

**"EINFLUß VON POLYMEREIGENSCHAFTEN AUF
PHARMAZEUTISCH-TECHNOLOGISCHE UND
BIOPHARMAZEUTISCHE EIGENSCHAFTEN VON
GEPREßTEN UND IN SITU GEFORMTEN IMPLANTATEN"**

Dissertation



zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat)

vorgelegt der

Mathematisch- Naturwissenschaftlich- Technischen Fakultät
(mathematisch- naturwissenschaftlicher Bereich)
der Martin-Luther-Universität Halle- Wittenberg

von Herrn Christoph Völkel

geb. am: 24.12.68 in: Leipzig

Gutachterin bzw. Gutachter:

1. Prof. Dr. habil. R. Neubert
2. Prof. Dr. habil. M. Dittgen
3. Prof. Dr. habil. K. Mäder

Datum der Verteidigung: 12.12.2003

urn:nbn:de:gbv:3-000006237

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000006237>]

"Non coerceri maximo, contineri tamen a minimo"

(Aus: Friedrich Hölderlin: Vorrede zum "Hyperion")

Meinem Vater gewidmet

Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand in der Abteilung Pharmazeutische Entwicklung der Jenapharm GmbH & Co. KG in Zusammenarbeit mit dem Fachbereich Pharmazie der Martin-Luther-Universität Halle- Wittenberg.

Für die Themenstellung der Arbeit, die hervorragende wissenschaftliche Betreuung, die vielen anregenden Diskussionen und Ideen und das große Interesse an meiner Arbeit danke ich meinem Betreuer und Doktorvater, Herrn Prof. Michael Dittgen, ganz herzlich.

Mein weiterer besonderer Dank gilt meinem Betreuer an der Martin-Luther-Universität, Herrn Prof. Reinhard Neubert, der durch seine Geduld, die ständige Bereitschaft zur Diskussion und Kooperation zum Gelingen der vorliegenden Arbeit beigetragen hat, und Herrn Prof. Karsten Mäder für die Begutachtung der Arbeit und seine spontane Zusage dazu.

Der Firma Jenapharm GmbH & Co. KG danke ich für ihre Unterstützung über diesen langen Zeitraum ab 1996. In besonderem Maße gilt mein Dank Frau Dr. Sabine Fricke, die es trotz oft schwieriger Umstände immer geschafft hat, die Motivation an wissenschaftlicher Arbeit im Tagesgeschäft aufrechtzuerhalten und immer ansprechbar für Probleme jeglicher Art war. Des weiteren danke ich Herrn Dr. Peter Hösel und allen Mitarbeitern der Abteilung Pharmazeutische Entwicklung, insbesondere Hagen Gerecke, Frau Karla Held, Beatrice Löbbus, Manuela Pfeifer und Inge Tarrach.

Weiterhin bedanke ich mich bei meinen Kollegen der Schering AG recht herzlich, stellvertretend seien Thomas Kränow, Roman Schiller, Frau Dr. Gabriele Winter und Andreas Ziemer genannt.

Ein weiterer Dank gilt den Mitarbeitern der Innovent e.V. Herrn Dr. Matthias Schnabelrauch, Herrn Dr. Sebastian Vogt und Frau Dr. Katrin Pawlik für die Synthese und erste Charakterisierung der modulierten Polylactide, die wesentliche Basis der vorliegenden Arbeit sind.

Ich bedanke mich bei der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Siegfried Wartewig für die Messung der FT-RAMAN- Spektroskopie recht herzlich.

Last but not least bedanke ich mich bei meiner Freundin Annett, meiner Familie und allen, die einen Teil zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Abkürzungsverzeichnis

CH	Cholesterol
Ch.-B.	Chargenbezeichnung
DLL	D,L-Lactid
DSC	Dynamische Differenz-Kalorimetrie
Firmenspez.	Firmenspezifikation
FT	Fourier Transfer
GL	Glycolid
GPC	Gelpermeationschromatografie
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatografie
Konz.	Konzentration
Ktr.-Nr.	Kontrollnummer
LL	L-Lactid
Ma%	Masseprozent
ME	L-(-)-Milchsäureethylester
MS	Massenspektrometrie
n.b.	nicht bestimmt
OD	1-Octadecanol
OH	Hydroxylgruppe
PD	Propan-1,2-diol
PEG	Polyethylenglycol
Ph.Eur.	Europäisches Arzneibuch
PLA	Polylactid
PLGA	Polylactid-co-glycolid
resp.	respektive
SBF	Simulated Body Fluid
theor.	theoretisch
THP	1,1,1-Tris(hydroxymethyl)-propan
WE/OH	Wiederholungseinheit pro Hydroxylgruppe des Startermoleküls

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG UND ZIELSTELLUNG	1
1.1	Parenterale Depotarzneiformen	1
1.2	Bioabbaubare Polymere	2
1.2.1	Bioabbaubare Polyester	2
1.3	Synthese der Polylactide und Polylactid-co-glycolide	4
1.4	Physiko-chemische Eigenschaften von Polylactiden und Polylactid-co-glycoliden	6
1.5	Herstellungstechnologien	9
1.6	Freisetzung von Wirkstoffen und Abbauverhalten von Polylactiden und Polylactid-co-glycoliden bzw. deren Formulierungen	11
1.7	Technologien zur kontrollierten Freisetzung von Proteinen	16
1.8	Cytochrom C	16
1.9	In-vitro-Freisetzungsmodelle für parenterale Depotarzneiformen	17
1.10	Zielstellung	19
2	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	
2.1	Charakterisierung der synthetisierten modulierten bioabbaubaren Polylactide	22
2.1.1	Aggregatzustand, Molmasse und FT-RAMAN-Spektroskopie der untersuchten Polylactide und Polylactid-co-glycolide	22
2.1.2	Ergebnisse der FT-RAMAN-Spektroskopie	25
2.1.3	Ergebnisse der Röntgendiffraktometrie	30
2.1.4	Ergebnisse der Dynamischen Differenz-Kalorimetrie (DSC)	33
2.1.5	Diskussion	37
2.2	Galenische Formulierbarkeit der modulierten Polylactide und Polylactide der Fa. Boehringer Ingelheim	42
2.2.1	Modulierte Polylactide und Polylactide der Fa. Boehringer Ingelheim zur Herstellung von gepreßten Implantaten, Verpreßbarkeit	42
2.2.2	Modulierte Polylactide und Polylactide der Fa. Boehringer Ingelheim zur Herstellung von in situ geformten Implantaten, maximal lösbar, maximal spritzbare Konzentration und In-situ-Implantatbildung	42
2.2.3	Diskussion	44
2.3	Zielkriterien für die kontrollierte Freisetzung aus den untersuchten Arzneiformen	45
2.4	Vorbetrachtungen zu den In-vitro-Freisetzungsuntersuchungen	47
2.4.1	Auswahl des Freisetzungsmediums	47

2.4.2	Stabilität von Cytochrom C im Freisetzungsmedium	47
2.4.3	Einfluß der Oberfläche der untersuchten Implantate	47
2.4.4	Adsorption / Immobilisierung von Cytochrom C	48
2.5	Untersuchungen zur In-vitro-Freisetzung von Cytochrom C aus gepreßten Implantaten (Ringtabletten)	49
2.5.1	Freisetzung bei Verwendung der Polylactide der Fa. Boehringer Ingelheim	49
2.5.2	Diskussion	50
2.5.3	Freisetzung bei Verwendung der modulierten Polylactide	51
2.5.3.1	Einfluß der Kettenlänge auf die Freisetzung	51
2.5.3.2	Einfluß des Polymertyps auf die Freisetzung	57
2.5.3.3	Zusammenfassende Diskussion	60
2.6	Untersuchungen zur In-vitro-Freisetzung von Cytochrom C aus in situ geformten Implantaten	62
2.6.1	Freisetzung aus in situ geformten Implantaten mit Polylactiden der Fa. Boehringer Ingelheim	63
2.6.2	Diskussion	64
2.6.3	Freisetzung aus in situ geformten Implantaten mit modulierten Polylactiden	64
2.6.3.1	Einfluß der Kettenlänge auf die Freisetzung	64
2.6.3.2	Einfluß des Konzentrationsverhältnisses PEG- moduliertes Polylactid auf die Freisetzung	71
2.6.3.3	Einfluß des Polymertyps auf die Freisetzung	73
2.6.4	Diskussion	75
2.7	Vergleich der Freisetzungen aus gepreßten und in situ geformten Implantaten und Diskussion der physiko-chemischen Parameter	77
2.8	Bioabbau ausgewählter modulierter Polylactide	80
2.8.1	Gewichtsverlust ausgewählter modulierter Polylactide	80
2.8.2	Wasseraufnahme ausgewählter modulierter Polylactide	82
2.8.3	Vergleich von Gewichtsverlust und Wasseraufnahme modulierter Polylactide	83
2.9	Gesamtdiskussion	84
3	EXPERIMENTELLER TEIL	86
3.1	Substanzen	86
3.1.1	Bioabbaubare Oligomere bzw. Polymere	86
3.1.1.1	Bioabbaubare Polymere der Firma Boehringer Ingelheim	86
3.1.1.2	Modulierte bioabbaubare Polymere	86
3.1.2	Sonstige Substanzen	89
3.2	Methoden	90

3.2.1	Molmassenbestimmung mittels Gelpermeationschromatografie	90
3.2.2	FT-RAMAN-Spektroskopie	91
3.2.3	Röntgendiffraktometrie	91
3.2.4	Dynamische Differenz-Kalorimetrie (DSC)	92
3.2.5	Ermittlung der maximal lösbaren Konzentration der Polylactide	93
3.2.6	Ermittlung der Spritzbarkeit der Polylactide	93
3.2.7	Beurteilung der In-situ Implantatbildung	94
3.2.8	Herstellung der in situ geformten Implantate mit Cytochrom C	94
3.2.8.1	Zusammensetzung	94
3.2.8.2	Herstellung	94
3.2.9	Herstellung der gepreßten Implantate (Ringtablette) mit Cytochrom C	94
3.2.9.1	Zusammensetzung	94
3.2.9.2	Herstellung	94
3.2.10	Apparatur zur In-vitro-Freisetzung von Cytochrom C und zur Stabilitätsbeurteilung von Cytochrom C	95
3.2.11	Bestimmung der kumulativen Freisetzung von Cytochrom C	96
3.2.12	Bestimmung der Wasseraufnahme und des Gewichtsverlusts	97
4	ZUSAMMENFASSUNG	98
5	LITERATURVERZEICHNIS	
6	ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS	

1 Einleitung und Zielstellung

1.1 Parenterale Depotarzneiformen

Parenterale Depotarzneiformen können einen Wirkstoffspiegel über längere Zeit (über Tage, Wochen oder sogar über Monate) konstant aufrecht erhalten [1]. Dies macht besonders bei der Behandlung chronischer Krankheiten bzw. Dauertherapien Sinn, z.B. der Chemotherapie, Hormonsubstitution, Bluthochdrucktherapie, Therapie mit Morphinantagonisten [2] oder auch der Immunisierung (z.B. Malariaprophylaxe). Ein Vorteil dieser Depotarzneiformen ist, dass die mit ihnen applizierten Wirkstoffe den Magen-Darm-Trakt und die Leberpassage umgehen. Dies ist besonders vorteilhaft für Proteine, die sehr kurze Halbwertszeiten, eine hohe Instabilität und oft eine geringe therapeutische Breite aufweisen.

Parenterale Depotarzneiformen können chemische, biologische und technologische Prinzipien für eine Verlängerung der Wirkdauer realisieren [3]. Möglichkeiten einer chemischen Modifizierung sind Prodrugs wie z.B. schwerlösliche Ester (Testosteronundecanoat, Estradiolvalerat) oder Komplexe (Zink-Insulin) oder auch gezielt ausgewählte Salze. Biologische Prinzipien gehen in den Bereich des „Drug Targeting“, sind aber noch unzureichend erforscht. Die bisherigen galenischen Prinzipien sind sehr vielfältig und reichen von der Verwendung von Einschlußverbindungen (Cyclodextrine), Kristallsuspensionen bis zur Formulierung öligem Lösungen, die ein sehr einfaches, aber schwer steuerbares Retardierungsprinzip für lipophile Wirkstoffe (z.B. Steroidhormone) darstellen. Das galenische Prinzip, das für die vorliegende Arbeit bedeutsam ist, basiert auf der Verwendung von Polymeren als Arzneiträger. Die Polymere können im Organismus unverändert bleiben oder abgebaut werden.

Sofern das Polymer abgebaut wird, soll es folgenden Anforderungen entsprechen:

1. es soll innerhalb eines endlichen Zeitraums im Körper abgebaut sein,
2. seine Abbauprodukte müssen toxikologisch unbedenklich sein,
3. das Polymer darf das umgebende Gewebe nicht irritieren oder reizen, da ansonsten wegen der zu erwartenden Immunreaktion eine kontrollierte Freigabe des Wirkstoffs nicht möglich ist.

1.2 Bioabbaubare Polymere

Bioabbaubare Polymere können Homopolymere oder Copolymere sein. Sie können im Körper enzymatisch oder nicht-enzymatisch in gewebeverträgliche und nicht-toxische Produkte abgebaut werden, die nach Metabolisierung oder unverändert eliminiert werden.

Bioabbaubare Polymere mit Bedeutung für parenterale Depotarzneiformen sind u.a. Albumine, Alginat, Cellulose-Derivate [4], Fibrine, Gelatine, Hyaluronsäure, Kollagene, Polyacrylate und Polycyanoacrylate [5], Polyamide, Polydioxanone, Polysaccharide, Polyanhydride, Polyethylenglycole, Polyorganophosphazene, Polyester wie Polylactide, Polylactid-co-glycolide, Polyglycolide, Polydioxanone, Poly- ϵ -caprolactone [6] oder Poly-(β)-hydroxybutyrate, Poly(ortho)ester, Polyvinylalkohole, Polytartrate, Polyurethane, Polyvinylpyrrolidone und Polycarbonate (siehe Übersicht bei Gombotz und Pettit [7]).

Relevant für die vorliegende Arbeit sind bioabbaubare Polyester und insbesondere Polylactide und Polylactid-co-glycolide.

1.2.1 Bioabbaubare Polyester

Die z.Zt. verwendeten bioabbaubaren Polyester sind Polyorthoester, Polylactide und Polylactid-co-glycolide, Polyglycolide, Poly- β -hydroxybutyrate, Poly-caprolactone und Polydioxanone (siehe Hastings [8] und Gombotz et al. [7]).

Sie werden im medizinischen und pharmazeutischen Bereich als Nahtmaterial, Hilfsmittel für die Blutstillung, zum Gefäßverschluss, für temporäre Prothesen, zur Gewebeverklebung, bei der Behandlung von Knochenfrakturen oder eben als Hilfsstoff für parenterale Depotssysteme verwendet.

Die gebräuchlichen Polylactid-co-glycolide bieten eine Reihe von Variationsmöglichkeiten hinsichtlich des Abbauverhaltens, z.B. durch die Wahl der Enantiomere und/oder durch unterschiedliche Verhältnisse von Lactid und Glycolid sowie die Wahl unterschiedlicher Endgruppen [1]. Polylactide sind mit anderen degradablen Monomeren zu Blockpolymeren kombinierbar [9, 10, 11] oder durch Zusatz von Hilfsstoffen modifizierbar [12]. Sie sind pharmakokinetisch und toxikologisch am besten untersucht [13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20], wobei der Bioabbau zu den Monomeren die entscheidende Reaktion im Körper darstellt [21, 22, 23, 24, 25]. Das Abbauprodukt von Polylactid ist die Milchsäure. Sie ist ein Zwischenprodukt im Kohlenhydratabbau und in allen Geweben enthalten. Die L-

Milchsäure wird endgültig im Citrat-Zyklus zu Wasser und Kohlendioxid abgebaut, während die D-Form nichtmetabolisiert ausgeschieden wird.

Polyglycolid wird über Glycolsäure und weiter durch Glycolat-Oxidase und die Glycin-Transaminase zu Glycin metabolisiert.

Poly lactide, Polyglycolide und Poly lactid-co-glycolide dienen bereits als Hilfsstoffe in einer Reihe von zugelassenen Präparaten [3, 24] (siehe Tabelle 1).

In Tabelle 1 sind die auf dem Arzneimittelmarkt befindlichen Präparate auf Basis bioabbaubarer Polymermatrices aufgelistet.

Tabelle 1: Wirkstoffe und Handelsnamen parenteraler Depotarzneiformen verschiedener Hersteller, die auf bioabbaubaren Polymeren basieren

Handelsname	Hersteller	Arzneiform	Polymer	Wirkstoff
Decapeptyl [®] Depot	Ferring	Mikropartikel	PLGA (1:1)	Triptorelinacetat
Decapeptyl [®] Gyn	Ferring	Mikropartikel	PLGA (1:1)	Triptorelinacetat
Enantone [®] Gyn Monats-Depot	Takeda/ Grünenthal	Mikropartikel	PLGA (3:1)	Leuprorelinacetat
Parlodel [®]	Novartis	Mikropartikel	PLGA (3:1)	Leuprorelinacetat
Parlodel [®] LAR	Novartis	Mikropartikel	PLA	Bromocriptin
Profact [®] Depot	HMR AG	Implantat	Glu-PLGA (Sternpolymer)	Bromocriptin
Trenantone [®]	Takeda/ Grünenthal	Mikropartikel	PLGA	Buserelinacetat
Zoladex [®]	Zeneca	Implantat	PLGA (1:1)	Goserelinacetat
Zoladex [®] 10,8	Zeneca	Implantat	PLGA (5:95)	Goserelinacetat
Zoladex [®] Gyn	Zeneca	Implantat	PLGA (1:1)	Goserelinacetat

Sofern es sich um Implantate handelt, ist die Gewebeverträglichkeit ein weiterer wesentlicher Faktor für mögliche Fremdkörperreaktionen. Andererseits kann das Polymer durch sein Quellverhalten mechanische Irritation des umgebenden Gewebes hervorrufen. Zur Evaluierung der Biokompatibilität werden zumeist histologische Untersuchungen herangezogen [20].

1.3 Synthese der Polyactide und Polyactid-co-glycolide

Polyactide können durch direkte Polykondensation (Abbildung 1) oder Ringöffnungspolymerisation (Abbildung 2) der zyklischen Diester dargestellt werden.

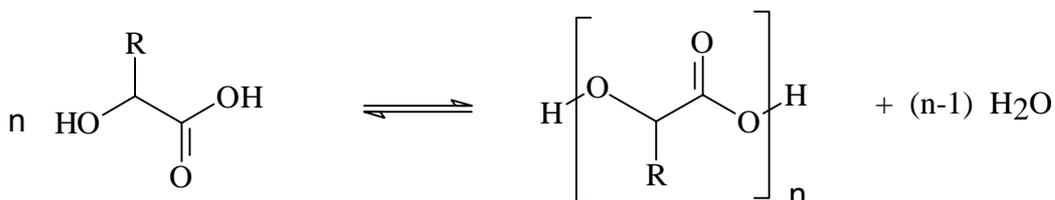


Abbildung 1: Synthese von Polyactiden durch direkte Polykondensation

Die Polykondensation führt allerdings nur zu kurzkettigen Polymeren mit einer Molmasse < 5.000 [26] bzw. bis zu 10.000 g/mol [27].

Polymere mit höheren Molmassen werden durch Ringöffnungspolymerisation (Abbildung 2) hergestellt.

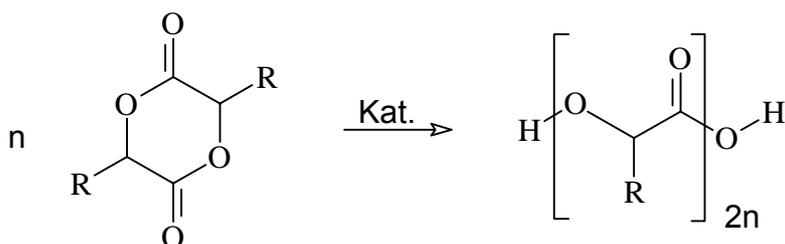


Abbildung 2: Synthese von Polyactiden durch Ringöffnungspolymerisation

Kommerziell verfügbar sind heute neben den reinen Homopolymeren Poly-L-lactid, Poly-D,L-lactid und Polyglycolid auch die Copolymere von L- und D,L-Lactid sowie von D,L-Lactid und Glycolid. Ausgangsstoff ist üblicherweise das L-Lactid [28, 29, 30] bzw. das racemische D,L-Lactid [28, 31, 29, 32, 30]. Das Glycoliddimer zeigt eine etwa 15-fach höhere Anlagerungsgeschwindigkeit als das Lactid. Kettenlänge und Molmassenverteilung werden durch die Konzentration des Initiators in der Reaktionsmischung sowie durch Temperatur und Reaktionsdauer beeinflusst. Die Ringöffnungspolymerisation ermöglicht so die Synthese über einen sehr weiten Molmassenbereich. Als Katalysatoren werden üblicherweise metallisches Zink, Diethyl-Zink [33], Zinkoxid, Zink-(II)-L-lactate, Zink-(II)-L-mandelat, Zink-(II)-stearat und andere Zink-Salze (ZnCl_2 , ZnBr_2 , ZnI_2)[34], Zinn-octoat, Tetraphenyl-Zinn [35], Trialkylaluminium-Verbindungen, Antimontrifluorid [33] oder p-Toluol-sulfonsäure [36]

verwendet und beschrieben. Als Starter oder Kettenlängenmodulator wird oft Laurylalkohol [37] zugesetzt.

Die Konfiguration am asymmetrischen C-Atom bleibt bei diesen Katalysatoren erhalten. Es wird somit beim Einsatz von D,L-Lactid ein isotaktisches Polymer erhalten, beim Einsatz des meso-Lactids ein syndiotaktisches Polymer.

Die Polymere werden gewöhnlich in unpolaren organischen Lösungsmitteln (Chloroform, Methylenchlorid, Dioxan oder Aceton) gelöst und durch Umfällung in Wasser, Hexan oder Methanol gereinigt und im Vakuum getrocknet.

Polymerfraktionen mit enger Molekulargewichtsverteilung lassen sich durch fraktionierte Fällung erhalten [79].

Es werden nicht nur Copolymere mit Glycolsäure, sondern auch mit einer Vielzahl anderer Polymerbausteine beschrieben. Weit verbreitet sind solche mit Polyethylenglycolen, aber auch mit Methoxy-polyethylenglycolen [38], um die vorliegenden Polymere hydrophiler zu machen und somit den Polymerabbau und die Art des Abbaus über den gezielten Einbau solcher Segmente steuern zu können [1, 39, 40]. Es sind aus der Kombination aus Polyethylenglycolen und Poly-L-lactiden Polymere darstellbar, die als thermosensitive, bioabbaubare Hydrogele verwendet werden können und somit auch ein Implantationsprinzip sind [41, 42]. In jüngerer Zeit werden immer häufiger Triblock-Copolymere beschrieben, die hinsichtlich ihrer physiko-chemischen Eigenschaften (hydrophile und lipophile Zentren im Molekül) nochmals Vorteile bieten, z.B. zur Herstellung von Mikrosphären. Es ist aber auch möglich, durch gezielte Synthese von einzelnen, unterschiedlichen Polymerbausteinen zu neuen Blockpolymeren zu gelangen. Rothen-Weinhold et al. [43] lassen Diketenacetale, Dirole und substituierte Lactide oder Glycolide reagieren und haben aufgrund der Wahl der Einzelkomponenten die Möglichkeit, die Freisetzung von inkorporierten Proteinen gezielt zu steuern.

