Hyon SH, Ikada Y, et al. Lactic acid oligomer microspheres containing an anticancer agent for selective lymphatic delivery: I *In Vitro Studies*. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers* 1988; 3:126-135.
- [16] Zhou MX, Chang TM. Control release of prostaglandin E2 from polylactic acid microcapsules, microparticles and modified microparticles. *J Microencapsul* 1988 Jan.; 5(1):27-36.
- [17] Asano M, Yoshida M, Omichi H, et al. Biodegradable poly(DL-lactic acid) formulations in a calcitonin delivery system. *Biomaterials* 1993 Aug.; 14(10):797-799.
- [18] Danckwerts M, Fassihi A. Implantable controlled release drug delivery systems: a review. *Drug Dev Ind Pharm* 1991; 17(11):1465-1502.
- [19] Göpferich A, Karydas D, Langer R. Predicting Drug Release from cylindrical polyanhydride matrix discs. *Eur J Pharm Biopharm* 1995; 41(2):81-87.
- [20] Jackanicz TM, Nash HA, Wise DL, et al. Polylactic acid as a biodegradable carrier for contraceptive steroids. *Contraception* 1973 Sept.; 8(3):227-235.
- [21] Kaetsu I, Yoshida M, Asano M, et al. Biodegradable implant composites for local therapy. *J Controlled Release* 1987; 6:249-263.
- [22] Kissel T, Brich Z, Bantle S, et al. Parental depot-systems on the basis of biodegradable polyesters. *J Controlled Release* 1991; 16:27-42.
- [23] Folkman J, Long DM jr. *J. Surg Res.* 1964, 4 139
- [24] Chien YW, Lau EPK. Controlled drug release from polymeric delivery devices IV: in vitro-in vivo correlation of subcutaneous release of norgestomet from hydrophilic implants. *J. Pharm. Sci.* 1976, 65(4) 488-492
- [25] Drobnik J, Spacek P, Wichterle O. Diffusion of anti-tumor drugs through membranes from hydrophilic methacrylate gels. *J. Biomed. Mater. Res.* 1974, 8(1) 45-51
- [26] Vert M, Li S, Garreau H. New insights on the degradation of bioresorbable polymeric devices based on lactic and glycolic acids. *Clin Mater* 1992, 10(1-2):3-8.
- [27] Dexon<sup>®</sup> Fachinformation Fa. Braun
- [28] Schmitt EE, Polistina RA. US Pat. 3297033, 1967
- [29] Vicryl<sup>®</sup> Fachinformation Fa. Ethicon
- [30] Wasserman D. US Pat. 3375008, 1971
- [31] Wada R, Hyon SH, Ikada Y. New biodegradable oligoesters for pharmaceutical application. *J-Biomater-Sci-Polym-Ed.* 1996, 7(8): 715-25
- [32] Schakenraad JM, Nieuwenhuis P, Molenaar I, Molenaar I, et al. In vivo and in vitro degradation of glycine/DL-lactic acid copolymers. *J. Biomed. Mater. Res* 1989, 23(1) 1271-1288

- [33] Buchholz B. Degradation Phenomena On Polymeric Biomaterials, Editors: Planck H., Dauner M., Renardy M. Springer Verlag Heidelberg 1992, 67-76
- [34] Maxon<sup>®</sup> Produktinformation
- [35] Doddi N, Versfelt CC, Wasserman D. US Pat. 4052988, 1976
- [36] Mank R, Rafler G, Nerlich B. Parenterale Depotarzneiformen auf der Basis von biologisch abbaubaren Polymeren. Pharmazie 1991, 46(1) 9-18
- [37] Enantone<sup>®</sup> Fachinformation Fa. Takeda
- [38] Decapeptyl<sup>®</sup> Depot Fachinformation Fa. Ferring
- [39] Zoladex<sup>®</sup> Fachinformation Fa. ICI
- [40] Enantone<sup>®</sup>-Gyn Fachinformation Fa. Takeda
- [41] Beck LR, Pope VZ, Flowers CE, Cowsar DR, et al. Poly(DL-lactide-co-glycolide)/norethisterone microcapsules: an injectable biodegradable contraceptive. Biology of Reproduction 1983; 28 186-195
- [42] Radikalische Polymerisationen. Buch, Kapitel 12 2001.
- [43] Kutzelnigg W. Einführung in die Theoretische Chemie. Kapitel 4 Technische Synthesen 2001, 68-117.
- [44] Asano M, Fukuzaki H, Yoshida M, Kumakura M, et al. In Vivo Characteristics of Low Molecular Weight Copoly(L-Lactic Acid/Glycolic Acid) Formulations with Controlled Release of Luteinizing Hormone-Releasing Hormone Agonist. J. Controlled Release 1989, 9, No. 2, 111-22
- [45] Asano M, Fukuzaki H, Yoshida M, Kumakura M, et al. In vivo controlled release of a luteinizing hormone-releasing hormone agonist from poly(DL-lactic acid) formulations of varying degradation pattern. Intern. Journal of Pharmaceutics 1991, 67 67-77
- [46] Hyon SH, Jamshidi K, Ikada Y. Synthesis of polylactides with different molecular weights. Biomaterials. 1997 Nov, 18(22): 1503-8
- [47] Filachione EM, Fisher CH. Ind. Eng. Chem. 1944, 36(3) 223-228
- [48] Ural E, Kesenci K, Fambri L, Migliaresi C, Piskin E. Poly(D,L-lactide/epsilon-caprolactone)/hydroxyapatite composites. Biomaterials. 2000 Nov, 21(21): 2147-54
- [49] Rak J, Ford JL, Rostron C, Walters V. The preparation and characterization of poly(D,L-lactic acid) for use as a biodegradable drug carrier. Pharm. Acta. Helv. 1985, 60(5-6): 162-169
- [50] Suzuki K, Price JC. Microencapsulation and dissolution properties of a neuroleptic in a biodegradable polymer, poly(D,L-lactide). J. Pharm. Sci. 1985, Jan; 74(1): 21-24
- [51] Smith A, Hunneyball IM. Evaluation of Poly (Lactic Acid) as a Biodegradable Drug Delivery System for Parenteral Administration. Int. J. Pharm. 1986, 30, No. 2-3, 215-20

- [52] Stricker H. EP 0468199 1999
- [53] Lenz RW. Biodegradable polymers. *Advances in Polymers Science* 1993, 107:1-39.
- [54] Göpferich A. Polymer degradation and erosion: Mechanisms and applications. *Eur J Pharm. Biopharm* 1996, 42(1):1-11.
- [55] Williams D. F. and Zhong, S. P. Are free radicals involved in biodegradation of Implanted Polymers? *Advanced Materials* 1991, 3 623-626
- [56] Migliaresi C, Fambri L, Cohn D. A study on the in vitro degradation of poly(lactic acid). *J Biomater Sci Polym Ed* 1994, 5(6):591-606.
- [57] Sliedregt van A, Groot de K, Blitterswijk van CA. In vitro biocompatibility testing of polylactides - Part II Morphologic aspects of different cell types. *J Mater Sci Mat Med.* 1993, 4: 213-218
- [58] Sliedregt van A, Loon van JA, Brink van der J, Groot de K, Blitterswijk van CA. Evaluation of polylactide monomers in an in vitro biocompatibility assay. *Biomaterials* 1994, 15: 251-256
- [59] Sliedregt van A, Radder AM, Groot de K, Blitterswijk van CA. In vitro biocompatibility testing of polylactides. Part I proliferation of different cell types. *J Mater Sci Mater Med.* 1992, 3: 365-370
- [60] Daniels AU, Taylor MS, Andriano KP, Heller J. Toxicity of absorbable polymers proposed for fracture fixation devices. 38th Annual Meet., *Orthopaedic Res Soc.* 1992
- [61] Fröhlich JM, Schleuniger U, Zbinden G, Speiser PP. Interaction of different colloidal drug carrier systems with the endocytotic ability of rat peritoneal macrophages. *Proceed Intern Symp Control Rel Bioact Mater.* 1988, 15: 454-455
- [62] Rice RM, Hegyeli AF, Gourlay SJ, Wade CWR, et al. Biocompatibility testing of polymers: in vitro studies with in vitro correlation. *J Biomed Mater Res.* 1978, 12: 43-54
- [63] Bary S, Marx FJ, Schaudig A. Erste Erfahrungen mit einem neuen absorbierbaren synthetischen Nahtmaterial (Dexon®). *Chirurg* 1972, 43: 271-274
- [64] Bonke S, Scherer HJ, Fischer M. Erfahrungen mit dem synthetischen absorbierbaren Nahtmaterial Dexon®. *Münch med Wschr.* 1973, 115 (42): 1851-1853
- [65] Bos RRM, Rozema FR, Boering G, Nijenhuis AJ, et al. Degradation of and tissue reaction to biodegradable poly (L-lactide) for use as internal fixation of fractures: a study in rats. *Biomaterials* 1991, 12: 32-36
- [66] Vince DG, Hunt JA, Williams DF. Quantitative assessment of the tissue response to implanted biomaterials. *Biomaterials* 1991, 12: 731-736