Es wurden bereits „biomimetische“ Materialien synthetisiert, die ein „Andocken“ von biologisch aktiven Molekülen über sogenannte Spacer ermöglichen sollen. Diese aktiven Endgruppen an den Copolymeren, die aus einem wasserunlöslichem Teil (Polylactid) und einem hydrophilen Block (Polyethylenglycol) zusammengesetzt sind, werden mit Wirkstoffen, u.a. auch Proteinen, kovalent verbunden [44].

Verwendet man aber beispielsweise Startermoleküle mit mehreren reaktiven Zentren, sind verzweigte bzw. Sternpolymere darstellbar. Diese sind bereits von ihrer Synthese her beschrieben wurden. Ob sie sich durch besondere physiko-chemische Eigenschaften auszeichnen, die sie für die Arzneiformung interessant machen, ist

bisher noch nicht systematisch untersucht. So sollte sich durch Wahl des jeweiligen Startermoleküls die Kristallinität und das Schmelzverhalten des Polymers gezielt steuern lassen. Als Startermoleküle sind beispielsweise kurzkettige hydroxylierte Alkohole, Glycerole oder andere Verbindungen möglich. Diese sollten jedoch ebenfalls physiologisch unbedenklich sein.

Es ist bisher noch offen, welchen Einfluß diese Startermoleküle auf den Aufbau des entstandenen Polymers, deren Eigenschaften und damit für die Eignung in verschiedenen parenteralen Arzneiformen ausüben.

1.4 Physiko-chemische Eigenschaften von Polylactiden und Polylactid-co-glycoliden

Reines Poly-L-lactid ist teilkristallin und besitzt nach Gilding und Reed [37] einen kristallinen Anteil von bis zu 37 %. Amorphes L-Lactid kann durch schnelles Abkühlen von geschmolzenem Polymer erhalten werden [45]. Die Teilkristallinität wird von Rafler et al. [46] mit der Isotaktizität der Polymerketten begründet, die eine Ordnung der Polymerketten eher zulassen als in einem Poly-D,L-lactid, das in amorpher Form vorliegt. Sie stellten weiterhin fest, dass die Viskosität einer Lösung von Poly-L-lactid in Chloroform gegenüber einer Lösung von Poly-D,L-lactid vergleichbarer Molmasse signifikant erhöht ist. Auch dies wurde mit der Isotaktizität des Polylactids begründet.

Polyglycolid ist dagegen teilkristallin mit einem kristallinen Anteil von 46 – 52 %. Die Copolymere von D,L-Lactid und Glycolid sind amorph bis zu einem Glycolidanteil von 70 %, bei der Verwendung von L-Lactid und Glycolid liegt der amorphe Bereich bei einem Glycolidanteil von 25 – 70 %.

Die Glasübergangstemperatur (T_g) von Polylactiden steigt nach Cohn et al. [47] ebenso wie der Schmelzpunkt mit steigender Kettenlänge. Für Polyglycolid wurde eine Glasübergangstemperatur von 10 - 42 °C und ein Schmelzpunkt von 187 - 222 °C, für Poly-L-lactid eine Glasübergangstemperatur von 38 - 56 °C und ein Schmelzpunkt von 135 - 170 °C je nach Kettenlänge ermittelt. Omelczuk und McGinity [48] sowie Jamshidi [49] fanden für Poly-D,L-lactid einen linearen Zusammenhang zwischen dem reziproken Wert des zahlenmittleren Molekulargewichts und der Glasübergangstemperatur. Andere [50] fanden einen linearen Zusammenhang zwischen dem Glasübergang von Poly-D,L-lactiden und dem Logarithmus der Molmasse. Ab einer mittleren Molmasse von 92.000 g/mol wurde jedoch nur noch eine geringfügige Erhöhung der Glasübergangstemperatur

mit steigender Kettenlänge festgestellt. Für Polylactid-co-glycolide ergeben sich Glasübergänge, die zwischen denen von Polylactid und Polyglycolid liegen. Wechselwirkungen verschiedener Art (Salz-, Komplexbildung) zwischen den Wirkstoffen und den funktionellen Gruppen des Polymers können darüber hinaus die Glasübergangstemperatur beeinflussen [51, 52, 53].

Die Bestimmung der Molmasse von Polylactiden und Polylactid-co-glycoliden ist mit einer Vielzahl verschiedener Methoden möglich. Dazu zählen beispielsweise selten verwendete wie Dampfdruck- und Membranosmose, Kryoskopie, Lichtstreuung und Sedimentation, aber auch die in der Praxis am häufigsten angewandten Methoden der Viskosimetrie und der GPC. Des Weiteren wird für niedermolekulare Polymere die Titration der sauren Endgruppen beschrieben [50, 54, 55, 56, 57,].

Von Herstellern von Polylactiden bzw. deren Copolymeren (Boehringer Ingelheim, Birmingham Polymers, DuPont, ICI) wird zur Qualitätsbeurteilung die inhärente Viskosität angegeben, die in geringer Konzentration in geeigneten Lösungsmitteln bestimmt wird und sich nach Gleichung (1) berechnet:

$$\eta_{\text{inh}} = \frac{(\ln \frac{\eta}{\eta_0})}{c} \quad (1)$$

η_{inh}	inhärente Viskosität [dl/g]
c	Konzentration der Polymerlösung [g/dl]
η	Viskosität der Polymerlösung [g/dl]
η_0	Viskosität des reinen Lösungsmittels [g/dl]

Zur Bestimmung der Molmasse und der Molmassenverteilung eignet sich besonders die GPC [32, 48, 51, 52, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 74, 77, 132]. Das Trennverfahren beruht auf dem unterschiedlichen hydrodynamischen Verhalten der Moleküle einer Probe, wobei die Chromatografie mit einem Standard, meist Polystyrol, geeicht werden muß. Ermittelt werden hierbei die zahlenmittlere Molmasse M_n und die gewichtsmittlere Molmasse M_w . Der Quotient aus M_w und M_n wird als Polydispersität (I) bezeichnet und dient zur näheren Quantifizierung der Breite der Molmassenverteilung. Die Präzision dieser Methode läßt sich durch die Reihenschaltung zweier Gelpermeationssäulen und die Erfassung mit RI- und ELS („evaporative light scattering“)- Detektor erhöhen [69].

Die Copolymerzusammensetzung lässt sich bei Polylactid-co-glycoliden mittels ^1H -NMR-Spektroskopie ausreichend genau bestimmen [70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78]. Die stereochemische Zusammensetzung von Poly-D,L-lactiden lässt sich durch Messung der optischen Drehung ermitteln [71, 77, 79, 80, 81, 82]. Die Verteilung der Copolymerbausteine und die mittlere Blocklänge von Homopolymerketten im Copolymer ist mittels ^{13}C -NMR-Spektroskopie bestimmbar [58, 72, 77, 80, 83, 84], auch sind ^1H -NMR-spektroskopische Methoden zur Sequenzermittlung von reinem Polylactid beschrieben [85, 86].

Durch röntgendiffraktometrische Messung kann man das Verhältnis von kristallinen und amorphen Bereichen ermitteln [87].

Poly-D,L-lactid ist in chlorierten Kohlenwasserstoffen, Aceton und Dimethylformamid löslich [46]. Die Löslichkeit der Copolymere nimmt mit steigendem Glycolidanteil und folgender Lösungsmittelreihenfolge ab: Hexafluoroisopropanol, Dimethylformamid, Chloroform, Dichlormethan und Aceton. Reines Polyglycolid ist nur in Hexafluoroisopropanol löslich.

Reines Poly-L-lactid und Polyglycolid zeigen aufgrund ihrer Teilkristallinität eine geringere Wasseraufnahme als die amorphen Poly-D,L-lactide [88]. Die Wasseraufnahme der Copolymere steigt mit wachsendem Glycolidanteil [37].

Die kommerziell verfügbaren Polylactide und Polylactid-co-glycolide decken aber nur einen geringen Teil des durch die Ringöffnungspolymerisation möglichen Spektrums hinsichtlich des Molekulargewicht und der chemischen Struktur des Polymers ab. Daraus leitet sich auch ein ähnlicher physiko-chemischer Charakter dieser Produkte ab, der sehr eingehend untersucht ist.

Weicht man allerdings von diesen Grundstrukturen ab, sollten sich neue, bisher noch nicht bekannte Phänomene bezüglich der Physikochemie auftun, die Ansätze für intensive Untersuchungen bieten.

1.5 Herstellungstechnologien

Für die Herstellung parenteraler Depotarzneiformen auf Basis bioabbaubarer Polymere gibt es verschiedenartige Technologien, die in Tabelle 2 dargestellt sind.

Tabelle 2: Möglichkeiten der Arzneiformung auf Basis bioabbaubarer Polymere

Typ der parenteralen Depotarzneiform	Herstellungstechnologie / Herstellungsmethode	Literatur (Quelle)
Implantate	Filmen	89, 90
	Extrusion	91
	Schmelzpressen	21, 92, 93, 94
	Gefriertrocknung	95, 96
	Tablettierung	118, 119
	In situ Formung	41, 97, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126
Mikrospheren, Mikropartikel, Nanospheren	Sprühtrocknung („Spray drying“)	98, 99, 100, 101, 102
	Phasenseparation (Koazervation)	103, 104, 105, 106
	Lösungsmittelverdunstung („Solvent Evaporation Technique“) (z.B. O/W-Emulsion, W/O/W-Emulsion)	6, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116
	Aussalzung	117
	Schmelzmethode	55

Voraussetzung für jede Herstellungsmethode ist, dass eine homogene Verteilung des Wirkstoffs erreicht wird und dieser auch während der Herstellung hinreichend stabil bleibt. Daher kommen für hydrolyse- bzw. temperatursensible Wirkstoffe nur bestimmte Verfahren in Frage.

Die am meisten verwendete Technologien führen zur Herstellung von Mikropartikeln, Mikrospheren und Nanospheren, die durch verschiedene Methoden zugänglich sind (siehe Tabelle 2). Bei jeder dieser Methoden sind durch gezielte Wahl von Prozeßparametern verschiedene Varianten beschrieben, die eine gezielte Herstellung der jeweiligen Arzneiformen zulassen (siehe Tabelle 2). Es lassen sich unterschiedliche Partikelgrößen und Wirkstoffgehalte erzeugen.

Implantate, die durch Verpressung bzw. Extrusion hergestellt werden, haben den Nachteil, dass sie mit Hilfe eines chirurgischen Eingriffs in den Körper eingebracht werden müssen. Implantat-Tabletten lassen sich durch Verpressung von Trocken-

mischungen der Wirk- und Hilfsstoffe oder von Mikrokapseln herstellen. Kader et al. [118] vergleichen solche Herstellungstechnologien und stellen fest, dass die Freisetzung aus den Mikrokapsel-Tabletten deutlich verzögert ist. Steendam et al. [119] benutzen Poly-D,L-lactide als Hilfsstoffe zur Direktverpressung, um freisetzungsgesteuerte Tabletten herzustellen. Sie bescheinigen gute Fließ-eigenschaften, einen nicht-porösen Charakter der einzelnen Partikel und die hohe plastische Verformbarkeit als Resultat der Direktverpressung.

Eine weitere vielversprechende Methode zur Bildung bioabbaubarer Formen ist die in situ Inkorporation von Wirkstoffen durch Immobilisierung (Precipitation) des Polymers. Dabei werden Lösungen oder Suspensionen von bioabbaubarem Polymer und Wirkstoff durch Injektion in wässrige Medien eingebracht, wo die Polymere zur spontanen Ausfällung neigen und den Wirkstoff so einschließen [120, 121, 122, 123, 124]. Als Lösungsmittel für die bioabbaubaren Polymere eignen sich Lösungsmittel wie Glycofurol [125], Dimethylsulfoxid [121] oder N-Methylpyrrolidon [126, 120]. Thermosensitive, bioabbaubare Hydrogele auf Basis von Poly(ethylene-oxid)-Polylactid-Blockpolymeren sind aufgrund des reversiblen Gel-Sol-Übergangs der wässrigen Lösung in der Lage, bei Körpertemperatur, also nach Injektion, eine kontrolliert freisetzende Arzneiform in situ auszubilden [126]. Bei 45 °C liegt das Hydrogel in einem Solzustand vor, der nach Abkühlen im Körper in den Gelzustand übergeht. Der große Vorteil dieser In-situ Implantate ist, dass sie direkt an den Wirkort applizierbar sind. Des weiteren müssen sie nicht über ein problematisches Sterilisationsverfahren (Ethylendioxid, β - oder γ - Sterilisation), sondern können möglicherweise durch Sterilfiltration sterilisiert werden.

Zweifellos stellt diese Herstellungstechnologie eine sehr innovative und zukunftsweisende Methode zur Arzneiformung und gleichzeitigen Applikation von Wirkstoffen dar. Bisher ist jedoch nur ein Teil der in Frage kommenden bioabbaubaren Polymere und der Lösungsmittel untersucht wurden, um diese Technologie weiter zu durchdringen und damit zu Verbesserungen und Steuerungsmöglichkeiten zu gelangen.

Die Fragestellung, die sich daraus ergibt, ist, ob es sinnvoller erscheint, neue bioabbaubare Polymere, vorzugsweise natürlich abgeleitet von den bekannten und vielfach verwendeten Klasse der Polylactide und Polylactid-co-glycolide zu untersuchen oder den Fokus auf die Suche nach neuen Lösungsmitteln zu richten. Beide Ansätze sollten gleichermaßen interessant sein, sofern eine kontrollierte Freisetzung aus den in situ geformten Implantaten erzielt wird.

1.6 Freisetzung von Wirkstoffen und Abbauverhalten von Polylactiden und Poly(lactid-co-glycolid)en bzw. deren Formulierungen

Die Freisetzung von Wirkstoffen aus parenteralen Depotarzneiformen auf Basis bioabbaubarer Polymere ist vom Typ der Arzneiform und dem Diffusions- und Abbauverhalten der verwendeten Polymere abhängig (Abbildung 3)

Prinzipiell kann man zwei Typen von Freigabesystemen unterscheiden:

- solche, die den Wirkstoff mit einer Hülle umgeben = „Reservoir-Typ“ [a]
- solche, in der der Wirkstoff homogen verteilt als Dispersion = „solid dispersion“ [b] oder gelöst = „solid solution“ [c] vorliegt.

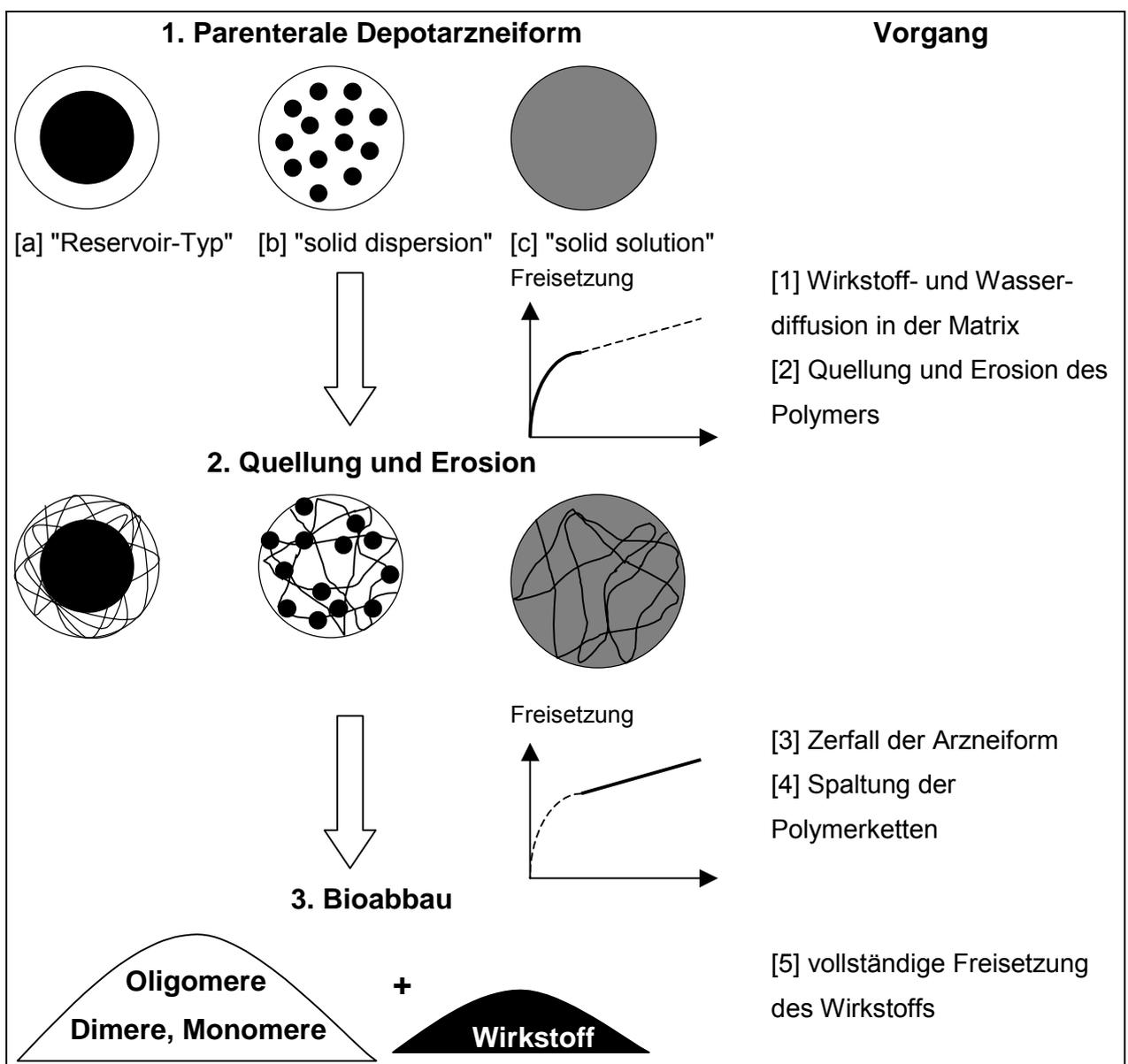


Abbildung 3: Freisetzung und Abbau von parenteralen Depotarzneiformen auf Basis bioabbaubarer Polymere, schematisch unter Berücksichtigung von Literaturangaben [127, 128]

Grundsätzlich kann man feststellen, dass sich die Prozesse [1] bis [4] überlagern und so zum Freisetzungsprofil bis zur vollständigen Freigabe des Wirkstoffs [5] aus der jeweiligen Formulierung beitragen. Welchen Einfluß die Teilprozesse auf die Freisetzung ausüben, wird in Abbildung 4 verdeutlicht. Aufgrund der Überlagerung der Prozesse ist das Freisetzungsverhalten aus Polymeren schwer vorherzusagen und zu steuern [129].

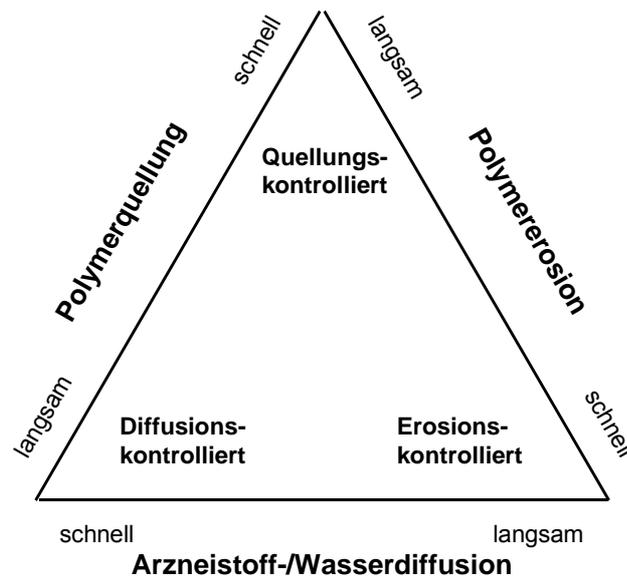


Abbildung 4: Einfluß von Wasser- und Wirkstoffdiffusion, Erosionsgeschwindigkeit und Quellungsverhalten des Polymers auf den Freisetzungsmechanismus aus einer parenteralen Depotarzneiform (aus [129])

Es kann zwischen zwei Erosionsprozessen von Matrices (Abbildung 3 – [2]) differenziert werden:

1. Beim Abbau von der Oberfläche aus („Surface Erosion“) geht der Polymerabbau schneller vonstatten als das Eindringen von Wasser in die Matrix, so dass Quellungsvorgänge eine untergeordnete Rolle spielen und das Polymer von der Oberfläche her abgebaut wird.
2. Beim Quellungsabbau („Bulk Erosion“) findet eine schnelle Wasseraufnahme in die Matrix statt, das Polymer quillt und wird innerhalb der gesamten Matrix abgebaut.

In Polylactid- und Polylactid-co-glycolid-Matrices findet eine „Bulk Erosion“ statt [129]. Der Abbau der Polylactide erfolgt nach der Wasseraufnahme in das Depot und anschließender Quellung durch Hydrolyse der Esterbindungen, enzymatische

Prozesse spielen bei der Degradation keine Rolle [129] bzw. werden kontrovers diskutiert. Nach Heller [130, 131] können 3 Mechanismen unterschieden werden:

1. Spaltung von Quervernetzungen,
2. Hydrolyse, Ionisation oder Protonierung von Seitengruppen und
3. Spaltung von Ketten.

Von Pitt et al. und anderen wird eine Abbaukinetik beschrieben, die auf der Autokatalyse der durch den Abbau erzeugten Carboxylgruppen beruht [21, 132, 133, 134, 135]. Einen säure-katalytischen Mechanismus vorausgesetzt, ist die Geschwindigkeitskonstante k der hydrolytischen Bindungsspaltung eines Polyesters wie folgt definiert:

$$\frac{d[-\text{COOH}]}{dt} = k * [-\text{COOH}] * [\text{Ester}] * [\text{H}_2\text{O}] \quad (2)$$

$[-\text{COOH}]$	Konzentration freier Carboxylgruppen [%]
$[\text{Ester}]$	Konzentration der Estergruppen [%]
$[\text{H}_2\text{O}]$	Konzentration des Wassers [%]

Als Folge der steigenden Zahl freier Carboxylgruppen sinkt der pH-Wert, und die Wasseraufnahme ist aufgrund der zunehmenden hydrophilen Endgruppen erhöht. Zunächst wird nur die Molmasse der Polymere reduziert. Es bilden sich Oligo- und Monomere (Abbildung 3 - [4]), die ab einer Molmasse von ca. 1.100 g/mol wasserlöslich sind und diffusionskontrolliert abtransportiert werden [136]. Gleichzeitig setzt ein Massenverlust in dem Polymerkörper ein. Dies führt zu einer verstärkten Porenbildung, einer gesteigerten Wasseraufnahme und zu einem gesteigerten Abbau. Durch die Autokatalyse und der größeren Diffusionsbehinderung in dem Polymerkörper findet der Abbau bevorzugt im Inneren der Matrix statt, so dass der Polymerkörper lange seine Gestalt behält.