- [67] Chegini N, Metz SA, Masterson BJ. Tissue reactivity and degradation patterns of absorbable vascular ligating clips implanted in peritoneum and rectus fascia. *J Biomed Mat Res.* 1990, 24: 929-937
- [68] Holten CH. *Lactid Acid. Properties and Chemistry of lactic acid and derivatives.* Verlag Chemie 1971, 412-460
- [69] Schambye HT, Pedersen FB, Christensen HK, Berthelsen H, Wang P. The cytotoxicity of continuous ambulatory peritoneal dialysis solutions with different bicarbonate/lactate ratios. *Perit Dial Int.* 1993, 13(Suppl 2): 116-118
- [70] Tabar AI, Muro MD, Quirce S, Olaguibel JM. Contact dermatitis due to sensitization to lactic acid and castor oil in a wart remover solution. *Contact-Dermatitis.* 1993, 29(1) 49-50
- [71] Ishidate M Jr., Sofuni T, Yoshikawa K, Hayashi M, et al. Primary mutagenicity screening of food additives currently used in Japan. *Food Chem Toxicol.* 1984, 22(8): 623-636
- [72] Morita T, Takeda K, Okumura K. Evaluation of clastogenicity of formic acid, acetic acid and lactic acid on cultured mammalian cells. *Mutat-Res.* 1990, 240(3) 195-202
- [73] Forth W, Henschler D, Rummel W, Starke K. (Eds.) *Pharmakologie und Toxikologie.* B I Wissenschaftsverlag, 6. Auflage, 1992
- [74] Carney EW. An integrated perspective on the developmental toxicity of ethylene glycol. *Reproductive Toxicology* 1994, 8(2): 99-113
- [75] Fraser AD, MacNeil W. Analysis of glycolic acid in serum: The major toxic metabolite of ethylene glycol. *Contrib Forensic Toxicol, Proc Int Meet Int Assoc Forensic Toxicol.* 1994, 31: 210-214;
- [76] Morozumi M, Ogawa Y. The effect of the oxalate precursors on experimental calcium oxalate urolithogenesis in rats: acute and chronic administration. *Nippon-Hinyokiky-Gakkai-Zasshi* 1995, 86 (5): 1022-1027
- [77] Sauvant MP, Pépin D, Grolière CA, Bohatier J. Effects of organic and inorganic substances on the cell proliferation of L-929 fibroblasts and *Tetrahymena pyriformis* GL protozoa used for toxicological bioassays. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 1995; 55: 171-178
- [78] Bruschi SA, Bull RJ. In vitro cytotoxicity of mono-, di-, and trichloroacetate and its modulation by hepatic peroxisome proliferation. *Fundamental and Applied Toxicology* 1993, 21(3): 366-375
- [79] Frank MSB, Nahata MC, Hilty MD. Glycerol: a review of its pharmacology, pharmacokinetics, adverse reactions, and clinical use. *Pharmacotherapy* 1981; 1(2): 147-160.

- [80] Witowski J, Knapowski J. Glycerol toxicity for human peritoneal mesothelial cells in culture: comparison with glucose. *International Journal of Artificial Organs* 1994; 17(5): 252-260
- [81] Doolittle DJ, Lee DA, Lee CK. The genotoxic activity of glycerol in an in vitro test battery. *Food and Chemical Toxicology* 1988; 26(7): 631-635
- [82] Barillak IR, Kozachuk S. Mutagenic action of different alcohols in an experiment. *Tsitologiya i Genetika* 1985; 19(6): 436-442
- [83] Liao K, Gong G, Hoffman D, Seiffter E, et al. Spontaneous host endothelial growth on bioprosthetic valves and its relation to calcification. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*. 1993; 7(11): 591-596
- [84] Kawai H, Nishino H, Kusaka K, Naruo T, et al. Experimental glycerol myopathy: a histological study. *Acta Neuropathol*. 1990; 80 (2): 192-197
- [85] Wise DL, Trantolo DJ, Marino RT, Kitchell JP. Opportunities and challenges in the design of implantable biodegradable polymeric systems for the delivery of antimicrobial agents and vaccines. *Advanced Drug Delivery Reviews* 1987, 1 19-39
- [86] Wang HM, Galasko CS, Crank S, Oliver G, et al. Methotrexate loaded acrylic cement in the management of skeletal metastases. Biomechanical, biological, and systemic effect. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 1995, 173-186
- [87] Mestiri M, Benoit JP, Hernigou P, Devissaguet JP, et al. Cisplatin-loaded poly (methyl methacrylate) implants: a sustained drug delivery system. *Journal of Controlled Release* 1995, 33 107-113
- [88] Ohya Y, Takei T, Kobayashi H, Ouchi T. Release behaviour of 5-fluorouracil from chitosan-gel microspheres immobilizing 5-fluorouracil derivative coated with polysaccharides and their cell specific recognition. *Journal of Microencapsulation* 1993, 10 1-9
- [89] Remmele T. Dissertation Universität Heidelberg, 1989
- [90] Herrlinger M. Dissertation Universität Heidelberg, 1994
- [91] Pitt CG, Gratzl MM, Kimmel JL, Surlles J, Schindler A. Aliphatic polyesters II. The degradation of poly (DL-lactide), poly (epsilon-caprolactone), and their copolymers in vivo. *Biomaterials* 1981, 2(10) 215-220
- [92] Smith R, Olivier C, Williams DF The enzymatic degradation of polymers in vitro. *J. Biomed Mat. Res.* 1987, 21 991-1003
- [93] Makino K, Ohsima H, Kondo T. Mechanism of hydrolytic degradation of poly(L-lactide) microcapsules: effects of pH, ionic strength and buffer concentration. *J. Microencapsulation* 1985, 3(3) 203-212

- 
- [94] Makino K, Arakawa M, Kondo T. Preparation and in vitro degradation properties of polylactide microcapsules. *Chem-Pharm-Bull* 1985, 33(3) 1195-1201
- [95] von Büren H. Dissertation Universität Heidelberg, 1989
- [96] Cutright DE, Perez B, Beasley JD, Jarson WJ, et al. Degradation rates of polymers and copolymers of polylactic and polyglycolic acids. *Oral Surg.* 1974, 37(1) 142-152
- [97] Asano M, Fukuzaki H, Yoshida M, Kumakura M, et al. An vivo characteristics of low molecular weight copoly (D,L-lactic acid) formulations with controlled release of LH-RH agonist. *Biomaterials.* 1989 Oct; 10(8) 569-73
- [98] Nakamura T, Hitomi S, Watanabe S, Shimizu Y, et al. Bioabsorption of polylactides with different molecular properties. *J.Biomed.Mater Res.* 1989, 23(19) 1115-1130
- [99] Makino K, Ohsima H, Kondo T. Effects of plasma proteins on degradation properties of poly(L-lactide) microcapsules. *J. Pharm. Res.* 1987, 4(1) 62-65
- [100] Pitt CG. The controlled parenteral delivery of polypeptides and proteins. *Intern. Journal of Pharmaceutics* 1990, 59 173-196
- [101] Hutchinson FG, Furr BJA. Biodegradable carriers for the sustained release of polypeptides. 1987, *Tibtech* 1-4; 5 102-106
- [102] Sanders LM, Kell BA, McRae GI, Whitehead GW. Prolonged controlled-release of nafarelin, a luteinizing hormone-releasing hormone analogue, from biodegradable polymeric implants: influence of composition and molecular weight of polymer. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 1986, 75 356-360
- [103] Asano M, Yoshida M, Kaetsu I. Biodegradability of a hot-pressed poly(lactid acid) formulation with controlled release of LH-RH agonist and its pharmacological influence on rat prostate. *Makromol.Chem., Rapid Common* 1995, 6 509-513
- [104] Zhang X, Jackson JK, Wong W, Weixian M, et al. Development of biodegradable polymeric paste formulations for taxol: an in vitro and in vivo study. *Intern. Journal of Pharmaceutics* 1996, 137 199-208
- [105] Merkli A, Heller J, Tabatabay C, Gurny R. Synthesis and characterization of a new biodegradable semi-solid poly(ortho ester) for drug delivery systems. *J.Biomater.Sci.Polym. Ed* 1993, 4 505-516
- [106] McNair AM. Using hydrogel polymers for drug delivery. *Medical Device Technology* 1996, 7 16-22