Poly-L-lactid ist das am langsamsten abbauende Polymer aufgrund der stark reduzierten Wasseraufnahme im Vergleich zu den Copolymeren. Die kristallinen Teilbereiche sind so einer hydrolytischen Spaltung nicht zugänglich, so dass sich Poly-L-lactid über einen Zeitraum von mehreren Monaten bis Jahren abbaut [77]. Die Kristallinität nimmt während des Abbaus durch die erleichterte Kristallisation kürzerkettiger und durch den Verlust wasserlöslicher Abbauprodukte aus amorphen Bereichen zu [45, 132, 137, 138].

Die Wasseraufnahme erfolgt bei Formulierungen mit Poly-D,L-lactiden über den gesamten Querschnitt ohne Quellungsfront [52]. Sie nimmt mit sinkender Molmasse und steigendem Oligomeranteil zu. Basische pH-Werte fördern die Wasseraufnahme und das Quellungsverhalten [52]. Nach Rafler und Jobmann [46] sind die wesentlichen chemischen Faktoren beim biologischen Abbau das Verhältnis von spaltbaren Esterbindungen zu hydrolytischen stabilen Esterbindungen sowie die Zugänglichkeit der spaltbaren Bindungen für Wasser. Die Zugänglichkeit der spaltbaren Estergruppen wird durch struktur- und morphologische Parameter definiert. Dies können sterische Behinderungen sein wie z.B. die Nachbarschaft von Alkylgruppen (Methylgruppe bei Polylactid). Hydrophile und hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den Polymerketten sowie Quellungsvorgänge in der Polymermatrix sind ebenso von Bedeutung wie die Transportkapazität des Wassers oder gelöster Wirkstoffe in dem Polymer. Die Reaktionskonstante der Hydrolysereaktion und die Effektivität katalytischer und autokatalytischer Prozesse ist ferner zu berücksichtigen.

Poly-D,L-lactid zeigt aufgrund seines amorphen Charakters eine erhöhte Wasseraufnahme und wird über einen Zeitraum von mehreren Wochen bis Monaten abgebaut. Mit zunehmender Hydrophilie durch einen wachsenden Glycolidanteil ist die Abbaurate, bei Bewahrung des amorphen Charakters, bei diesen Copolymeren verkürzt [139]. Dies ist durch einen Zuwachs in der Zahl der spaltbaren Esterbindungen des Glycolids zu erklären. Das bedeutet, dass durch die Variation der Monomerbausteine das Abbauverhalten von Polymeren eingestellt werden kann [11, 132, 140]. Mit abnehmender Zahl an spaltbaren Estergruppen und zunehmender Zahl an Methyl- und Alkylnebengruppen ist die Hydrolyse verlangsamt [141].

Poly-D,L-lactide mit geringen Molmassen werden schneller abgebaut als solche mit höherer, da die Konzentration an Carboxylgruppen größer ist [50, 142]. Darüber hinaus liegt der Glasübergang bei höhermolekularen Poly-D,L-lactiden über 37 °C.

Bei Polyglycoliden kommt es während der Wasseraufnahme ebenfalls zur Ausbildung von kristallinen Bereichen, in die das Wasser fast nicht eindringen kann und die somit den Abbau stark verzögern [77].

Temperaturerhöhungen führen zu deutlichen Anstiegen der Abbaurate von Polylactiden [28, 134, 143, 144, 145, 146]. Schellhorn et al. [21] untersuchten die Abbaukinetik diverser Polylactide und Copolymere bei unterschiedlichen Temperaturen in wässrigen Medien. Unterhalb des Glasübergangs kann es zu einem Ausbleiben der Hydrolyse kommen [136, 143, 146]. Sehr hohe und sehr niedrige pH-

Werte fördern den schnellen Abbau von Poly-L-lactiden [147, 148], während der pH-Einfluß bei Poly-D,L-lactiden als durchaus niedrig einzustufen ist [52].

Die Zugabe von Oligomeren oder Weichmachern führten meistens zu einer Abnahme der Glasübergangstemperatur und somit über eine beschleunigte Wasseraufnahme zu einem verstärkten Polymerabbau [50, 52, 149, 150].

Über den Einfluß von inkorporierten Proteinen ist sehr wenig bekannt. Es wurde jedoch gefunden, dass Plasma-Proteine wie Albumin, γ -Globuline oder Fibrinogene den Polylactid-Abbau in Mikrokapseln beschleunigen, sofern sie den wäßrigen Freisetzungsmedien zugesetzt werden [151].

Bei den Polylactid-co-glycoliden erhält man insbesondere bei Peptideinbettungen ein triphasisches Freisetzungsverhalten [152]. Bei der initialen hohen Freisetzung ("Initial burst" Effekt) werden die auf der oder in der Nähe der Oberfläche befindlichen Wirkstoffmoleküle freigesetzt. Im darauffolgenden Zeitabschnitt wird nur sehr wenig Wirkstoff abgegeben aufgrund der schlechten Diffusionsmöglichkeit des Wirkstoffs durch die Polymermatrix. Erst mit einsetzender Erosion wird die Liberation durch die sich ausbildenden Porenvolumina wieder beschleunigt.

Die Freisetzung hängt von folgenden polymerbasierten Eigenschaften ab: Aso et al. [143] konnten zeigen, dass der Molekulargewichtsverlust bei Freisetzungen über der Glasübergangstemperatur wesentlich schneller erfolgt als bei einem Glasübergang, der idealerweise über 37 °C liegt. Demzufolge kann die kontrollierte Freisetzung nur über die Oberflächenerosion gesteuert werden.

Interessant in diesem Zusammenhang ist allerdings die Frage, inwieweit verschiedene Arzneiformen das Abbauverhalten der sie enthaltenen bioabbaubaren Polymere beeinflussen. Es wurden bereits Untersuchungen dazu durchgeführt [118], man kann jedoch bis jetzt noch nicht von einer systematischen Durchdringung des Problems sprechen. Dazu ist die Zahl der parenteralen Depotarzneiformen und deren verschiedenen Herstellungstechnologien zu groß. Bei einigen sind die Zusätze weiterer Hilfsstoffe von großer Bedeutung (z.B. Nanopartikel, In situ geformte Implantate), bei anderen sind technologische Parameter sehr wichtig (z.B. Mikropartikel, Schmelzextrudate).

1.7 Technologien zur kontrollierten Freisetzung von Proteinen

In der Literatur sind eine Vielzahl von Arzneiformen (vgl. auch Tabellen 1 und 2) beschrieben, die eine sehr große Varianz aufweisen, was die Wahl des Proteins als auch die des bioabbaubaren Polymers betreffen. Es werden sowohl Modellproteine wie Cytochrom C [1], verschiedene Albumine [115, 153, 154], Dextrane [155], Lysozym u.a. als auch hochwirksame Wirkstoff-Peptide wie z.B. Cytokine [156, 157], Calcitonin [158], Insulin [159], Peptidhormone [107, 142, 159, 160, 161, 162, 163, 164] und Impfstoffe [9, 165, 166, 167] verwendet. Cytochrom C beispielsweise eignet sich aufgrund seiner Molekülgröße im mittleren Molmassenbereich, der leichten und reproduzierbaren Analytik, der reinen Qualität und der guten Verfügbarkeit durch die Hersteller besonders.

Auch Hydrogele eignen sich besonders für die kontrollierte Freisetzung von Proteinen, wobei die Freisetzung durch die Vernetzungsdichte und den Hydratationsgrad des Polymers gesteuert werden kann [168].

Proteine neigen zur Denaturierung und Aggregation bei Kontakt mit Wasser, was zu Problemen während des Mikroverkapselungsvorgangs aber auch während der Freisetzung führen kann. Alternative Polymerzusammensetzungen, die dies verhindern, eignen sich also besonders.

Des Weiteren ist der Einfluß der Readsorption der Proteine an die Polymeroberfläche zwar schon diskutiert worden, es liegen jedoch noch zu wenig Erkenntnisse vor, wie dieses Phänomen effektiv unterbunden werden kann, um eine konstante Freisetzung zu gewährleisten. Zu klären wäre, ob die Möglichkeit besteht, die Zusammensetzung der Arzneiformen zu verändern, oder führen Änderungen der technologischen Parameter zum Erfolg?

1.8 Cytochrom C

Cytochrom C ist ein Enzym der Atmungskette, das den Elektronenübergang vom Cytochrom B auf das Cytochrom A realisiert. Das Protein besteht bei Vertebraten aus 104 Aminosäuren, hat eine Molmasse von ca. 12.400 g/mol und ist in größeren Mengen in der Herz- und Skelettmuskulatur vertreten. Rinder- und Pferdemuskel werden demzufolge auch zur Gewinnung genutzt. Das Protein ist sehr gut löslich in hydrophilen Lösungsmitteln wie z.B. Wasser, wenig in organischen Lösungsmitteln wie z.B. Dichlormethan, Aceton und Dimethylsulfoxid. Der isoelektrische Punkt liegt bei 10. Cytochrom C besitzt in seiner oxidierten Form Absorptionsmaxima bei 280,

361, 410 und 529 nm, in der reduzierten Form bei 416, 520 und 550 nm. Bei 550 nm besitzt es eine spezifische Absorption von 22,6 bis 23,1. Die Gehaltsbestimmung erfolgt in der Regel durch Gelelektrophorese oder spektrophotometrisch.

1.9 In-vitro-Freisetzungsmodelle für parenterale Depotarzneiformen

Im allgemeinen werden für die In-vitro-Freisetzung von Depotarzneiformen auf 37 °C temperierbare Inkubationsgefäße verwendet, die einen leichten Austausch des Akzeptormediums ermöglichen. Das am weitesten standardisierte Freisetzungsmodell ist die Dissolutionapparatur mit Rührflügeln bzw. Körbchen, die in den Pharmakopöen spezifiziert ist und eine größtmögliche Vergleichbarkeit von Meßergebnissen ermöglicht. Zum anderen sind die Durchflußzelle, der Horizontalschüttler und das Rotatherm[®] allgemein gebräuchlich.

Apparative freisetzungsbeeinflussende Faktoren sind dabei:

- Temperatur
- Flüssigkeitsvolumen
- pH-Wert
- Osmolarität
- Umdrehungszahl
- Tensidzusatz.

Die Dissolutionapparatur, wie sie in den Pharmakopöen beschrieben wird, ist jedoch wegen folgender Gründe nicht oder nur bedingt anwendbar. Die Freigabe pro Zeiteinheit, vor allem von Proteinen, ist so klein, dass man unterhalb der Nachweisgrenze des jeweiligen Wirkstoffes liegt. Demzufolge muß mit zum Teil sehr kleinen Volumina gearbeitet werden, um akzeptabel analysieren zu können. Mit Hilfe von HPLC-MS lässt sich die Nachweisgrenze drastisch senken, auf Kosten längerer Analysenzeiten und hohem apparativem Aufwand. Eine weitere Möglichkeit, dieses Problem zu umgehen, ist die radioaktive Markierung von Wirkstoffen, um sehr niedrige Konzentrationsbereiche erfassen zu können, dies erfordert jedoch einen oft unverhältnismäßig hohen Aufwand. Koneberg [169] verwendete daher z.B. ein 1,5-ml-Eppendorf-Gefäß zum Test der Freisetzung von Tetanus-Toxoid aus 30 mg Mikropartikeln, wobei 1 ml Freisetzungspuffer eingesetzt wurde und nach Probenahme jeweils vollständig substituiert wurde. Mohr nutzte für die Freisetzung aus 10 – 20 mg Mikropartikeln 80 ml Phosphatpuffer pH 7,4 Natriumchloridhaltig R, DAB 10, unter Zusatz von Pluronic F 68 zur Lösungsvermittlung und 0,05 % Natriumazid als Konservierungsmittel, aber auch Phenole [123].

Als Freisetzungsmittel wird oftmals Phosphatpuffer pH 7,4 [170] bzw. 7,2 [99] verwendet, bei der Freisetzung von Proteinen werden oftmals humanes Serum-Albumin als Stabilisator und Adsorptionsinhibitor [123] zugesetzt. Tris-NaCl-Pufferlösungen werden ebenfalls eingesetzt [171], wie auch Natriumazid-haltige Lösungen. Auch Lösungsvermittler wie z.B. Tween 80 [172] oder Polyoxyethylen-Sorbitanmonolaurat [112] werden wässrigen Pufferlösungen zugesetzt.

Für die Freisetzung von Estradiol und Testosteron wurde als Dissolutionmedium eine wässrige Lösung verwendet, die 27,5 Masse-% Ethanol enthielt [173]. Zur Imitation der In-vivo-Verhältnisse erscheint dies jedoch bedenkenswert.

Bittner [174] verwendete Phosphatpuffer verschiedenen pH-Werts (2; 7,4; 9) und verschiedener Ionenstärke (300 mosmol/kg, 600 mosmol/kg) sowie Wasser, um den Einfluß der beiden Größen zu untersuchen. Sie stellte fest, dass Ionenstärke und pH-Wert die Freisetzung von Proteinen abhängig vom eingesetzten Polymer beeinflussen. Polylactide-co-glycolide verhielten sich in verschiedenen pH-Werten ähnlich, ein sehr hoher "Initial burst" Effekt war zu beobachten, während bei der Verwendung von Triblock-Polymeren die Freisetzung sehr stark differierte. Niedere pH-Werte und Wasser behindern die Freisetzung aufgrund der geringeren Hydrolyse-Neigung der Polymere in diesen Medien. Der Einfluß der Ionenstärke war eher gering. O'Donnell et al. [111] verwendeten für Freisetzungsversuche von Thioridazin-hydrochlorid-haltigen Mikrosphären über einen Zeitraum von 3 Monaten eine „Sustained release“ Apparatur mit VanKel[®] Dissolutiontest-Flaschen, die sie mit 75 ml destilliertem Wasser füllten und diese mit 15 U/min. drehten.

Zum anderen kann das Rühren des Dissolutionmediums ("Paddle") oder die mechanische Beanspruchung des Depots ("Basket") die Freisetzungsergebnisse negativ beeinflussen, im allgemeinen will man die Implantation ins Gewebe simulieren, wo der Flüssigkeitstransport sehr langsam erfolgt. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Freisetzung ist außerdem der Stofftransport im Implantat und nicht der Stofftransport durch die Grenzschicht.

Wie aus diesen Ausführungen ersichtlich wird, sind die Einflußfaktoren auf die Freisetzung durch die apparativen Bedingungen hinreichend beleuchtet. Um einen Vergleich mit den bereits beschriebenen Freisetzungsuntersuchungen führen zu können, ist es demzufolge notwendig, sowohl den apparativen Aufbau als auch die chemische Zusammensetzung des Freisetzungsmittels an einer möglichst geringen Beeinflussbarkeit der Versuchsbedingungen zu orientieren.

1.10 Zielstellung

Aufgabe der vorliegenden Arbeit ist es, gepreßte und In-situ-Implantate herzustellen, die sich als parenterale Depotarzneiform eignen. Dazu galt es zunächst Zielkriterien festzulegen, anhand derer die Eignung beurteilt werden konnte. Danach war zu prüfen, ob die Implantate eine Freisetzung des untersuchten Proteins entsprechend der Zielkriterien realisieren können. Mit einer patentierten Technologie für die In-situ-Herstellung von Implantaten [175] und einer aus der Literatur [48, 118, 119] bekannten Technologie für die Herstellung von gepreßten Implantaten in Tablettenform sollten die Implantate formuliert werden. Als bioabbaubare Hilfsstoffe sollten einerseits die kommerziell erhältlichen Polymere vom Typ Poly-L-lactid, Poly-D,L-lactid und Poly-D,L-lactid-co-glycolid (Resomere[®] der Fa. Boehringer Ingelheim) verwendet werden. Dabei war davon auszugehen, dass mit den kommerziellen Polymeren nur eingeschränkte Möglichkeiten zur Freisetzungsmodulation bestehen [176].

Des Weiteren ist bekannt, dass durch Herstellung von Blockpolymeren [1, 39, 40], die Variierung der Kettenlänge und damit der Molmasse [48, 57, 136, 177], die Veränderung der hydrophilen bzw. lipophilen Eigenschaften durch Endgruppenmodulation [177] oder Herstellung von Mischungen mit anderen Polymeren [90] und die Verwendung der L- Form des Lactids bzw. der racemischen Form (D,L-lactid) [45] Polymere erhalten werden, mit denen die Freisetzung eingebetteter Arzneistoffe vielfältig beeinflusst werden kann.

Daher sollten Polymere entwickelt werden, die auf chemischem Wege verändert werden konnten und die auf Basis dieses Prinzips eine Steuerung der Liberation eines Proteins aus in situ geformten als auch aus gepreßten Implantaten ermöglichen, die mit diesen Polymeren hergestellt wurden.

Das Konzept zur Realisierung dieser Zielstellung sah vor, das Startermolekül der Ringöffnungspolymerisation zu variieren. Als Startermoleküle sollten Alkohole mit einer, zwei als auch drei freien Hydroxylgruppen im Molekül verwendet werden. Damit konnten nach der Polymerisation folgende Grundtypen der modulierten Polylactide erwartet werden (Abbildung 5).

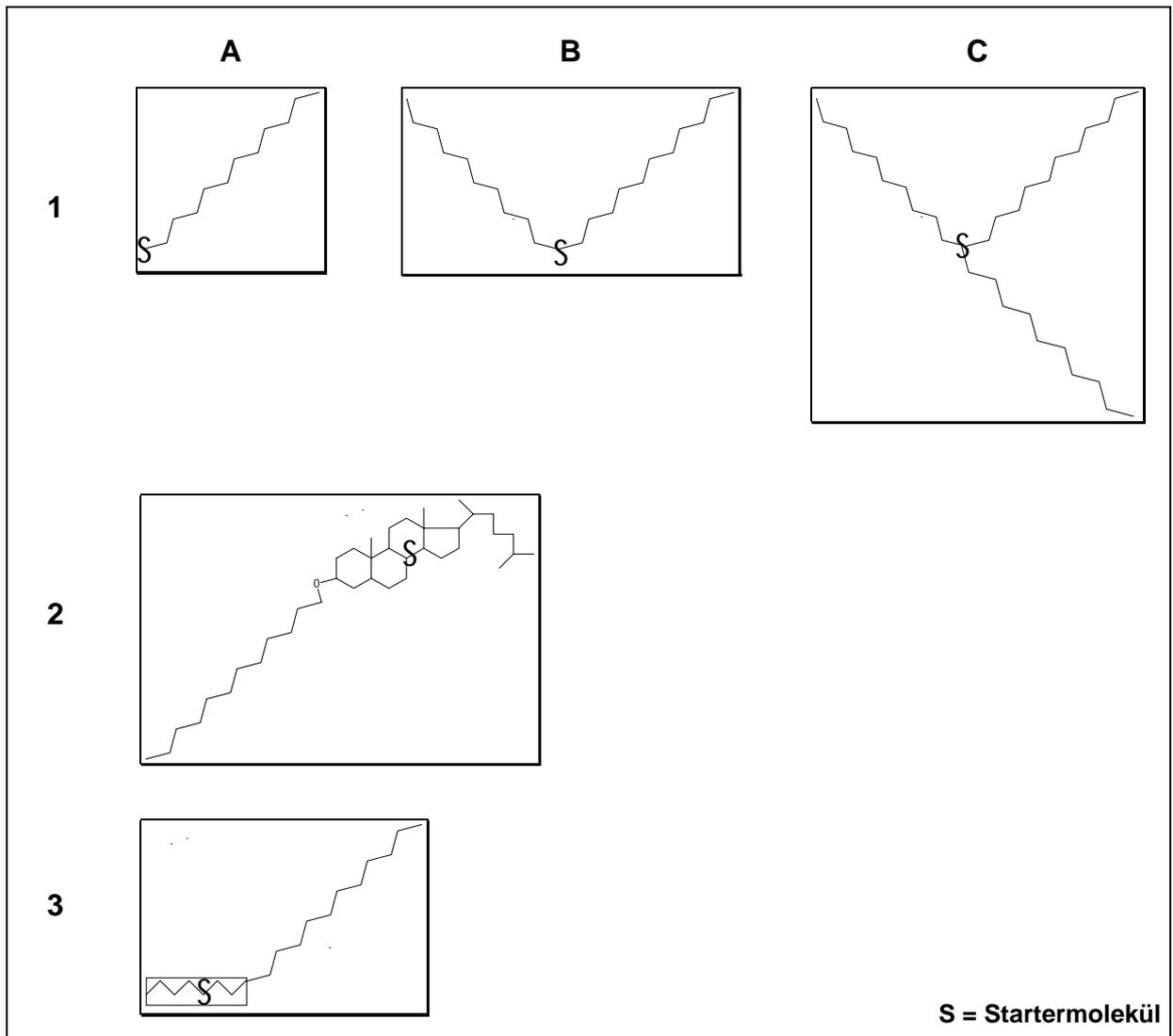


Abbildung 5: Grundtypen modulierter Polylactide, die als Ergebnis des gewählten Synthesekonzepts zu erwarten waren

A lineare Polymere mit verschiedenen Startermolekülen (S) am Kettenende

A1 S = L-(-)-Milchsäureethylester

A2 S = Cholesterol

A3 S = 1-Octadecanol

B lineare Polymere mit dem Startermolekül in der Kettenmitte

S = Propan-1,2-diol

C sternförmig verzweigte Polymere

S = 1,1,1-Tris(hydroxymethyl)-propan

Lineare Polymere vom Typ A1 werden bisher am meisten beschrieben, und diese werden sowohl als Homopolymere oder als Copolymere zur Herstellung von Implantaten verwendet. Bei diesen Polylactiden weist das Startermolekül die gleiche

Struktur auf wie einer der übrigen Polymerbausteine. Typ A2 und Typ A3 sind bisher noch nicht zur Herstellung von Implantaten verwendet wurden. Da sich an dem Polymerkettenende in dem einen Fall ein heterozyklisches lipophiles Molekül (Cholesterol) und in dem anderen Fall eine aliphatisches lipophiles Molekül (1-Octadecanol) befindet, ist zu erwarten, dass sich mit fallender Kettenlänge der Einfluß dieses Startermoleküls auf die physiko-chemischen Eigenschaften des Polymers auswirkt. Dies sollte auch für die Freisetzung des Proteins aus den auf dieser Basis hergestellten Arzneiformen bedeutsam sein.

Bei Polymeren vom Typ B befindet sich das Startermolekül in der Polymerkettenmitte, so dass sein Einfluß auf die Eigenschaften des Polymers eher gering zu erwarten ist, auch wenn Propan-1,2-diol lipophiler ist als ein Lactidbaustein.

Die Polymere vom Typ C unterscheiden sich von den vorherigen Polymertypen durch die räumliche Struktur. Dadurch, dass an einem Startermolekül mit drei reaktionsfähigen Hydroxylgruppen drei Lactidketten "abzweigen", entstehen sternförmig verzweigte Substanzen, die in dieser Art und für die Anwendung zur Herstellung bioabbaubarer Implantate noch nicht beschrieben sind.

Ein wesentliches Ziel der vorliegenden Arbeit war ein Vergleich der kommerziell zugänglichen Polylactide der Fa. Boehringer Ingelheim (Resomere[®]) mit den synthetisierten Polymeren vom Typ A, B und C hinsichtlich der Eignung zur Herstellung von Implantaten und bezüglich der Möglichkeiten zur Steuerung der Freisetzung des Modellproteins Cytochrom C. Dazu mußte ein geeignetes Freisetzungsmodell ausgewählt werden, das Unterschiede der eingesetzten Polylactide in den formulierten Implantaten erkennen lässt.