- [107] Bernatchez SF, Merkli A, Tabatabay C, Gurny R, et al. Biotolerance of a semisolid hydrophobic biodegradable poly(ortho ester) for controlled drug delivery. *J. Biomed. Mater. Res.* 1993, 27 677-681
- [108] Fukuzaki H, Yoshida M, Asano M, et al. A new biodegradable pasty-type copolymer of L-lactic acid and  $\epsilon$ -Valerolactone with relatively low molecular weight for application in drug delivery systems. *J. Controlled Release* 1989; 10 293-303.
- [109] Hatefi A, Amsden B. Biodegradable injectable in situ forming drug delivery systems. *J. Controlled-Release* 2002, 80, No. 1-3, 9-28
- [110] Bloemers FW, Blokhuis TJ, Patka P, Bakker FC, et al. Autologous bone versus calcium-phosphate ceramics in treatment of experimental bone defects, *J. Biomed. Mater. Res.* 2003, 15-B (66) 526-531.
- [111] Goulet JA, Senunas LE, De Silva GL, Greenfield MLVH. Autogenous iliac crest bone grafting, *Clin. Orthop.* 1997, 337 76-81.
- [112] Hende LL. Bioactive ceramics, *Ann. NY Acad. Sci.* 1988, 523 685-703.
- [113] Revell PA, Hing KA, Tanner KE, Best SM, Bonfield W., in: R. Schnettler, E. Markgraf (Ed.), *Knochenersatzmaterialien und Wachstumsfaktoren*, Thieme Verlag, New York, 1997, pp. 28-30.
- [114] Egli PS, Müller W, Schenk RK. Porous hydroxyapatite and tricalcium phosphate cylinders with two different pore size ranges implanted in the cancellous bone of rabbits. A comparative histomorphometric and histological study of bone ingrowth and implant substitution. *Clin. Orthop.* 232 1988 127-138.
- [115] Baylink DJ, Finkelman RD, Mohan S. Growth factors to stimulate bone formation, *J. Bone Mineral Res.* 8 Suppl. 2 (1993) S565-572.
- [116] Trippel SB, Coutts RD, Einhorn TA, Mundy GR, Rosenfeld RG, Growth factors as therapeutic agents. *J. Bone Joint Surg. Am.* 1996, 78-A (8) 1996 1272-1286.
- [117] Ono I, Ohura T, Murata M, Yamaguchi H, et al. A study on bone induction in hydroxyapatite combined with bone morphogenetic protein. *Plast. Reconstr. Surg.* 90 (5) (1992) 870-879.
- [118] Ripamonti U, Ma SS, van den Heever B, Reddi AH. Osteogenin, a bone morphogenetic protein, adsorbed on porous hydroxyapatite substrata, induces rapid bone differentiation in calvarial defects of adult primates. *Plast. Reconstr. Surg.* 90 (3) 1992, 382-393.
- [119] Lind M, Overgaard S, Nguyen T, Ongpipattanakul B, et al. Transforming growth factor-beta stimulates bone ingrowth. Hydroxyapatite-coated implants studied in dogs. *Acta Orthop. Scand.* 67 (6) 1996, 611-616.