Die Ziele der Arbeit bestanden im Einzelnen darin, die neu synthetisierten Polymere hinsichtlich chemischer Struktur, Aggregatzustand, Molmasse, morphologischer und thermischer Eigenschaften zu charakterisieren und die Auswirkung dieser Charakteristiken auf die Implantateigenschaften zu diskutieren.

Weitere Ziele dieser Arbeit waren eine Einschätzung der Eignung dieser Polymere zur Herstellung von Implantaten (Formulierbarkeit), die Auswahl eines geeigneten In-vitro-Liberationsmodells und die Festlegung von Zielkriterien zur Bewertung der Freisetzung von Cytochrom C aus den Implantaten.

Schließlich sollte die Freisetzung von Cytochrom C aus den Implantaten untersucht werden. Dabei sollte insbesondere geklärt werden, wie sich Eigenschaften der neu synthetisierten Polymere wie Typ des Polymers, Kettenlänge, Verhältnis Polymer zu Arzneistoff auf die Freisetzung des Cytochrom C aus den Implantaten auswirken.

2 Ergebnisse und Diskussion

2.1 Charakterisierung der synthetisierten modulierten bioabbaubaren Polylactide

2.1.1 Aggregatzustand, Molmasse und FT-RAMAN-Spektroskopie der untersuchten Polylactide und Polylactid-co-glycolide

Die in dieser Arbeit verwendeten modulierten Polylactide wurden durch Ringöffnungspolymerisation der Dilactone der Milch- bzw. Glycolsäure (L-Lactid, D,L-Lactid, Glycolid) in Gegenwart eines alkoholischen Starters und des wirksamen Katalysators (Zinn(II)-ethylhexanoat) nach dem in Abbildung 2 gezeigtem Reaktionsschema hergestellt.

Insgesamt wurden 60 modulierte Oligolactid- bzw. Polylactidproben in einer jeweiligen Masse von 5 - 10 g erhalten. In struktureller Hinsicht wurden sowohl die Monomierzusammensetzung und die Molmasse variiert als auch unterschiedliche Startermoleküle eingesetzt, die auch als Co-Katalysatoren bezeichnet werden können [178], so dass auf diese Weise neben kettenförmigen (Typ A und B) auch sternförmig strukturierte Polylactide (Typ C) zugänglich wurden. Die nachfolgende Aufstellung der synthetisierten Produkte erfolgt nach den verwendeten Startern (Mono-, Di- und Triole).

Die Eigenschaften der modulierten Oligo- und Polylactide variieren je nach synthetisiertem Typ. Bei den Typ A1 Polymeren variiert der Aggregatzustand zwischen flüssig und fest. Die Molmassen der untersuchten Proben betragen zwischen 262 und 10.445 g/mol (Tabelle 3).

Tabelle 3: Eigenschaften der synthetisierten Oligo- und Polylactide vom Typ A1

Probe	Monomer	WE/OH	Aggregatzustand	Molmasse (theor.) [g/mol]	Molmasse (bestimmt) [g/mol]	FT-RAMAN-Spektroskopie
JP 104	LL	2	flüssig	262	362	Abbildung 6
JP 23		20	fest	1.559	2.272	
JP 21		40	fest	3.001	5.077	
JP 18		60	fest	4.442	5.362	
JP 16		80	fest	5.883	7.476	
JP 43	DLL	2	flüssig	262	354	Abbildung 6
JP 44		4	flüssig	406	870	
JP 45		6	flüssig	550	1.064	
JP 28		10	flüssig	839	1.283	
JP 25		20	fest	1.559	2.184	
JP 22		40	fest	3.001	4.346	
JP 20		60	fest	4.442	5.315	
JP 17		80	fest	5.883	7.790	
JP 33		120	fest	8.766	9.114	
JP 34		140	fest	10.207	10.445	
JP 88	LL/DLL	100/20	fest	8.766	8.808	
JP 89		80/40	fest	8.766	9.311	
JP 90		60/60	fest	8.766	n. b.	

Der Aggregatzustand der synthetisierten Typ A2 Polymere war fest. Die Molmassen der untersuchten Proben betragen zwischen 1.828 und 16.087 g/mol (Tabelle 4).

Tabelle 4: Eigenschaften der synthetisierten Oligo- und Polylactide vom Typ A2

Probe	Monomer	WE/OH	Aggregatzustand	Molmasse (theor.) [g/mol]	Molmasse (bestimmt) [g/mol]	FT-RAMAN-Spektroskopie
JP 53	LL	40	fest	3.269	3.998	Abbildung 7
JP 52		80	fest	6.152	6.421	
JP 51		120	fest	9.034	8.288	
JP 50		160	fest	11.917	10.229	
JP 49		200	fest	14.800	15.650	
JP 39	DLL	20	fest	1.828	2.340	
JP 37		40	fest	3.269	3.929	
JP 103		60	fest	4.710	n. b.	
JP 38		80	fest	6.152	7.580	
JP 40		120	fest	9.034	9.351	
JP 41		160	fest	11.917	12.480	
JP 42		200	fest	14.800	16.087	

Der Aggregatzustand der Typ A3 Polymere war fest. Die Molmassen der untersuchten Proben betragen zwischen 1.713 und 14.389 g/mol (Tabelle 5).

Tabelle 5: Eigenschaften der synthetisierten Oligo- und Polylactide vom Typ A3

Probe	Monomer	WE/OH	Aggregatzustand	Molmasse (theor.) [g/mol]	Molmasse (bestimmt) [g/mol]	FT-RAMAN-Spektroskopie
JP 169	LL	20	fest	1.713	n. b.	Abbildung 8
JP 167		40	fest	3.154	n. b.	
JP 126		80	fest	6.036	n. b.	
JP 84		120	fest	8.918	8.539	
JP 170	DLL	20	fest	1.713	n. b.	Abbildung 8
JP 168		40	fest	3.154	n. b.	
JP 76		80	fest	6.036	6.615	
JP 74		160	fest	11.801	14.389	

Bei den Polymeren vom Typ B variierte der Aggregatzustand zwischen zähflüssig und fest. Die Molmassen der untersuchten Proben betragen zwischen 364 und 28.902 g/mol (Tabelle 6).

Tabelle 6: Eigenschaften der synthetisierten Oligo- und Polylactiden vom Typ B

Probe	Monomer	WE/OH	Aggregatzustand	Molmasse (theor.) [g/mol]	Molmasse (bestimmt) [g/mol]	FT-RAMAN-Spektroskopie
JP 72	LL	80	fest	11.606	14.642	Abbildung 9
JP 71		120	fest	17.372	17.415	
JP 70		160	fest	23.137	19.835	
JP 69		200	fest	28.902	n. b.	
JP 46	DLL	2	zähflüssig	364	503	Abbildung 9
JP 47		4	zähflüssig	653	815	
JP 68		10	fest	1.517	1.364	
JP 67		20	fest	2.959	3.689	
JP 66		40	fest	5.841	6.611	
JP 65		80	fest	11.606	12.507	
JP 64		120	fest	17.372	n. b.	
JP 62		200	fest	28.902	23.247	

Bei den Polymeren vom Typ C war der Aggregatzustand fest. Die Molmassen der untersuchten Proben betragen zwischen 2.072 und 34.725 g/mol (Tabelle 7).

Tabelle 7: Eigenschaften der synthetisierten Oligo- und Polylactiden vom Typ C

Probe	Monomer	WE/OH	Aggregatzustand	Molmasse (theor.) [g/mol]	Molmasse (bestimmt) [g/mol]	FT-RAMAN-Spektroskopie
JP 101	LL	10	fest	2.296	2.285	
JP 97		20	fest	4.458	4.673	
JP 12		40	fest	8.782	10.068	
JP 13		160	fest	34.725	n. b.	
JP 3	DLL	18	fest	4.026	4.679	
JP 5	LL/DLL	8/8	fest	3.593	4.129	
JP 154	LL/GL	8/2	fest	2.212	2.072	
JP 2		8/4	fest	2.560	2.861	
JP 155		36/36	fest	14.181	n. b.	
JP 19	DLL/GL	64/16	fest	16.757	17.453	

Die experimentell bestimmten Molmassen weichen von den theoretisch kalkulierten Molmassen um 10 %, in manchen Fällen, besonders bei den niedermolekularen Polylactiden auch bis zu 25 % ab. Ursache für diese Abweichungen sind, dass die Umsetzung nicht im stöchiometrischen Verhältnis erfolgte, andererseits wurde der rechnerische Mittelwert des Verteilungspeaks des Chromatogramms angegeben.

2.1.2 Ergebnisse der FT-RAMAN-Spektroskopie

Hinweise auf die Struktur der Polylactide lieferte die FT-RAMAN-Spektroskopie. Die strukturellen Merkmale, die aus den Spektren zugeordnet werden konnten, sind am Beispiel der Banden folgender Polylactide erläutert (siehe Tabelle 8).

Tabelle 8: Ermittelte FT-RAMAN Banden für die untersuchten modulierten und kommerziell verfügbaren Polylactide und Zuordnung der funktionellen Gruppen entsprechend der Literatur*[179]

Wellenzahl [cm ⁻¹]											Zuordnung
JP 18	JP 20	JP 52	JP 167	JP 168	JP 72	JP 65	R 202 H	RG 752	RG 503 H	L 104	
307 w	301 w	307 w	307 w	-	307 w	297 w	301 w	-	-	307 w	δ_s (C-C)
396 w	394 w	395 w	396 w	395 w	396 w	396 w	394 w	394 w	394 w	396 w	δ_s (C-C)
874 s	872 s	874 s	874 s	872 s	874 s	872 s	872 s	872 s	872 s	874 s	ν_s (C-O-C)
1042 m	1043 m	1044 m	1042 m	1044 m	1042 m	1044 m	1044 m	1045 m	1046 m	1042 m	ν (C-C)
1092 w	1096 w	1090 w	1090 w	1094 w	1092 w	1096 w	1096 w	1094 w	1094 w	1092 w	ν_a (C-O-C)
1128 m	1126 m	1129 m	1128 m	1127 m	1129 m	1127 m	1127 m	1128 m	1129 m	1129 w	ν_a (C-O-C)
1292 m	1298 m	1292 m	1292 m	1300 m	1292 m	1298 m	1298 m	1300 m	1300 m	1292 w	ν (C-C)
1387 w	1385 w	1387 w	1387 w	1385 w	1387 w	1385 w	1385 w	1385 w	1387 w	1387 w	δ_s (CH ₃)
1453 s	1454 s	1453 s	1452 s	1453 s	1453 s	1454 s	1454 s	1454 m	1453 m	1453 m	δ_a (CH ₃)
1765 s	1767 s	1765 s	1765 s	1768 s	1765 s	1768 s	1768 s	1768 m	1768 m	1763 m	δ (C=O)

s, stark; m, mittel; w, schwach; ν , Streckschwingung; ν_a , antisymmetrische Streckschwingung; ν_s , symmetrische Streckschwingung; δ , Biegeschwingung; δ_s , symmetrische Biegeschwingung; δ_a , antisymmetrische Biegeschwingung

Um einen Vergleich der Poly-L-lactide mit den Poly-D,L-lactiden des jeweils hergestellten Polymertyps führen zu können, sind je eine Probe der entsprechenden Klasse in den Abbildungen 6 bis 9 graphisch dargestellt. Zusätzlich wurden die kommerziell verfügbaren Polylactide der Fa. Boehringer Ingelheim dargestellt (Abbildung 10). Im Falle des Typs A2 ist kein Poly-D,L-lactid geprüft wurden (Abbildung 7).

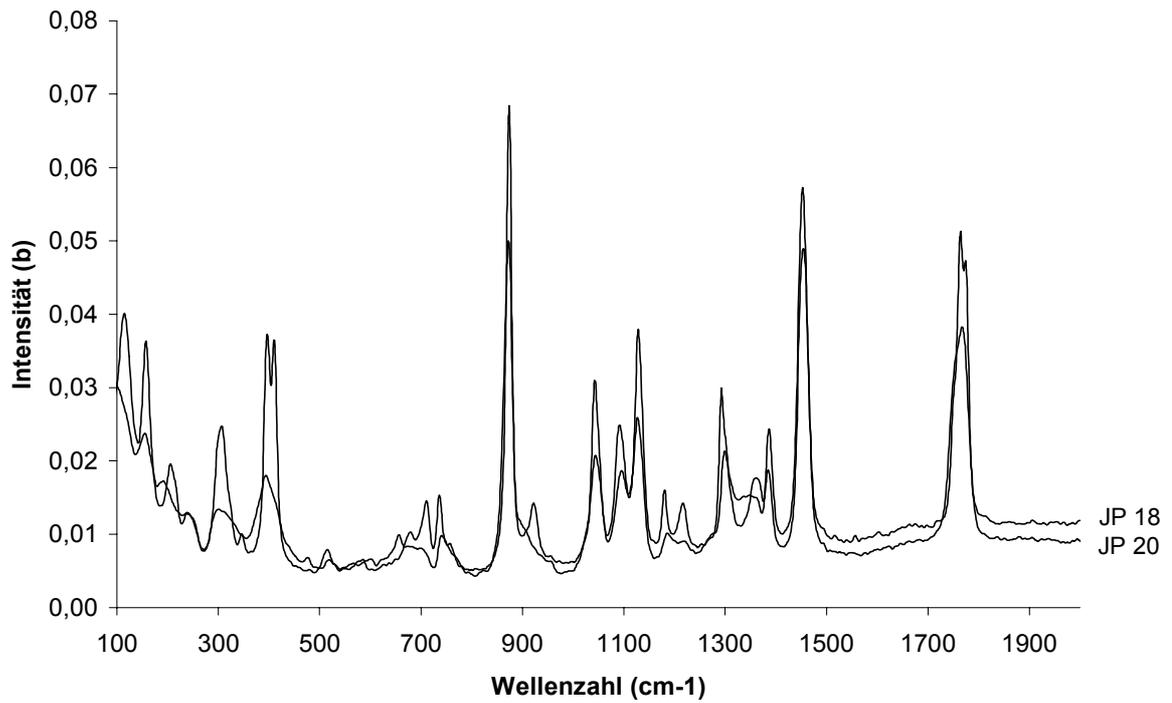


Abbildung 6: FT-RAMAN-Spektren jeweils eines für den Polymertyp A1 repräsentativen Poly-L-lactids JP 18 und eines Poly-D,L-lactids JP 20

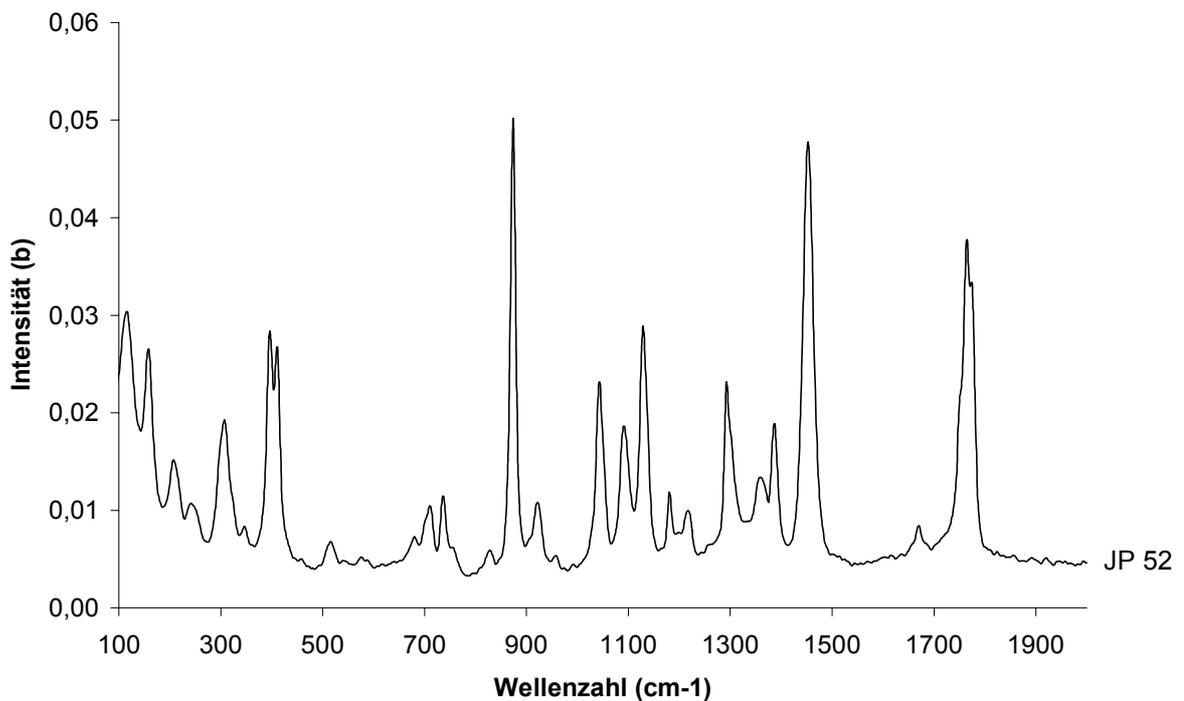


Abbildung 7: FT-RAMAN-Spektrum eines für den Polymertyp A2 repräsentativen Poly-L-lactids JP 52

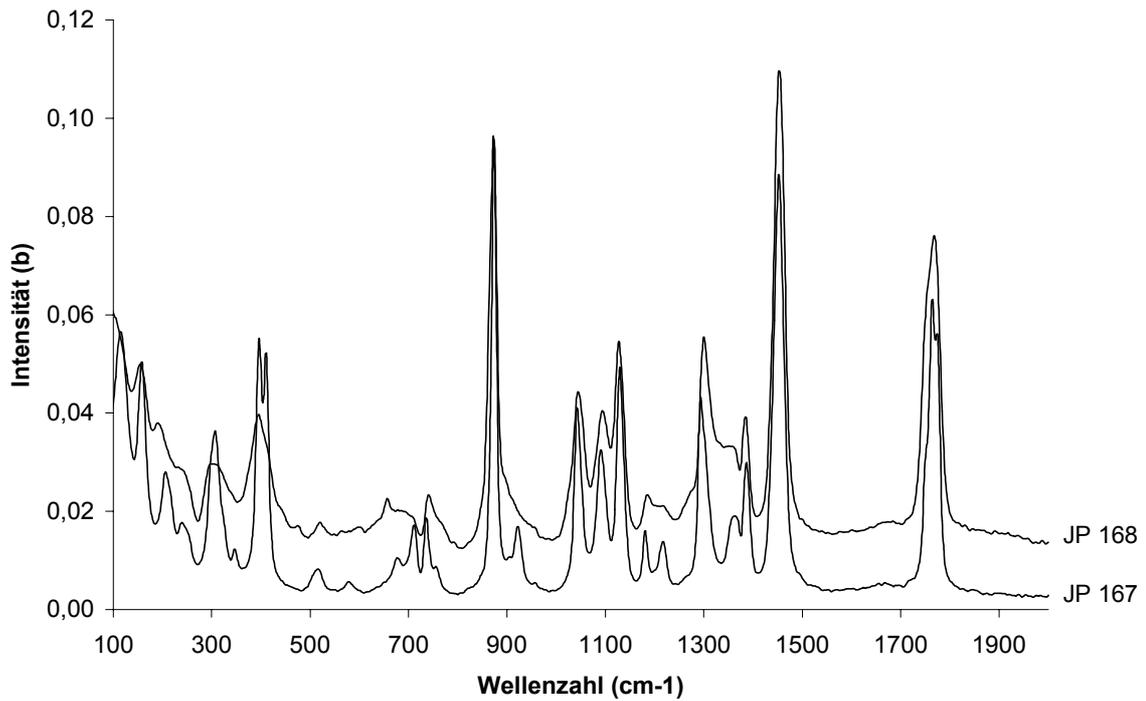


Abbildung 8: FT-RAMAN-Spektren jeweils eines für den Polymertyp A3 repräsentativen Poly-L-lactids JP 167 und eines Poly-D,L-lactids JP 168

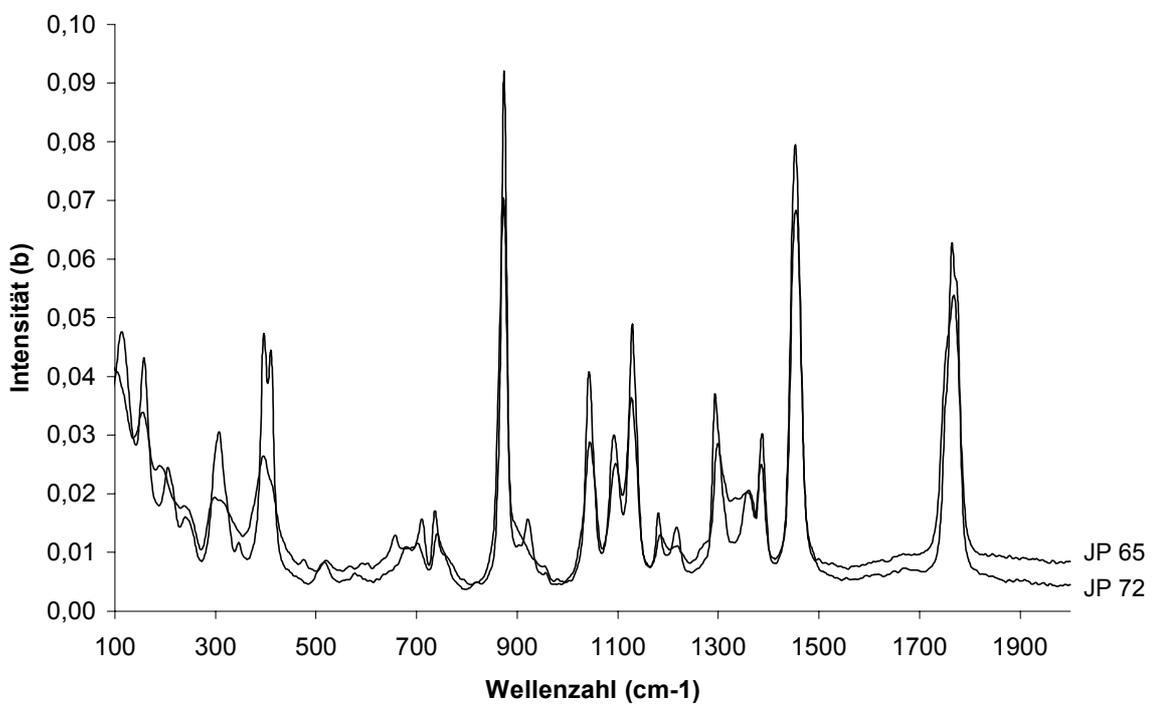


Abbildung 9: FT-RAMAN-Spektren jeweils eines für den Polymertyp B repräsentativen Poly-L-lactids JP 72 und eines Poly-D,L-lactids JP 65

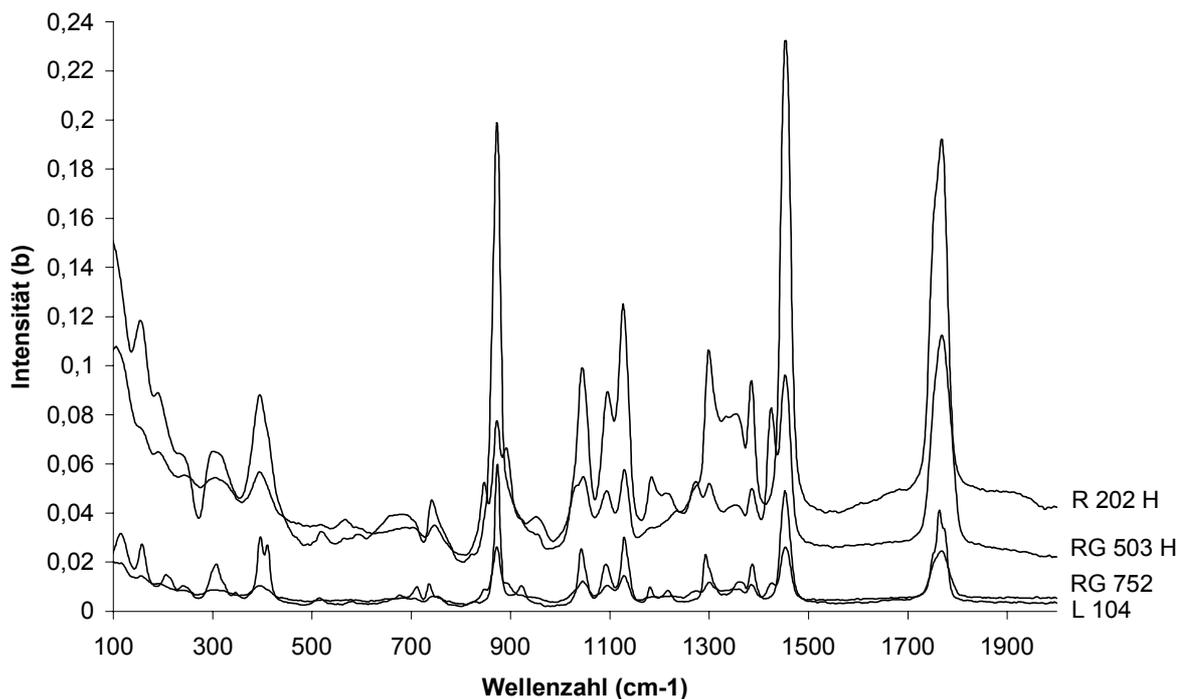


Abbildung 10: FT-RAMAN-Spektren der vergleichsweise untersuchten kommerziellen Polyactide der Fa. Boehringer Ingelheim L 104, R 202 H, RG 503 H und RG 752

Beim Vergleich der jeweiligen L- und D,L-Polymere kann man deutliche Unterschiede in der Ausprägung und der Bandenhöhe der Poly-L-lactide und der Poly-D,L-lactide feststellen, obwohl bei beiden Proben dieselbe Kettenlänge vorliegen. Daher sind strukturelle Unterschiede auszuschließen. Die unterschiedlichen Spektren müssen sich demzufolge auf die Detektion von differenten Schwingungen aufgrund des andersartigen sterischen Aufbaus der Polyactide zurückführen lassen. Dies wird in allen betrachteten Fällen anhand der symmetrischen Biegeschwingungen der C-C Bindungen der Milchsäure (Wellenzahl ca. 307 und 394) deutlich, aber auch aus den höheren Banden der übrigen Biege- und Streckschwingungen der Poly-L-lactide.

2.1.3 Ergebnisse der Röntgendiffraktometrie

Mittels Röntgendiffraktometrie wurden in den untersuchten Proben zwei verschiedene Festkörperformen beobachtet - Röntgenamorphizität (Abbildung 11 am Beispiel von Probe JP 66) und Kristallinität (Abbildung 12 am Beispiel von Probe JP 17).

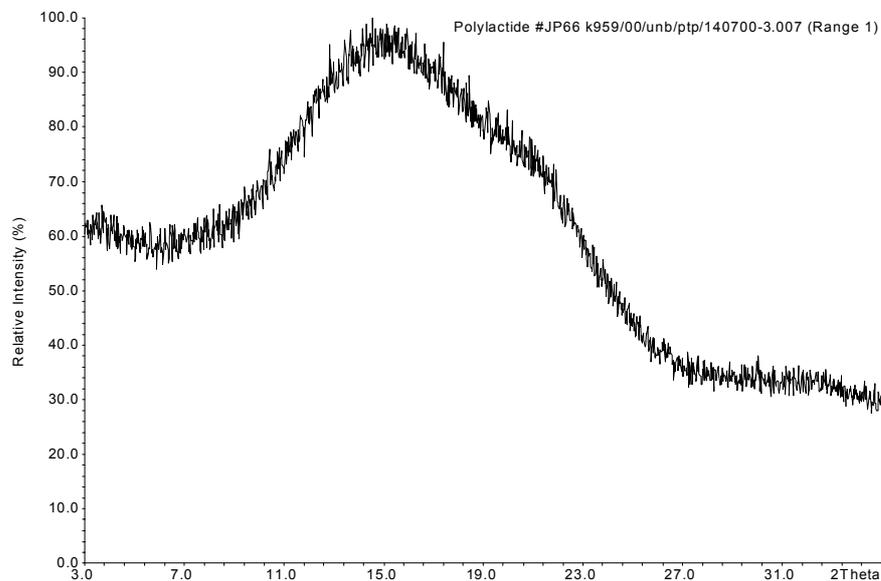


Abbildung 11: Pulverdiffraktogramm Probe JP 66 mit amorpher Struktur

Die Proben mit kristalliner Phase enthalten jedoch teilweise amorphe Anteile. Die Reflexe weisen eine recht große Halbwertsbreite auf ($0,36^\circ$). Normalerweise liegen die Halbwertsbreiten $< 0,1^\circ$. Dies kann durch das Vorliegen von feinkristallinem Material (Kristallitgrößen $< 5 \mu\text{m}$) oder durch starke Störungen im Kristallgitter hervorgerufen werden.

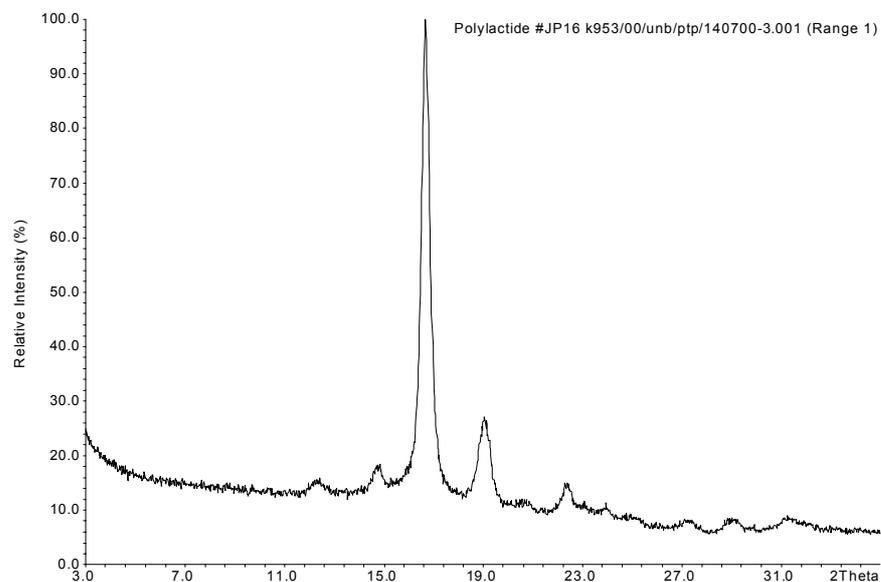


Abbildung 12: Pulverdiffraktogramm der Probe JP 16 mit kristalliner Struktur

Mit Bezug auf L 104 als kristalliner Standard (Kristallinität = 100%) und RG 752 (0 % Kristallinität) wurde die Kristallinität quantifiziert (Tabelle 9).

Von den Proben, die bei der ersten Meßreihe als amorph identifiziert wurden, sind nur 3 Proben (JP 19, JP 20 und JP 74) als Vergleich mit gemessen wurden.

Tabelle 9: Kristallinität der untersuchten Polylactide (Röntgendiffraktometrie, Bezug L 104 = 100%, RG 752 = 0 %)

Probe	Typ	Eigenschaft	kristalliner Anteil [%]
JP 21	A1	feinkristallin, kleiner Anteil amorph	91,5
JP 18	A1	feinkristallin, kleiner Anteil amorph	87,6
JP 16	A1	feinkristallin, kleiner Anteil amorph	77,0
JP 20	A1	amorph	-0,2
JP 17	A1	amorph	n.b.
JP 53	A2	feinkristallin, geringer Anteil amorph	58,6
JP 52	A2	feinkristallin, geringer Anteil amorph	64,2
JP 49	A2	feinkristallin, kleiner Anteil amorph	36,6
JP 169	A3	feinkristallin	82,6
JP 167	A3	feinkristallin, geringer Anteil amorph	71,3
JP 170	A3	amorph	n.b.
JP 168	A3	amorph	n.b.
JP 74	A3	amorph	0,1
JP 72	B	feinkristallin, geringer Anteil amorph	51,7
JP 71	B	feinkristallin, geringer Anteil amorph	46,6
JP 70	B	feinkristallin, geringer Anteil amorph	48,9
JP 69	B	feinkristallin, geringer Anteil amorph	41,9
JP 68	B	amorph	n.b.
JP 67	B	amorph	n.b.
JP 66	B	amorph	n.b.
JP 65	B	amorph	n.b.
JP 64	B	amorph	n.b.
JP 19	C	amorph	-0,2
L 104	Poly-L-lactid	feinkristallin	100,0
R 202 H	Poly-D,L-lactid	amorph	n.b.
RG 503H	Poly-D,L-lactid-co-glycolid	amorph	n.b.
RG752	Poly-D,L-lactid-co-glycolid	amorph	n.b.

Der kristalline Anteil der Poly-L-lactide liegt in einem Bereich von 36,6 bis 91,5 %. Die niedermolekularen Poly-L-lactide weisen einen größeren kristallinen Anteil auf als die höhermolekularen (Abbildung 13).

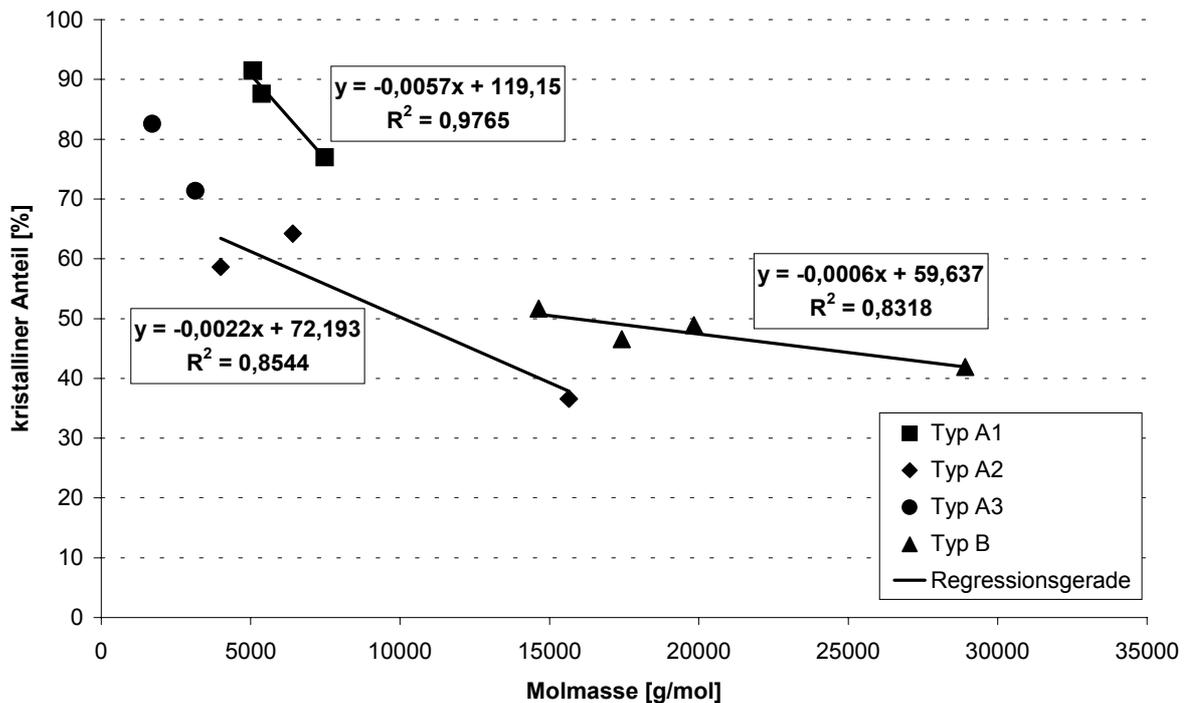


Abbildung 13: Kristalline Anteile der Polymere in Abhängigkeit von der Molmasse

Es zeigt sich, dass für alle Typen der modulierten Polylactide der kristalline Anteil mit steigender Molmasse abnimmt. Diese Abhängigkeit ist allerdings in unterschiedlichem Maße ausgeprägt. Während bei den Typ A1 Polylactiden der kristalline Anteil relativ zur Molmasse stark abfällt (Steigung der Regressionsgeraden), ist dieser Effekt bei den Typ A2 und Typ B Polylactiden schwächer vorhanden. Bei den Typ A3 Polylactiden ist eine ähnlich starke Tendenz wie bei den Typ A1 Polylactiden zu erkennen, da hier allerdings nur zwei Meßwerte zur Verfügung stehen, kann keine Regressionsrechnung durchgeführt werden. Vom Typ C wurden keine kristallinen Proben untersucht.

Das Bestimmtheitsmaß für die Korrelation Kristallinität vs. Molmasse war bei den Typ A2 und Typ B Polylactiden ($R^2 = 0,8318$ bzw. $0,85544$) erheblich kleiner als bei den Typ A1 Polylactiden ($R^2 = 0,9765$). Wegen der guten Korrelation bei den Typ A1 Polylactiden wäre es möglich, die Röntgendiffraktometrie als eine halbquantitative Meßmethode zur Bestimmung der Molmasse einzusetzen.

Eine Unterscheidung der einzelnen Typen der modulierten Polylactide ist anhand ihrer Röntgendiffraktogramme nicht möglich.

2.1.4 Ergebnisse der Dynamischen Differenz-Kalorimetrie (DSC)

Abbildung 14 bis Abbildung 17 zeigen exemplarisch die DSC-Kurven beim ersten und zweiten Aufheizen der modulierten Poly lactide JP 21 und JP 68.

JP 21 (Abbildung 14 und Abbildung 15), ein kristallines Poly-L-lactid, ist durch einen definierten Schmelzpunkt $T_S = 157 \text{ °C}$ gekennzeichnet, der eine Schmelzenthalpie $H_S = 68,45 \text{ J} \cdot \text{g}^{-1}$ repräsentiert. Glasumwandlungen beim 1. Heizen sind nicht zu verzeichnen.

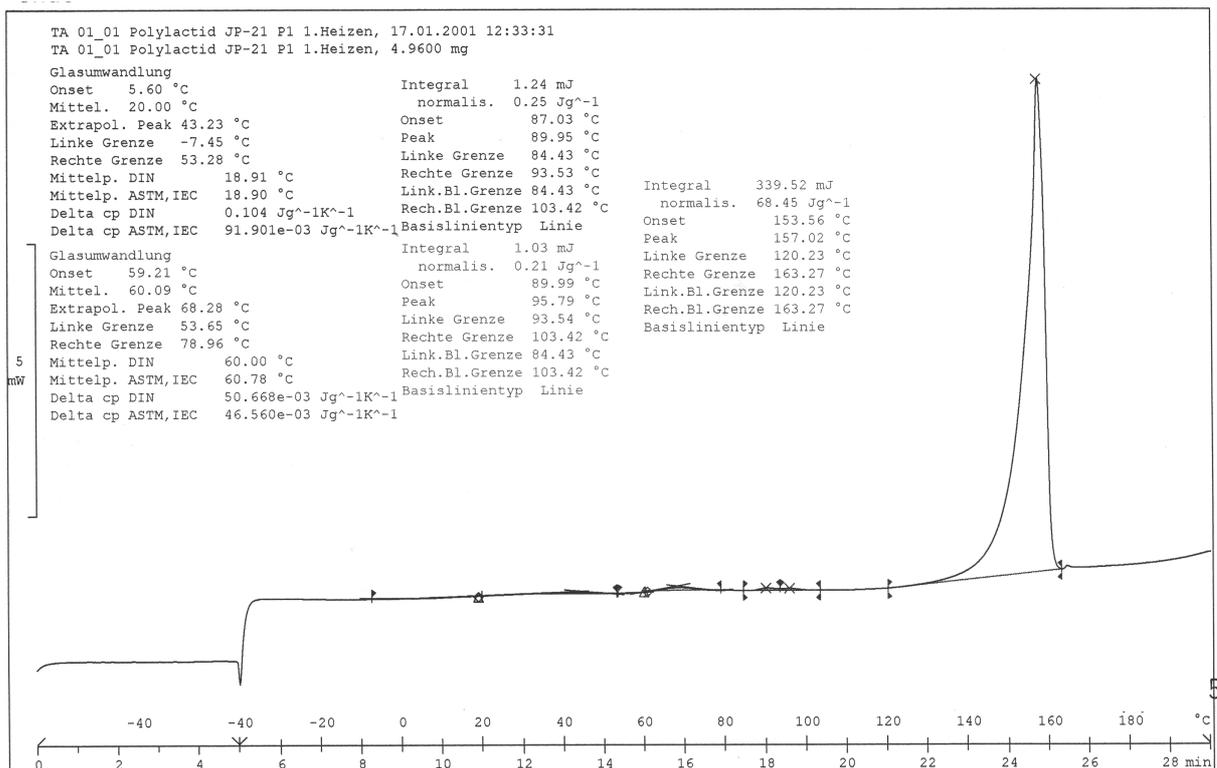


Abbildung 14: DSC- Kurve des Poly lactids JP 21 (1. Heizen)

Beim 2. Heizen findet eine Rekristallisation bei einer Peaktemperatur $T_R = 81,9 \text{ °C}$ statt, mit einer Enthalpie $H_R = - 43,57 \text{ J} \cdot \text{g}^{-1}$. Das erneute Aufschmelzen in einem zweistufigen Vorgang bei $T_S = 146,5 \text{ °C}$ bzw. $155,7 \text{ °C}$ mit einer summarischen Schmelzenthalpie $H_S = 58,02 \text{ J} \cdot \text{g}^{-1}$ deutet darauf hin, dass die Rekristallisation wahrscheinlich nicht vollständig abgelaufen ist ($H_R < H_S$). Die Summe der Schmelzenthalpien der beiden Schmelzpunkte liegen zwischen der Schmelzenthalpie des Schmelzpunktes beim 1. Heizen und der Enthalpie bei der Rekristallisation. Der letzte Schmelzpunkt beim 2. Heizen liegt im Bereich des Schmelzpunktes beim 1. Heizen. Des weiteren findet eine Glasumwandlung mit der Onset-Temperatur $T_O = 41,3 \text{ °C}$ und der mittleren Temperatur $T_g = 45,0 \text{ °C}$ statt.

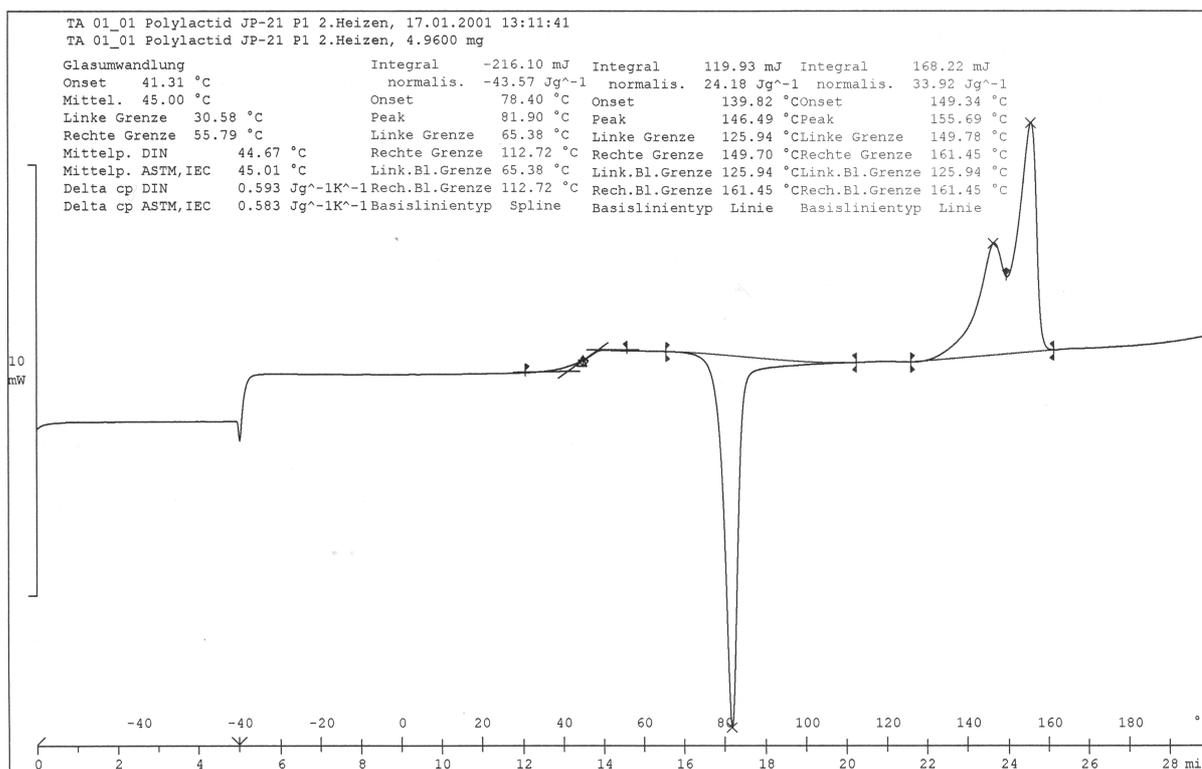


Abbildung 15: DSC- Kurve des Polylactids JP 21 (2. Heizen)

Dies deutet auf das Vorhandensein amorpher Bereiche im Polymer hin, die in dem Temperaturbereich in den Glaszustand übergehen. Da uns aus den röntgen-diffraktometrischen Untersuchungen der kristalline Anteil im Polymer bekannt ist, könnte diese Probe als Standard dienen, um den Kristallinitätsgrad anderer strukturell ähnlicher Polymere durch die Auswertung der Schmelzenthalpie zu ermitteln.

Das zweite Beispiel JP 68 (Abbildung 16 u. Abbildung 17) zeigt das thermische Verhalten eines amorphen Poly-D,L-lactids. Mit einer Onset-Temperatur von 10,3 °C und einer mittleren Temperatur $T_g = 14,3$ °C findet eine Glasumwandlung statt, die mit einer Änderung der spezifischen Wärme von $\Delta c_p = 0,68 \text{ J} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$ zur höheren Beweglichkeit der Molekülketten und damit zu einer viskoelastischen bzw. plastischen Verformung führt. Eine Enthalpielaxation ist nach der Glasumwandlung zu beobachten. Die folgenden Glasumwandlungen sind von untergeordneter Bedeutung und könnten vielmehr auf Verunreinigungen im Polymer bzw. auf Dimerenbildung hindeuten. Die kleineren endothermen Auslenkungen bei $T = 78,4$ °C bzw. $85,1$ °C könnten Schmelzpunkte von kristallinen Bereichen im Polymer darstellen.