- [120] Sumner DR, Turner TM, Purchio AF, Gombotz WR, et al. Enhancement of bone ingrowth by transforming growth factor-beta. *J. Bone Joint Surg Am.* 77-A (8) (1995) 1135-1147.
- [121] Kawaguchi H, Kurokawa T, Hanada K, Hiyama T, et al. Stimulation of fracture repair by recombinant human basic fibroblast growth factor in normal and streptozotocin-diabetic rats, *Endocrinology* 1994, 135 (2) 774-781.
- [122] Wang JS, Aspenberg P, Basic fibroblast growth factor and bone induction in rats. *Acta Orthop. Scand* 64 (5) (1993) 557-561
- [123] Gospodarowicz D, Cheng J, Lui MG, Baird A, et al. Isolation of brain fibroblast growth factor by heparin-sepharose affinity chromatography: identity with pituitary fibroblast growth factor, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81 (22) (1984) 6963-6967.
- [124] Gimenez-Gallego G, Cuevas P. Fibroblast growth factors, proteins with a broad spectrum of biological activities, *Neurol. Res.* 16 (4) (1994) 187-204.
- [125] Gospodarowicz D, Neufeld G, Schweiger L. Fibroblast growth factor. *Mol. Cell Endocrinol* 46 (3) (1986) 187-204.
- [126] Kato Y, Iwamoto M, Koiker T. Fibroblast growth factor stimulates colony formation of differentiated chondrocytes in soft agar, *J. Cell Physiol.* 133 (3) (1987) 491-498.
- [127] Wang JS, Aspenberg P. Basic fibroblast growth factor promotes bone ingrowth in porous hydroxyapatite. *Clin. Orthop.* 333 (1996) 252-260.
- [128] Wippermann BW, Zwipp H, Junge P, Saemann T. Healing of a segmental defect in the sheep tibia filled with a hydroxyapatite ceramic augmented by basic fibroblast growth factor and autologous bone marrow. *Trans. Orthop. Res. Soc.* 40 (1994) 545.
- [129] Schnettler R, Alt V, Dingeldein E, Pfefferle HJ, et al. Bone ingrowth in bFGF-coated hydroxyapatite implants, *Biomaterials* 24 (25) (2003) 4603-4608.
- [130] Bauer HJ, Bauer M, Dingeldein E. Zusammensetzung und Aufbau einer porösen Hydroxylapatitkeramik biologischer Herkunft, *Osteo. Int.* 2 (1994) 106-110.
- [131] Dard M, Bauer J, Liebendörfer A, Wahlig H, Dingeldein E. Préparation, évaluations physico-chimiques et biologiques, d'une céramique d'hydroxyapatite tissue de l'os de bovin, *Act. Odontostomat.* 185 (1994) 61-69.
- [132] Donath K, Breuner G. A method for the study of undecalcified bones and teeth with attached soft tissues. The Sage-Schliff (sawing and grinding) technique, *Oral Pathol.* 11 (4) (1982) 318-326.

- [133] Wang JS, Basic fibroblast growth factor for stimulation of bone formation in osteoconductive or conductive implants, *Acta Orthop. Scand. Suppl.* 269 (1996) 1-33.
- [134] Daculsi G, Passuti N. Effect of the macroporosity for osseous substitution of calcium phosphate ceramics, *Biomaterials* 11 (2) (1990) 86-87.
- [135] Martin RB, Chapman MW, Sharkey NA, Zissimos SL, et al. Bone ingrowth and mechanical properties of coralline hydroxyapatite one year after implantation, *Biomaterials* 14 (5) (1993) 341-348.
- [136] Lu JX, Flautre B, Anselme K, Hardouin P, et al. Role of interconnections in porous bioceramics on bone recolonization in vitro and in vivo, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 10 (1999) 111-120.
- [137] Klawitter JJ, Bagwell JG, Weinstein AM, Sauer BW, et al. An evaluation of bone growth into porous high density polyethylene, *J Biomed. Mater. Res.* 1976, 10 (2) 311- 323.
- [138] Holmes RE, Mooney V, Bucholz R, Tencer A. A coralline hydroxyapatite bone graft substitute, *Clin. Orthop.* 188 (1984) 252-262.

# LEBENS LAUF

## BERUFLICHER WERDEGANG

---

- Seit 2004** Merck KGaA, Darmstadt; Leiter der Herstellung im Bereich Liquidaproduktion
- 1997 - 2003** Biomet Merck BioMaterials GmbH, Darmstadt

## AUSBILDUNG

---

- 1994-1997** Merck KGaA Abteilung Biomaterial, Darmstadt  
Promotion unter der Betreuung von Prof. Dr. J. Kreuter, Pharmazeutische Technologie, Universität Frankfurt
- 1993** Praktikum im Zentrallabor der Deutschen Apotheker, Eschborn
- 1989-1993** Johann-Wolfgang-Goethe Universität, Frankfurt  
Studium der Pharmazie; Approbation im August 1993
- 1987-1988** Ausbildung zum Krankenpflegehelfer
- 1985-1986** Freiwilliges Soziales Jahr  
Evangelisches Diakoniekrankenhaus, Schwäbisch Hall
- 1985** Schule  
Erlangung der Allgemeinen Hochschulreife 1985 in Heilbronn

## FAMILIE

---

geboren am 17. Februar 1966 in Heilbronn  
verheiratet, 3 Kinder

---