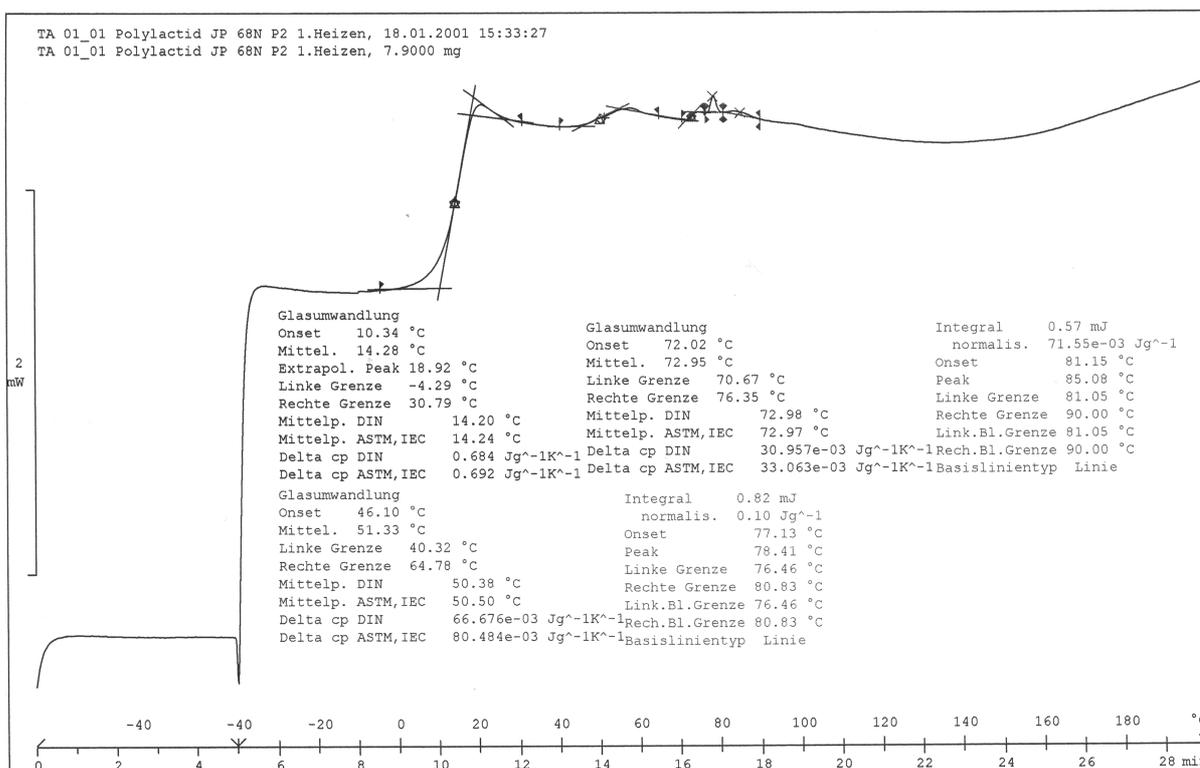


Abbildung 16: DSC- Kurve des Polylactids JP 68 (1. Heizen)

Beim 2. Heizen kommt es zu einer gegenüber dem 1. Heizen verzögerten Glasumwandlung mit einer Onset-Temperatur von $T_O = 17,4$ °C und einer mittleren Temperatur $T_g = 19,7$ °C bei annähernd gleicher $\Delta c_p = 0,64$ J*g⁻¹*K⁻¹.

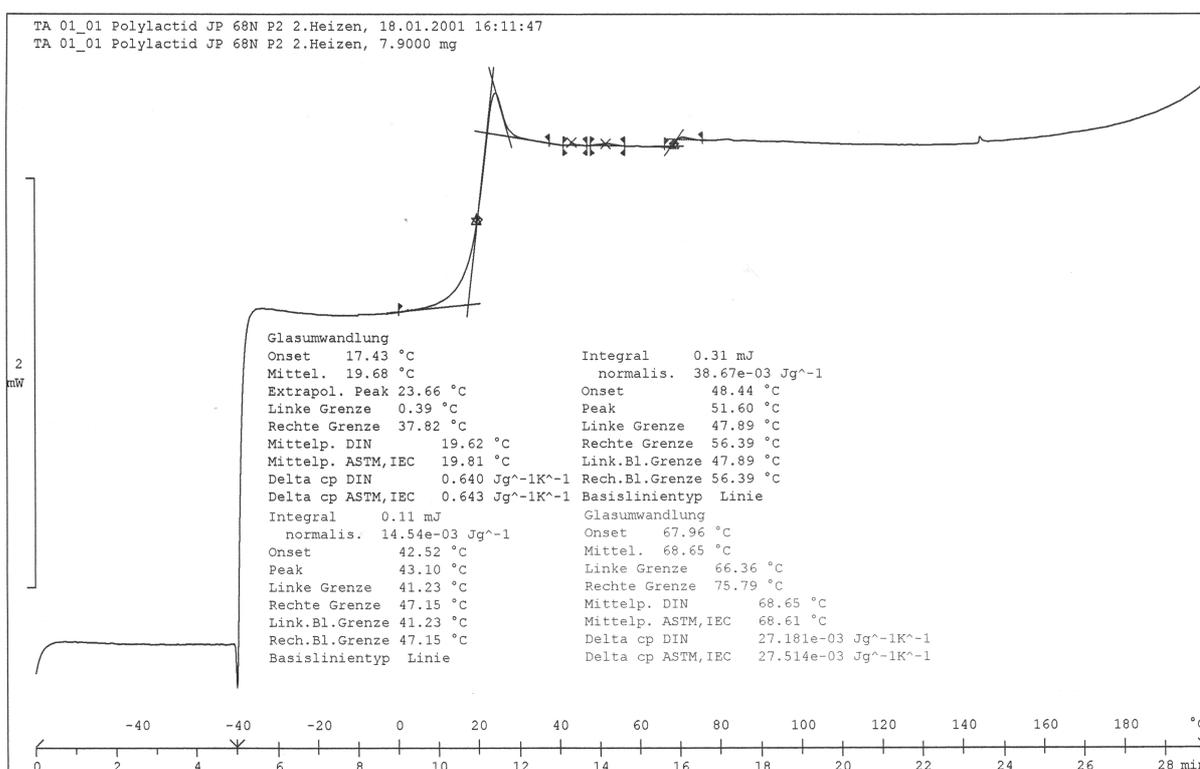


Abbildung 17: DSC- Kurve des Polylactids JP 68 (2. Heizen)

Die wesentlichen Daten aus den thermischen Analysen der einzelnen Polyactiden sind im folgenden aufgelistet (Tabellen 10 bis 15). Es wurden der Schmelzpunkt T_S , die entsprechende Schmelzenthalpie H_S , die Rekristallisationstemperatur T_R mit entsprechender Enthalpie H_R und die Glasübergangstemperatur T_g mit entsprechender Änderung der spezifischen Wärmekapazität Δc_p beim zweiten Heizen erfasst.

Tabelle 10: Übersicht wesentlicher DSC-Daten der Polyactide vom Typ A1

Probe	T_S [°C]	H_S [J*g ⁻¹]	T_R [°C]	H_R [J*g ⁻¹]	T_g [°C]	Δc_p [J*g ⁻¹ *K ⁻¹]
JP 23	109,2	29,65	78,7	- 41,98	30,8	0,592
	120,4	11,58				
JP 21	146,5	24,18	81,9	- 43,57	45,0	0,593
	155,7	33,92				
JP 18	157,5	43,38	86,9	- 43,90	50,1	0,555
	162,7	16,52				
JP 16	162,0	66,38	88,5	- 45,14	54,4	0,863
JP 20	72,7	0,12	-	-	33,2	0,593
JP 17	-	-	-	-	36,1	0,609
JP 88	152,1	43,20	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
JP 91	147,3	29,55	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.

Tabelle 11: Übersicht wesentlicher DSC-Daten der Polyactide vom Typ A2

Probe	T_S [°C]	H_S [J*g ⁻¹]	T_R [°C]	H_R [J*g ⁻¹]	T_g [°C]	Δc_p [J*g ⁻¹ *K ⁻¹]
JP 53	141,7	53,62	95,9	- 47,04	49,0	0,526
JP 52	145,4	44,69	90,7	- 44,43	34,0	0,475
JP 51	145,7	47,10	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
JP 50	159,2	53,23	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
JP 49	166,1	56,62	98,5	- 45,03	57,1	0,540

Tabelle 12: Übersicht wesentlicher DSC-Daten der Polyactide vom Typ A3

Probe	T_S [°C]	H_S [J*g ⁻¹]	T_R [°C]	H_R [J*g ⁻¹]	T_g [°C]	Δc_p [J*g ⁻¹ *K ⁻¹]
JP 169	102,3	5,32	49,4	- 13,03	16,0	0,453
	113,5	20,29	67,5	- 33,91		
	123,1	17,11				
JP 167	146,4	55,50	66,5	- 31,00	31,7	0,536
			79,1	- 10,61		
JP 84	161,6	52,89	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
JP 170	-	-	-	-	10,4	0,529
JP 168	-	-	-	-	23,7	0,581
JP 74	73,5	0,08	-	-	40,6	0,612

Tabelle 13: Übersicht wesentlicher DSC-Daten der Polylactide vom Typ B

Probe	T _S [°C]	H _S [J*g ⁻¹]	T _R [°C]	H _R [J*g ⁻¹]	T _g [°C]	Δc _p [J*g ⁻¹ *K ⁻¹]
JP 72	158,1	59,07	99,2	- 44,17	56,7	0,554
JP 71	160,3	57,22	100,1	- 44,12	56,5	0,518
JP 70	160,8 168,1	18,44 36,99	103,0	- 42,55	58,3	0,558
JP 69	134,0 146,6	5,04 28,74	106,9	- 34,66	47,8	0,558
JP 68	-	-	-	-	19,7	0,640
JP 67	-	-	-	-	31,2	0,614
JP 66	-	-	-	-	39,9	0,598
JP 65	69,9	0,11	-	-	46,4	0,560
JP 64	-	-	-	-	45,0	0,587

Tabelle 14: Übersicht wesentlicher DSC-Daten der Polylactide vom Typ C

Probe	T _S [°C]	H _S [J*g ⁻¹]	T _R [°C]	H _R [J*g ⁻¹]	T _g [°C]	Δc _p [J*g ⁻¹ *K ⁻¹]
JP 101	-	-	-	-	29,2	0,574
JP 97	118,4	10,90	90,1	- 13,58	47,8	0,544
JP 12	135,4 143,4	11,78 29,86	108,6	- 42,06	51,4	0,478
JP 13	165,9	44,50	105,4	- 35,63	57,8	0,514
JP 19	71,7	0,10	-	-	42,1	0,547

Tabelle 15: Übersicht wesentlicher DSC-Daten kommerziell verfügbarer Polylactide der Fa. Boehringer Ingelheim

Substanz	T _S [°C]	H _S [J*g ⁻¹]	T _R [°C]	H _R [J*g ⁻¹]	T _g [°C]	Δc _p [J*g ⁻¹ *K ⁻¹]
RG 503 H	-	-	-	-	47,2	0,597
RG 752	74,3	0,10	-	-	45,1	0,586
L 104	141,8	16,98	107,1	- 17,84	37,2	0,646
R 202 H	-	-	-	-	48,4	0,607

2.1.5 Diskussion

Bei den DSC-Untersuchungen zeigte sich, dass die Poly-L-lactide ein diskretes Schmelzverhalten mit damit verbundener Rekristallisation beim zweiten Aufheizen haben, während dies bei den Racematen und deren Copolymeren nicht oder nur in sehr geringerem Maße der Fall war. Dies ist bekannterweise auf den überwiegend amorphen Charakter dieser Stoffe zurückzuführen. Bei einigen dieser Proben wurde

trotzdem ein Schmelzpeak beim ersten Aufheizen beobachtet, der jedoch von seiner Enthalpie her kleiner ausfiel als bei den kristallinen Poly-L-lactiden.

Es zeigte sich auch, dass sich die Polylactide unter Energiezufuhr in Abhängigkeit von der Molmasse unterschiedlich verhalten. Cohn et al. [47, 180] beschreiben einen linearen Zusammenhang zwischen Molmasse und Schmelzpunkt. Daher wurde anhand der ermittelten Ergebnisse an ausgewählten Beispielen untersucht, ob dieser Zusammenhang auch für Polylactide vom Typ A1, A2 und B gilt. Wie aus Abbildung 18 ersichtlich wird, ist sowohl für den Schmelzpunkt, die Rekristallisationstemperatur als auch für die Glasübergangstemperatur ein linearer Zusammenhang mit der Molmasse der modulierten Polylactide vom Typ A 1 festzustellen.

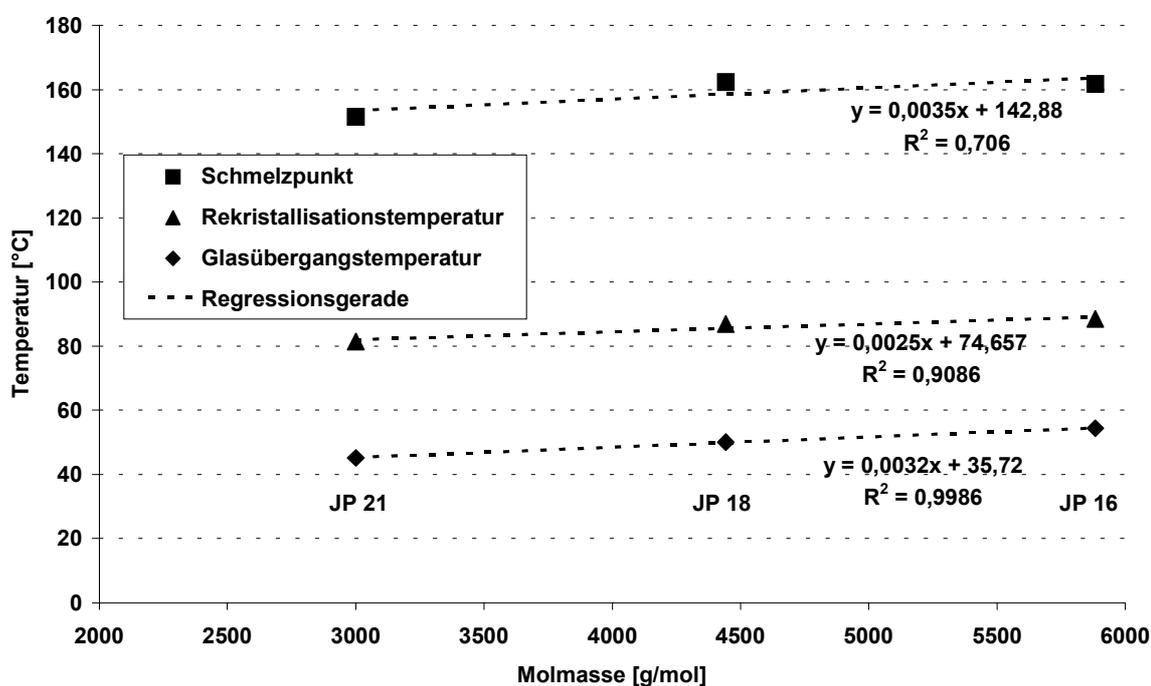


Abbildung 18: Darstellung der Abhängigkeit des Schmelzpunktes, der Rekristallisation und des Glasübergangs von der Molmasse am Beispiel der modulierten Poly-L-lactide vom Typ A1

Bemerkenswerterweise gelingt dies für die anderen untersuchten Polymertypen nicht (Abbildung 19 und Abbildung 20). Lediglich der Schmelzpunkt bei den Polylactiden vom Typ A2 und die Rekristallisation bei den Polylactiden vom Typ B korreliert mit der Molmasse der Polylactide, für die Polylactide vom Typ A2 im Bereich der Molmassen zwischen ca. 4.000 und 20.000 g/mol, für die Polylactide vom Typ B zwischen 14.000 und 20.000 g/mol. Dies lässt sich mit dem größeren Einfluß der Startermoleküle erklären, die sich in diesen Fällen chemisch stark von den Monomeren unterscheiden.

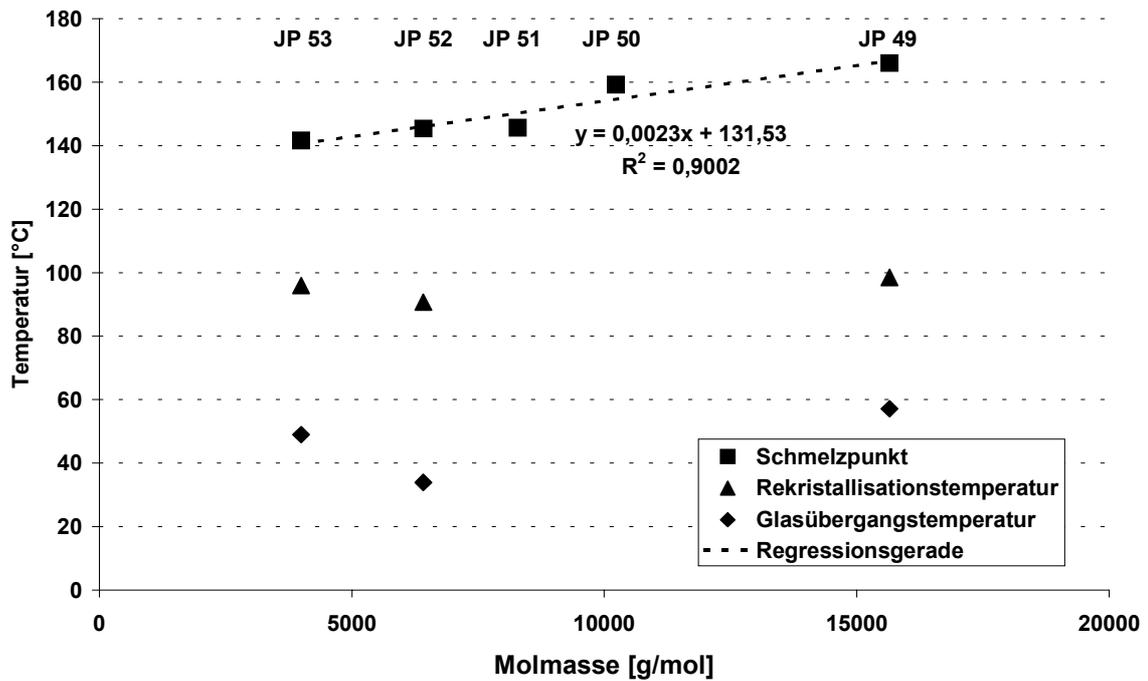


Abbildung 19: Darstellung der Abhängigkeit des Schmelzpunktes, der Rekristallisation und des Glasübergangs von der Molmasse am Beispiel der modulierten Poly-L-lactide vom Typ A2

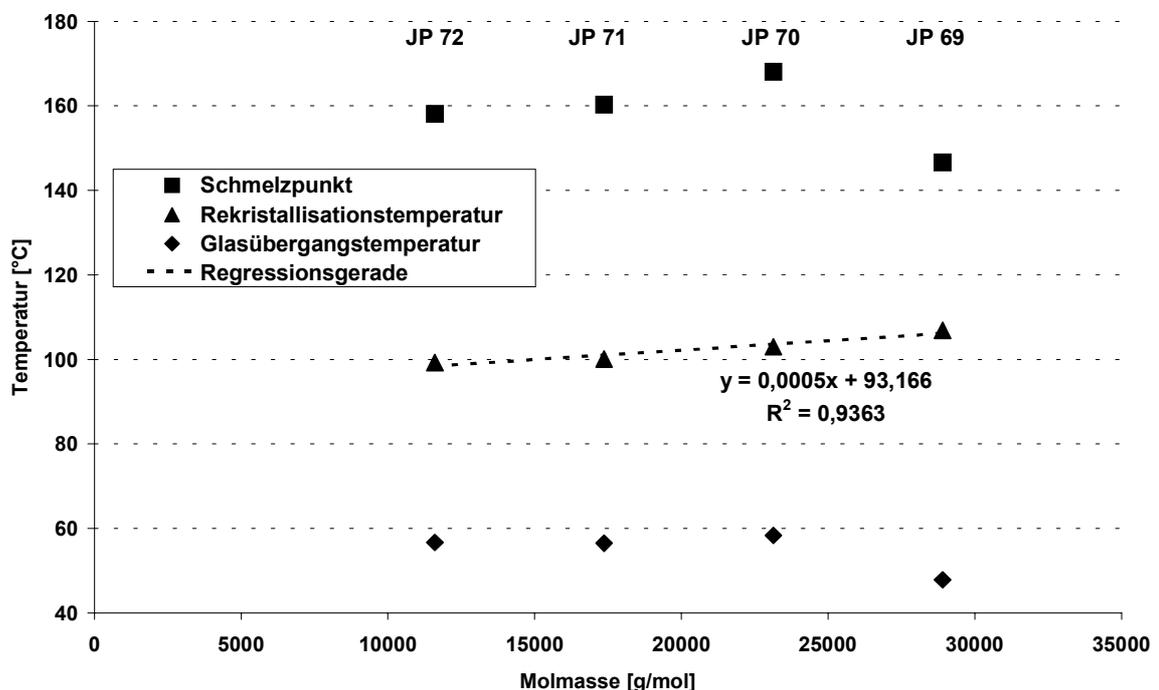


Abbildung 20: Darstellung der Abhängigkeit des Schmelzpunktes, der Rekristallisation und des Glasübergangs von der Molmasse am Beispiel der modulierten Polylactide vom Typ B

Schmelzpunkte und Rekristallisation waren bei den Poly-D,L-lactiden vom Typ A2 nicht zu beobachten. Der Glasübergang, der ein wesentliches Kriterium für die Veränderung der morphologischen Eigenschaften der jeweiligen Stoffe ist, steigt bei diesen Poly-D,L-lactiden logarithmisch mit ansteigender Molmasse (Abbildung 21).

Da die Glasübergangstemperaturen der hier untersuchten modulierten Poly-D,L-lactide im Bereich von ca. 20 °C und 45 °C liegen, somit also im physiologischen Bereich von 37 °C, in dem auch die Freisetzungsuntersuchungen durchgeführt wurden, sind hier signifikante Einflüsse auf die Wirkstoffliberation zu erwarten.

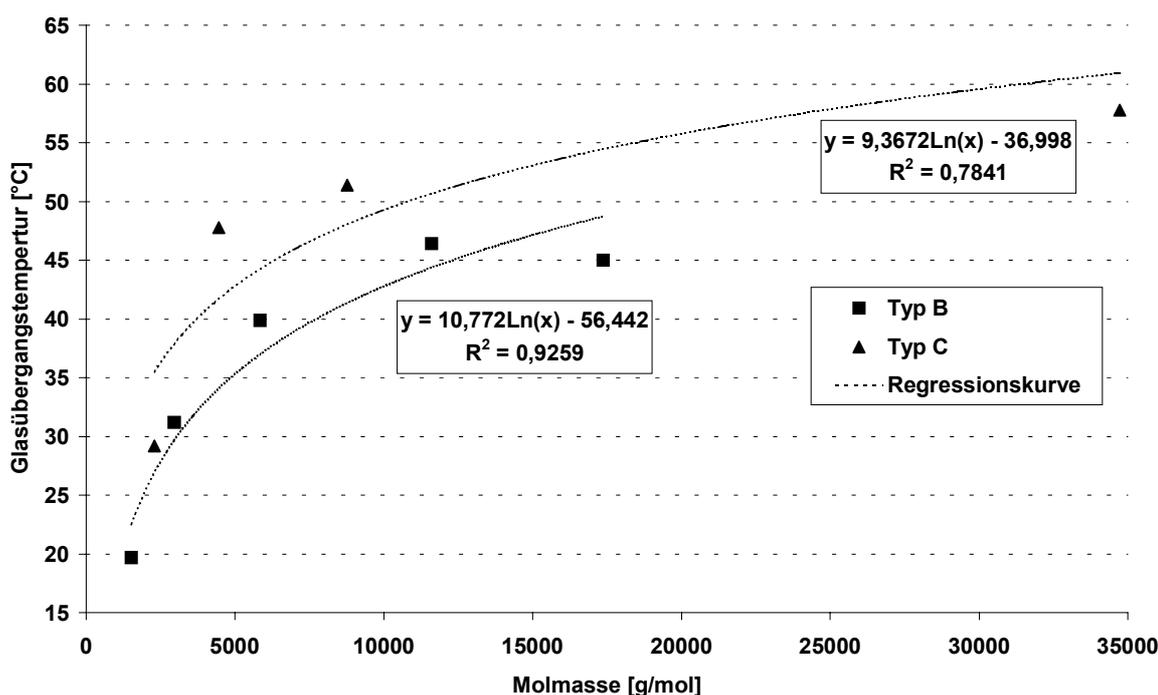


Abbildung 21: Darstellung der Abhängigkeit der Glasübergangstemperatur von der Molmasse am Beispiel der modulierten Poly-L-lactide der Typen A2 und C

Vergleicht man nun die einzelnen Typen von modulierten Polylactiden mit gleicher Anzahl Monomerbausteinen in der Polymerkette untereinander, kann man keine eindeutige Abhängigkeit der Glasübergangstemperatur vom jeweiligen Startermolekül feststellen. Während bei Glasübergang und Rekristallisation ein Anstieg der Temperatur in der Reihenfolge A3 < A1 < A2 zu verzeichnen ist (Abbildung 22), ist der Schmelzpunkt bei dem Polylactid vom Typ A1 am größten, gefolgt von Typ A3 und Typ A2. Die Temperaturdifferenzen bei den Schmelzpunkten (141,7 °C - 155,5 °C) sind jedoch bedeutend geringer als bei den Glasübergängen (31,7 °C - 49,0 °C) und bei den Rekristallisationen (66,5 °C - 95,9 °C).

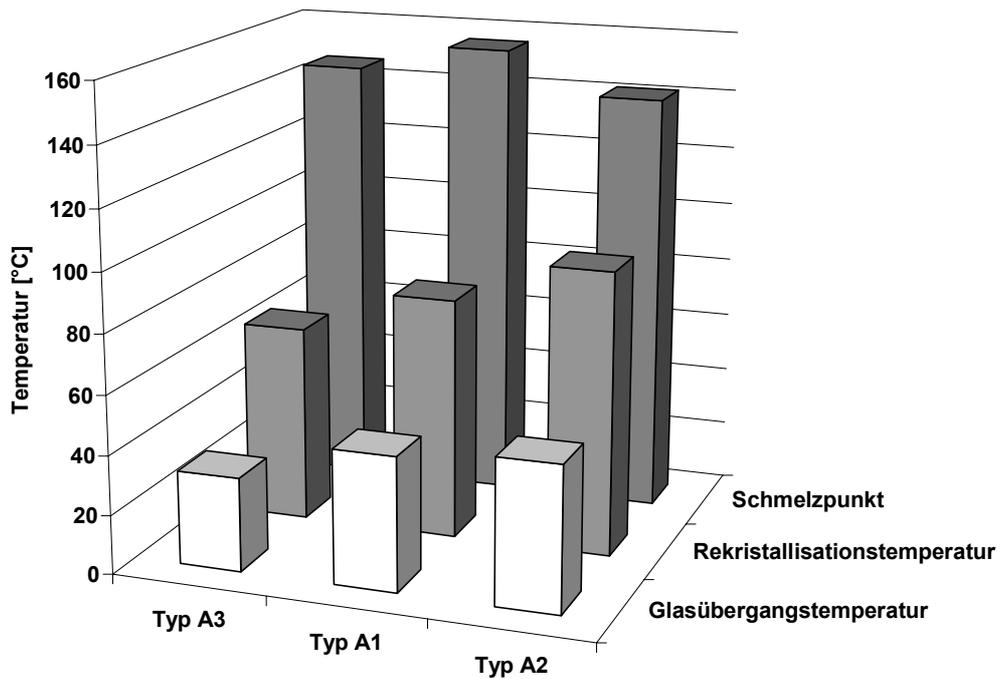


Abbildung 22: Darstellung des Schmelzpunktes, der Rekristallisation und des Glasübergangs für Polylactide verschiedenen Typs

2.2 Galenische Formulierbarkeit der modulierten Polylactide und Polylactide der Fa. Boehringer Ingelheim

2.2.1 Modulierte Polylactide und Polylactide der Fa. Boehringer Ingelheim zur Herstellung von gepreßten Implantaten, Verpreßbarkeit

Folgende Polymere wurden gezielt zur Herstellung von gepreßten Implantaten synthetisiert: JP 12, JP 13, JP 16, JP 18, JP 20, JP 21, JP 23, JP 41, JP 49, JP 50, JP 53, JP 69, JP 70, JP 72, JP 74, JP 76, JP 84, JP 126.

Zusätzlich wurden folgende kommerziell zugänglichen bioabbaubaren Polymere der Fa. Boehringer Ingelheim zur Herstellung von gepreßten Implantaten herangezogen: RG 503 und RG 503 H.

Grundsätzlich liessen sich alle vorgesehenen Polylactide nach der in Teil 3 beschriebenen Methode zur Herstellung von gepreßten Implantaten verwenden, das bedeutet, bei einem Preßdruck von 5 t resultierten formstabile Preßlinge.

2.2.2 Modulierte Polylactide und Polylactide der Fa. Boehringer Ingelheim zur Herstellung von in situ geformten Implantaten, maximal lösbar, maximal spritzbare Konzentration und In-situ-Implantatbildung

Die modulierten Polylactide wurden hinsichtlich ihrer maximal löslichen Konzentration in PEG 400 und ausgewählten bioabbaubaren Oligomeren, der maximal spritzbaren Konzentration sowie der In-situ-Implantatbildung der erhaltenen Lösungen im Freisetzungsmittel getestet (Tabelle 16).

Tabelle 16: Maximal lösliche Konzentration der Polylactide, maximal spritzbare Konzentration und In-situ-Implantatbildung der erhaltenen Lösungen

Probe	Lösungsmittel	Max. lösliche Konz. [%]	Max. spritzbare Konz. [%]	In-situ-Implantatbildung
JP 104	PEG 400	50	50	nein
JP 23	PEG 400	50	25	nein
JP 43	PEG 400	50	50	nein
JP 44	PEG 400	50	50	nein
JP 45	PEG 400	50	50	nein
JP 28	PEG 400	50	50	nein
JP 25	PEG 400	50	50	ja
JP 22	PEG 400	50	50	ja
JP 20	PEG 400	50	12,5	nein
JP 17	PEG 400	50	12,5	nein
JP 33	PEG 400	50	11,1	nein
JP 34	PEG 400	50	11,1	nein
JP 88	PEG 400	50	25	nein
JP 89	PEG 400	0	0	-
JP 90	PEG 400	0	0	-
JP 53	PEG 400	50	12,5	nein
JP 52	PEG 400	50	0	-
JP 51	PEG 400	50	0	-
JP 50	PEG 400	25	0	-
JP 49	PEG 400	25	0	-
JP 39	JP 43	20	20	ja
JP 39	JP 104	20	20	ja
JP 37	JP 43	50	25	ja
JP 37	JP 104	50	25	nein
JP 38	JP 43	20	20	ja
JP 38	JP 104	20	20	ja
JP 40	PEG 400	50	25	nein

Probe	Lösungsmittel	Max. lösbare Konz. [%]	Max. spritzbare Konz. [%]	In-situ-Implantatbildung
JP 41	PEG 400	50	25	nein
JP 42	PEG 400	50	25	nein
JP 169	PEG 400	33,3	20	nein
JP 167	PEG 400	33,3	0	-
JP 126	PEG 400	20	0	-
JP 84	PEG 400	20	0	-
JP 170	PEG 400	50	50	ja
JP 168	PEG 400	33,3	33,3	ja
JP 76	PEG 400	50	20	nein
JP 74	PEG 400	50	20	nein
JP 46	PEG 400	50	50	nein
JP 47	PEG 400	50	50	nein
JP 68	PEG 400	50	50	ja
JP 67	PEG 400	50	50	ja
JP 66	PEG 400	50	50	ja
JP 65	PEG 400	50	25	nein
JP 64	PEG 400	50	12,5	nein
JP 62	PEG 400	50	12,5	nein
JP 101	PEG 400	20	20	ja
JP 97	PEG 400	33,3	20	ja
JP 12	PEG 400	12,5	0	-
JP 13	PEG 400	0	0	-
JP 3	PEG 400	50	25	ja
JP 5	PEG 400	n.b.	n.b.	-
JP 2	PEG 400	50	50	ja
JP 154	PEG 400	50	25	ja
JP 155	PEG 400	50	50	ja
JP 19	PEG 400	50	25	ja
L 104	PEG 400	25	0	-
R 202 H	PEG 400	50	25	ja
RG 503 H	PEG 400	50	25	ja
RG 752	PEG 400	50	25	ja

2.2.3 Diskussion

Poly-L-lactide sind aufgrund ihrer höheren Kristallinität wesentlich schwerer in PEG 400 lösbar als die stärker amorphen Poly-D,L-lactide. Demzufolge eignen sich die ersteren auch besser für die Verpressung zu Implantaten, da die Elastizität wesentlich verringert ist. In den Untersuchungen zur galenischen Formulierbarkeit wurden deshalb vorwiegend die Poly-D,L-lactide untersucht. Es konnte eine Abhängigkeit von der Molmasse gefunden werden, d.h. je höhermolekular ein

Polymer ist, um so geringer war sein Lösungsvermögen in PEG 400 bzw. dem flüssigen Oligomer JP 43. Als Beispiel kann die Reihe der Poly-D,L-lactide JP 62 und JP 64 bis JP 68 dienen (Abbildung 23).

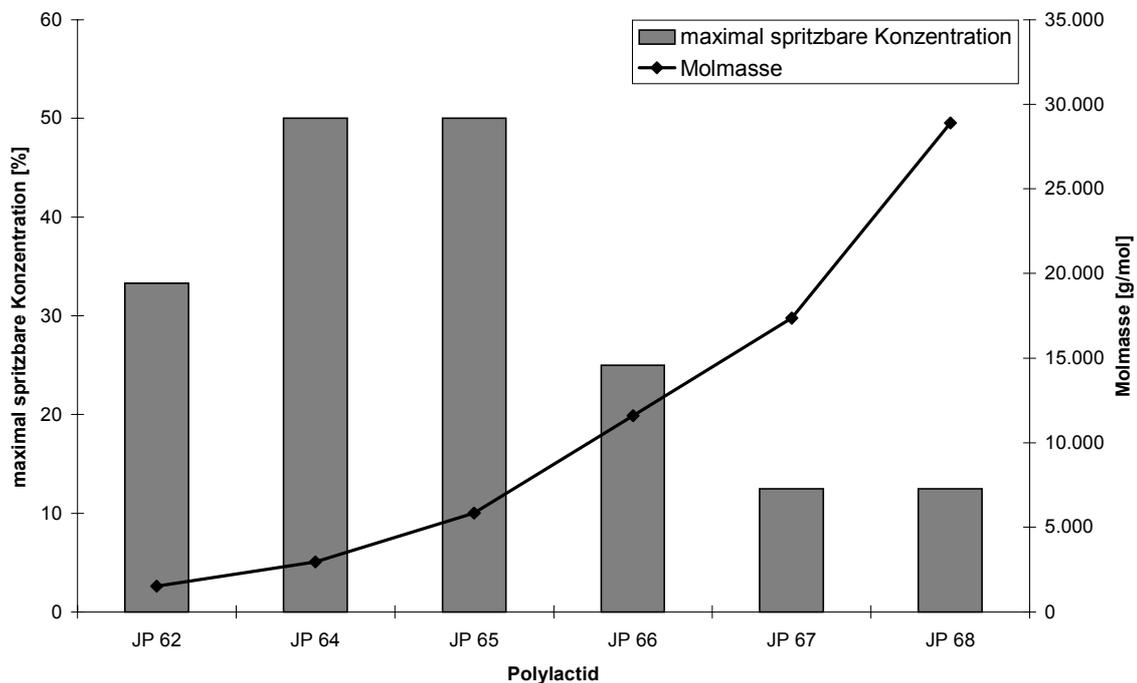


Abbildung 23: Maximal spritzbare Konzentration der Poly lactide JP 62, JP 64 – 68 vom Typ B und deren Abhängigkeit von der Molmasse

Mit steigender Anzahl der Lactidbausteine (JP 62: 200, JP 68: 10) sinkt die maximal spritzbare Konzentration und damit die galenische Formulierbarkeit.

Shively et al. [121] wiesen bereits anhand eines Dreiphasendiagramms nach, dass eine minimale Konzentration an Poly lactid benötigt wird, um eine In-situ-Präzipitation in einem wässrigen Medium auszulösen. Dem steht die Forderung gegenüber, dass

1. eine Lösung entsteht und
2. die erhaltene Lösung noch spritzbar ist.

Es wurden Fälle beobachtet, in denen die geringe lösliche Konzentration des Poly lactids nicht mehr ausreichte, um in situ bei Kontakt mit dem wässrigen Medium eine Präzipitation auszulösen. Unterhalb einer bestimmten Konzentration des Polymers in PEG 400 bildet sich kein in situ geformtes Implantat im Freisetzungsmedium mehr, das Beispiel JP 65 zeigt dies: Das Polymer lässt sich nur mehr in einer Konzentration von 12,5 % lösen, diese reicht jedoch nicht aus, in situ ein Präzipitat auszubilden. Weitere Beispiele dafür sind die Poly lactide JP 40 bis JP 42, die trotz 50 % maximal lösbarer Konzentration und 25 % maximal spritzbarer Konzentration kein in situ geformtes Implantat im Freisetzungsmedium ausbildeten.

2.3 Zielkriterien für die kontrollierte Freisetzung aus den untersuchten Arzneiformen

Theoretische Modelle zur Beurteilung der Freisetzungskinetik von parenteralen Depotarzneiformen und insbesondere von solchen auf Basis bioabbaubarer Polymere sind in der jüngeren Vergangenheit von mehreren Arbeitsgruppen entwickelt worden [181, 182, 183, 184]. Sie stellen sich jedoch als sehr komplex und spezifisch dar, so dass sie zur Vorhersage bzw. zur Beurteilung der in vitro Freisetzungsforschungen der hier behandelten Polymere nur sehr eingeschränkt dienen können. Von Lemaire et al. [185] wurde ein Modell entwickelt, das sich auf die grundsätzlichen zwei Prozesse Diffusion und Erosion stützt, die die Freisetzung maßgeblich beeinflussen. Dieses Modell wurde von den Autoren anhand von in vitro Daten auf seine Aussagefähigkeit überprüft, indem Freisetzungsp Profile aus Depots unter Verwendung von Polylactiden von unterschiedlicher Molmasse aufgenommen wurden. Diese wurden mit den theoretischen Modellprofilen verglichen. Dieser Ansatz von Lemaire et al. erschien für die Beurteilung der in dieser Arbeit vorliegenden Freisetzungsforschungen sinnvoll, da ebenfalls Polylactide unterschiedlicher Molmasse und zusätzlich unterschiedlichen Typs verwendet wurden. Aus vorliegenden Untersuchungen von in situ geformten Implantaten, aber auch gepreßten Implantaten ist bekannt, dass die Freisetzung insbesondere von hydrophilen Wirkstoffen bevorzugt diffusionskontrolliert abläuft [48, 123, 186, 187, 188]. Die Autoren [185] erhielten bei der Anpassung ihrer Modelle 5 verschiedene Zeitprofile (Abbildung 24), von denen Profil 5 auf die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung angewandt wurde.

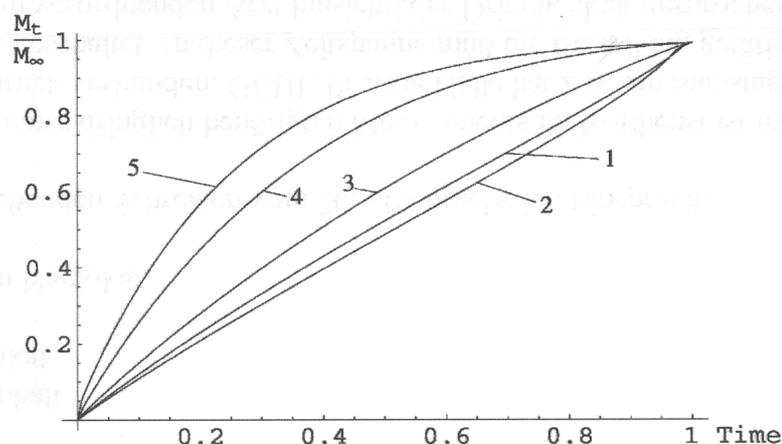


Abbildung 24: Zeitprofile für eine kumulative Freisetzung [185], Modellkurve 5: diffusionskontrollierte Freisetzung einer Kinetik 1. Ordnung

Dieses Zeitprofil würde auf eine kumulative Freisetzung über den angestrebten Zeitraum von 30 Tagen von nahezu 100 % führen.

Da der "Initial burst" Effekt in diesem Modell nicht berücksichtigt ist, wurde dieser als Kriterium für die Freisetzung mit < 20 % nach 24 Stunden festgelegt. Dieser Wert ist abgeleitet aus Freisetzungsprofilen von Proteinen aus bioabbaubaren Depotformulierungen [186, 189]. Aus dieser Forderung und dem Profil 5 in Abbildung 24 wurden folgende orientierende Zielkriterien für die kumulative Freisetzung des Modellproteins Cytochrom C in vitro abgeleitet [Tabelle 17].

Tabelle 17: Orientierende Zielkriterien für die kumulative Freisetzung von Cytochrom C pro Zeiteinheit

Tag	kumulative Freisetzung [%]
1	< 20
2	< 30
3	< 35
4 - 30	3 – 5 % / Tag

Sowohl die gepreßten als auch die in situ geformten Implantate wurden anhand dieser Kriterien hinsichtlich ihrer Eignung als parenterale Depotformulierung bewertet. Sollte die Freisetzung langsamer erfolgen, kann durch Erhöhung der Konzentration des Proteins in der jeweiligen Arzneiform die absolut freigesetzte Menge Cytochrom C gesteuert werden.

2.4 Vorbetrachtungen zu den In-vitro-Freisetzungsuntersuchungen

2.4.1 Auswahl des Freisetzungsmediums

Für die nachfolgenden Untersuchungen wurde folgendes isotonisches Freisetzungsmedium gewählt:

Natriumchlorid	9,0 g
Natriumdodecylsulfat	2,5 g
Natriumazid	0,2 g
Gereinigtes Wasser	ad 1000,0 g

Ein Zusatz von 0,25 % Natriumdodecylsulfat wurde als notwendig erachtet, um die Löslichkeit von Cytochrom C in den 2 ml Freisetzungsmedium sicherzustellen.

2.4.2 Stabilität von Cytochrom C im Freisetzungsmedium

Die Stabilität von Cytochrom C in dem verwendeten Freisetzungsmedium wurde im Rahmen einer Diplomarbeit [190] ermittelt (Abbildung 25).

Der Gehalt an Cytochrom C betrug zwischen 99,5 % nach Tag 1 und 97,6 % nach 21 Tagen im Freisetzungsmedium.

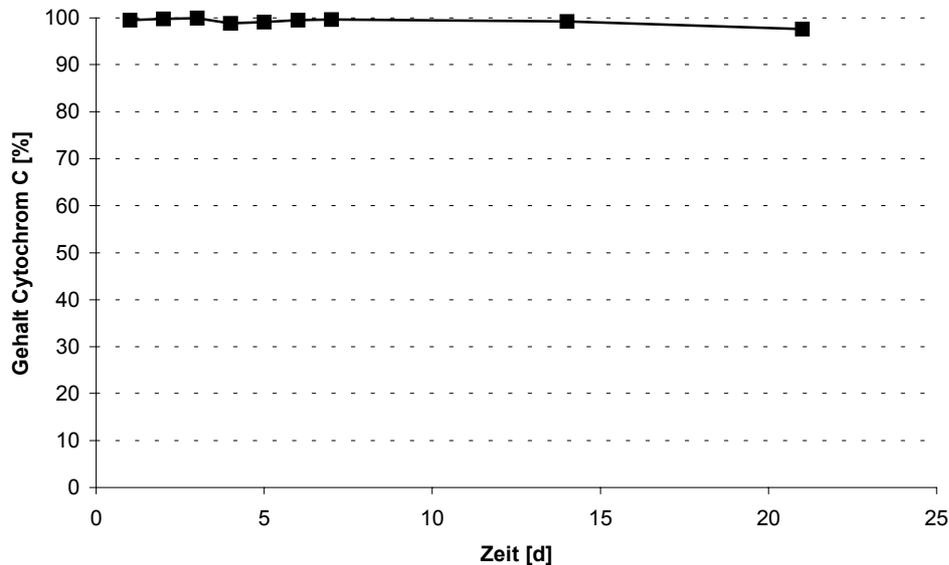


Abbildung 25: Gehalt von Cytochrom C in dem verwendeten Freisetzungsmedium in Abhängigkeit von der Zeit

Somit zeigte sich, dass das Protein im wäßrigen Freisetzungsmedium stabil ist.

2.4.3 Einfluß der Oberfläche der untersuchten Implantate

Dass die Oberfläche der untersuchten Implantate einen großen Einfluß auf die initiale Freisetzung hat, wurde bereits in vorangegangenen Arbeiten beschrieben [190]. Es wurde festgestellt, dass die gepreßten Implantate mit ca. 300 mm² / 200 mg Implantat eine wesentlich geringere Oberfläche aufweisen als die in situ geformten Implantate mit ca. 900 mm² / 2 g Implantat.

In Untersuchungen zur Abhängigkeit der Freisetzung von Cytochrom C von der Oberfläche wurde nachgewiesen, dass die in situ geformten Implantate, die als kleine Kugeln sequentiell ins Freisetzungsmedium eingebracht wurden, aufgrund ihrer größeren Oberfläche einen wesentlich höheren "Initial burst" Effekt zeigen als das Implantat, was als singuläre Form appliziert wurde. Diese Differenzen in der kumulativen Freisetzung wurden mit zunehmender Versuchsdauer jedoch immer geringer.

Bei dieser singulären Form ist die Oberfläche minimal zur Masse der injizierten Lösung. Deshalb wurden alle untersuchten in situ geformten Implantate nach dieser Methode mit einem konstanten Druck von 75 ± 5 N ins Freisetzungsmedium appliziert.

2.4.4 Adsorption / Immobilisierung von Cytochrom C

Es ist beschrieben, dass Proteine ab einer bestimmten Molekülgröße aufgrund ihrer S-S-Brücken und der Vielzahl von Wasserstoffbrückenbindungen zur Adsorption an geladenen Oberflächen, u.a. Polymeroberflächen neigen. Diese Effekte behindern die Freisetzung solcher Wirkstoffe aus bioabbaubaren Formulierungen auf Polymerbasis entscheidend [158, 191]. So konnte wiederholt gezeigt werden, dass eine 100 %-ige Freigabe von Proteinen z.B. aus Mikropartikeln nicht möglich ist, oftmals setzen unter in vitro Bedingungen solche Formulierungen nur bis 60 % des Proteins frei [40]. Dies läßt sich jedoch durch den Zusatz oberflächenaktiver Substanzen steuern, d.h. im günstigsten Falle läßt sich die Adsorption unterdrücken [153].

Von PEG's ist bekannt, dass sie zum einen zur Stabilisierung von Proteinen [166] in Mikropartikeln als auch zu deren Immobilisierung beitragen, d.h. PEG's beeinflussen in positiver Weise, dass sich Proteine in bioabbaubare Polymer inkorporieren lassen, ohne dass ein erheblicher Anteil des Proteins an der Partikeloberfläche reversibel adsorbiert wird und damit in vitro eine rapide Freisetzung dieser adsorbierten Masse erfolgt [192]. Zum anderen verhindern sie wie andere Polymere auch und bereits erwähnt die vollständige Freigabe des Wirkstoffs aus der Arzneiform [193]. Es zeigt sich, dass z.T. ein erheblicher Teil des Cytochrom C entweder an die Moleküle des PEG oder die Polymeroberflächen der jeweiligen Polylactide durch die Herstellung der Suspension des Proteins in den Polymermischungen adsorbiert wird [123].

Da in den folgenden Freisetzungsuntersuchungen aufgrund der Wahl des Freisetzungsmediums und der Zusammensetzung der Arzneiformen mit Polylactiden und bei den in situ geformten Implantaten zusätzlich mit PEG 400 als Lösungsmittel solche Phänomene ebenfalls auftreten können, ist davon auszugehen, dass diese die Freisetzung von Cytochrom C beeinflussen, ohne dass diese quantifiziert werden können. Durch die Konstanz der Versuchsbedingungen sollte von einem annähernd gleichen Einfluß dieser Phänomene ausgegangen werden. Da der Anteil an PEG 400 in den Arzneiformen jedoch schwankt, ist der Einfluß kritisch zu bewerten.

2.5. Untersuchungen zur in-vitro-Freisetzung von Cytochrom C aus gepreßten Implantaten (Ringtabletten)

Das Prinzip, Tabletten auf Basis von Polylactiden herzustellen, ist vielfach in der Literatur beschrieben. Dabei gibt es die Möglichkeit, wie auch von Steendam et al. beschrieben [119], die Einsatzstoffe trocken zu mischen, wobei ein vorheriges Sieben die homogene Verteilung verbessert, und diese Trockenmischung zu tablettieren. Kader et al. [118] vergleichen z.B. die Freisetzung von Phenobarbital aus Tabletten basierend auf Mikrokapseln und Tabletten, die auf mechanischen Mischungen aus Polylactid und Wirkstoff bestehen. Auch Mank et al. [26] und von Büren [50] heben die Tablettierung von Polylactiden aufgrund der guten Verpressbarkeit als günstig hervor und verweisen auf die in dieser Arbeit angewandte gemeinsame Granulierung von Wirk- und Hilfsstoff.

Es wurde das Cytochrom C in 50 %-igem Ethanol gelöst und damit anschließend die hergestellte Mischung aus Polymer und Mannitol feuchtgranuliert. Nach dem Trocknen des Granulats und Sieben wurden die Ringtabletten durch Verpressen auf einer KBr-Pressen hergestellt. Um allerdings eine parenterale Applikation zu ermöglichen, darf der Durchmesser der Presslinge nicht größer als ca. 2 mm sein, damit eine Injektion über ein Besteck durchgeführt werden kann. Daher können die hergestellten und untersuchten Tabletten lediglich eine Differenzierung unter den Polylactiden hinsichtlich ihrer Freisetzungseigenschaften untereinander liefern.

2.5.1 Freisetzung bei Verwendung der Polylactide der Fa. Boehringer Ingelheim

Von den im Rahmen der Arbeit untersuchten Polymeren der Fa. Boehringer Ingelheim eigneten sich das Poly-L-lactid L 104 aufgrund seiner starken Sprödigkeit und das Poly-D,L-lactid-co-glycolid RG 752 wegen der schlechten Benetzbarkeit während der Granulierung nicht für die Herstellung von gepreßten Implantaten. Die Formulierung mit R 202 H erwiesen sich als zu weich und damit nicht ausreichend formstabil. Diese Polymere wurden daher nicht weiter untersucht.

Die Freisetzung von Cytochrom C aus gepreßten Implantaten betrug 42,5 % nach 6 Stunden für RG 503 und 98,08 % nach 6 Stunden für RG 503 H (Abbildung 26). Die Versuche wurden aufgrund der schnellen Freisetzung nicht über 6 Stunden hinaus fortgesetzt.

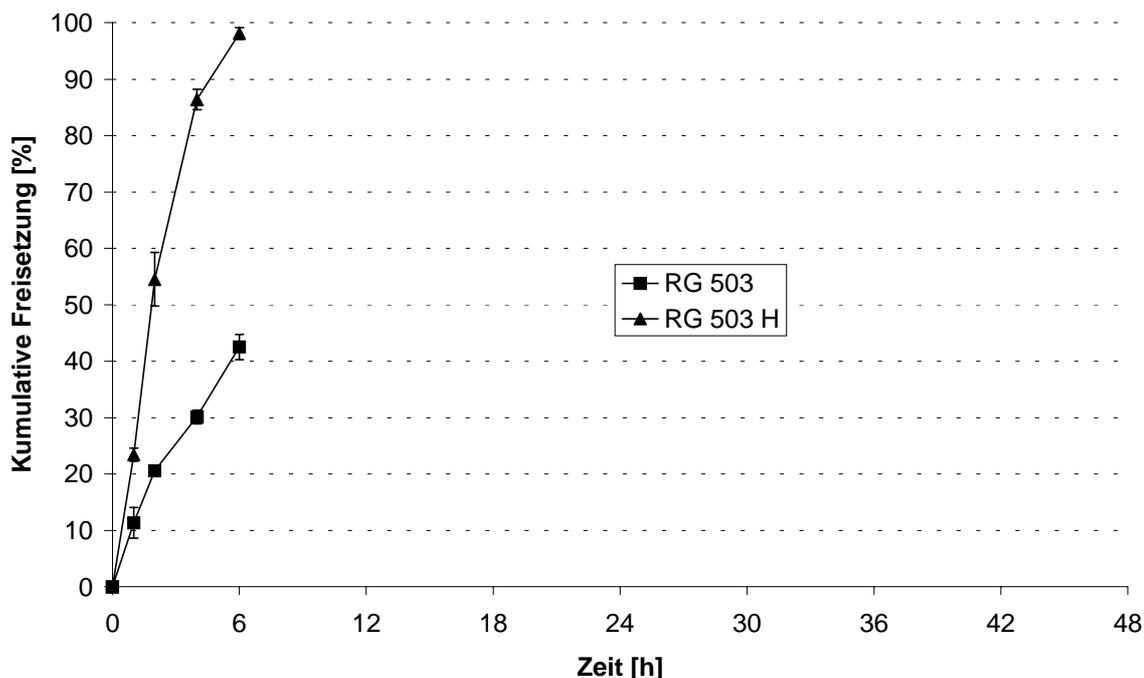


Abbildung 26: Freisetzung von Cytochrom C aus gepressten Implantaten auf Basis Polylactiden der Fa. Boehringer Ingelheim

2.5.2 Diskussion

Die Ringtabletten mit Polymeren der Fa. Boehringer Ingelheim zeigten eine diffusionskontrollierte Freisetzung. Ursache dafür ist wahrscheinlich das ausschließliche Vorliegen einer mechanisch komprimierten Mischung von Cytochrom C in einer amorphen Matrix, die das Eindringen von Wasser in die Formulierung und damit das Herauslösen des Proteins aus der Mischung nicht behindert. Die hydrophilen Endgruppen des Poly-D,L-lactids-co-glycolids RG 503 H fördern zudem zusätzlich das Eindringen von Wasser in das Komprimat. Somit war eine Inkorporation des Proteins in die Polymermatrix mit einfacher Verpressung nicht möglich. Dies bestätigt auch die Formstabilität der Tabletten während der Freisetzungsversuche. Sie zerfielen nach Einbringen in das Medium sehr schnell in kleine Partikel. Wie Steendam et al. bereits mit Tabletten, die mit hochmolekularem Poly-D,L-lactid hergestellt wurden, zeigen konnte, hängt die Freisetzung entscheidend von den Lösungseigenschaften des inkorporierten Wirkstoffs im wässrigen FreisetzungsmEDIUM ab, d.h. hydrophile Wirkstoffe werden schneller freigesetzt als hydrophobe. Das gut lösliche Paracetamol z.B. wurde nach 8 Stunden fast vollständig freigegeben, während das lipophile Prednisolon nach 20 Stunden erst zu ca. 10 % freigesetzt war [119]. Zu ähnlichen Resultaten kommt Oraceska et al.

[188], deren Phenobarbiton-haltigen Tabletten bei pH 7 eine Freisetzung < 50 % nach 6 Stunden aufwiesen, bei pH 2 sogar unter 20 %. Omelczuk und McGinity [48, 187] zeigen dagegen, dass bei Verwendung von Poly-D,L-lactiden mit unterschiedlichen Molmassen die Freisetzung von Theophyllin, einem moderat löslichen Arzneistoff, aus Tabletten auf Basis niedermolekularer Polylactide am schnellsten erfolgt. Höhermolekulare Polylactide führen zwar zu einer Freisetzungverzögerung, allerdings nicht über Tage bzw. Wochen hinweg.

Somit lässt sich feststellen, dass sich hochmolekulare Polylactide für die verzögerte Freisetzung von sehr hydrophilen und gut wasserlöslichen Wirkstoffen, wie es Proteine sind, nicht eignen. Die Frage ergibt sich also, inwiefern die Verwendung der modulierten Polylactide die Freisetzung von Cytochrom C beeinflussen, günstigerweise entsprechend den definierten Zielkriterien ermöglichen.

2.5.3 Freisetzung bei Verwendung der modulierten Polylactide

Während die unter 2.5.2 genannten Autoren grundsätzlich Poly-D,L-lactide für die Herstellung der Tabletten verwendeten, wurden im Rahmen dieser Arbeit sowohl bevorzugt Poly-L-lactide als auch Poly-D,L-lactide untersucht. Die beschriebenen Nachteile der Poly-L-lactide wie z.B. Sprödigkeit konnten bei den relativ niedermolekularen modulierten Polylactiden nicht festgestellt werden.

2.5.3.1 Einfluß der Kettenlänge auf die Freisetzung

Modulierte Polylactide vom Typ A1

Die Freisetzung von Cytochrom C aus gepreßten Implantaten bei Verwendung der modulierten Polylactide mit dem Startermolekül L-(-)-Milchsäureethylester betrug zwischen 57,7 % nach 48 Stunden für JP 21 und 73,99 % nach 48 Stunden für JP 23 (Abbildung 27).

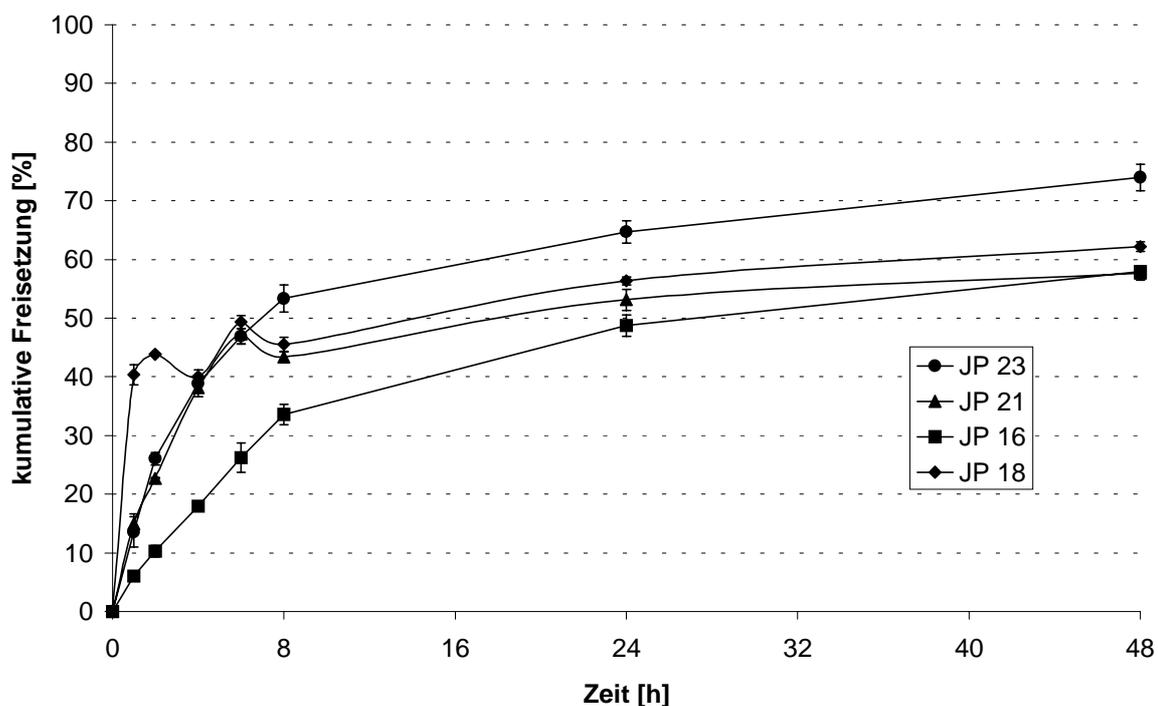


Abbildung 27: Freisetzung von Cytochrom C aus gepressten Implantaten vom Typ A1

Bei den untersuchten Poly-D,L-lactiden lässt sich eine langsamere Freisetzung mit zunehmender Molmasse, insgesamt aber nur eine sehr geringe Abhängigkeit der Freisetzung von der Molmasse feststellen. JP 23 mit 20 WE/OH setzt nur geringfügig schneller Cytochrom C frei als die Proben mit 40 (JP 21), 60 (JP 18) und 80 WE/OH (JP 16). Der Verlauf der Freisetzung unterscheidet sich lediglich in dem unterschiedlich ausgeprägten "Initial burst" Effekt in den ersten zwei Stunden. Insgesamt konnte bei diesen Proben kein freisetzungverzögernder Effekt in der gewünschten Art und Weise für eine konstante Freigabe über Wochen beobachtet werden.

Modulierte Polylactide vom Typ A2

Die Freisetzung von Cytochrom C aus gepressten Implantaten bei Verwendung der modulierten Poly-L-lactide mit dem Startermolekül Cholesterol betrug zwischen 41,15 % nach 48 Stunden für JP 53 und 84,58 % nach 48 Stunden für JP 50 (Abbildung 28).

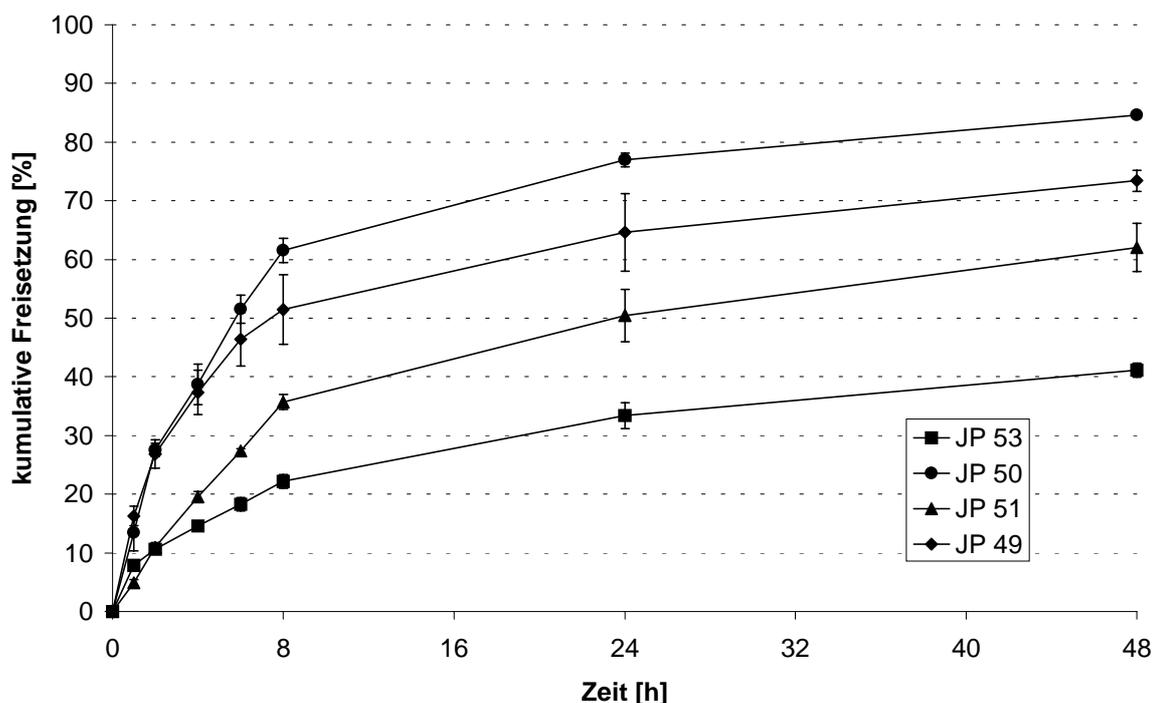


Abbildung 28: Freisetzung von Cytochrom C aus gepressten Implantaten vom Typ A2

Die untersuchten Proben JP 53 (40 WE/OH), JP 51 (120 WE/OH), JP 50 (160 WE/OH) und JP 49 (200 WE/OH) stellen Poly-L-lactide dar. Eine Abhängigkeit der Freisetzung von der Molmasse ist deutlich erkennbar. Die Probe mit der geringsten Molekülmasse JP 53 bewirkt eine freisetzungverzögernde Wirkung über den Untersuchungszeitraum, der den Zielkriterien nahe kommt. Hier lässt sich also der umgekehrte Effekt als bei den modulierten Polylactiden vom Typ A1 beobachten. Bodmeier et al. fanden für hochmolekulare Poly-L-lactide ($M_w > 200.000$ g/mol) ebenfalls eine annähernd 80 %-ige Freisetzung von Theophyllin bei pH 7,4 nach 48 Stunden [194]. Somit scheinen sich niedermolekulare Poly-L-lactide besser zu eignen. Setzt man niedermolekularen Poly-D,L-lactiden hochmolekulares Poly-L-lactid zu [118], beschleunigt sich die Freisetzung ebenfalls. Durch Optimierung der Rezeptur, z.B. den Zusatz von hydrophoben Hilfsstoffen anstelle von Mannitol, die dem Austritt von Cytochrom C aus der Formulierung entgegenwirken, indem sie eine lipophile Barriere bilden, können Formulierungen gefunden werden, die so wie JP 53 die Zielkriterien erfüllen.

Modulierte Poly lactide vom Typ A3

Die Freisetzung von Cytochrom C aus gepressten Implantaten bei Verwendung der modulierten Polymere mit dem Startermolekül 1-Octadecanol betrug zwischen 59,07% nach 48 Stunden für JP 126 und 91,03 % nach 48 Stunden für JP 74 (Abbildung 29).

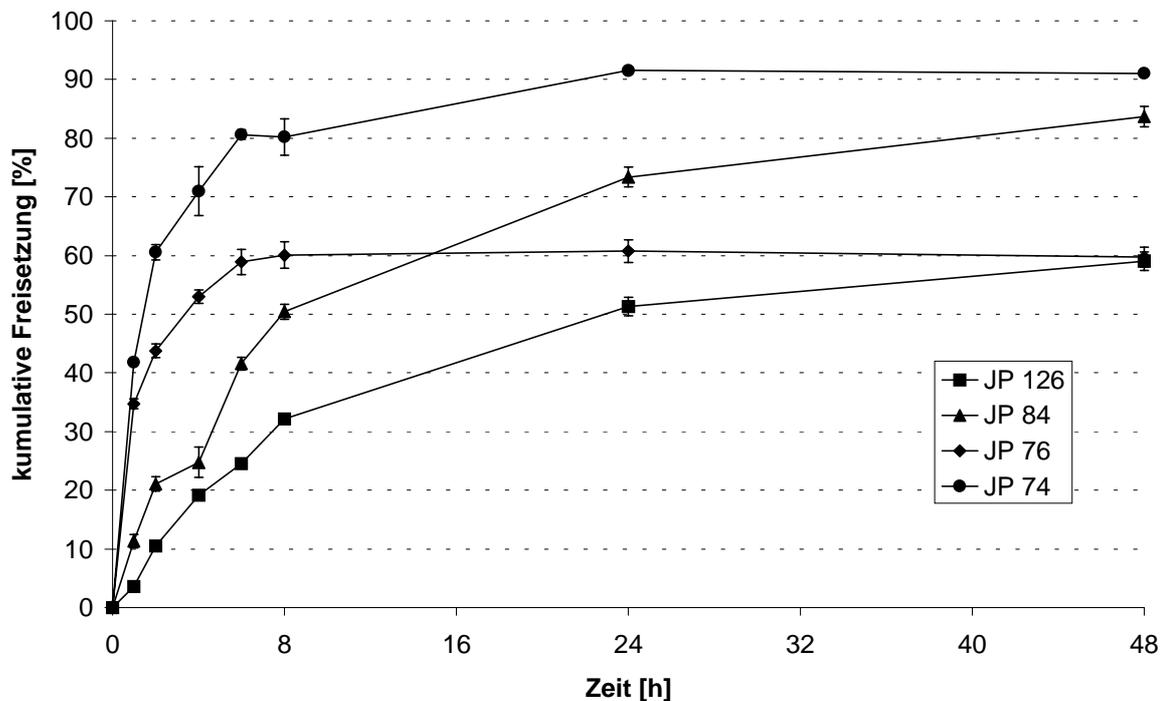


Abbildung 29: Freisetzung von Cytochrom C aus gepressten Implantaten vom Typ A3

Bei den Proben JP 76 (80 WE/OH) und JP 74 (160 WE/OH) handelt es sich um Poly-D,L-lactide, bei JP 126 (80 WE/OH) und JP 84 (120 WE/OH) um Poly-L-lactide. Bei ersteren ist ein sehr starker "Initial Burst" Effekt zu beobachten, und das Depot erschöpft sich schnell nach etwa 8 bis 24 Stunden. Die beiden Poly-D,L-lactide setzen Cytochrom C gleichmäßiger, aber auch wesentlich zu schnell frei. Tendenziell lässt sich jedoch feststellen, dass auch hier die Poly lactide mit höherer Molmasse (JP 84, JP 74) schneller Cytochrom C freisetzen als jene mit niedrigerer. In der Freisetzung nach 48 Stunden verhalten sich Poly-D,L-lactid und Poly-L-lactid mit gleicher Molmasse identisch. Typ A2 und Typ A3 verhalten sich also ähnlich, während bei Typ A1 ein entgegengesetzter Effekt zu beobachten ist. Es scheint darauf hinzudeuten, dass sich bei kürzeren Kettenlängen der Einfluss der hydrophoberen Startermoleküle hinsichtlich einer Verzögerung der Freisetzung

bemerkbar macht. Diese These muß durch die Gegenüberstellung der einzelnen Typen von modulierten Polyactiden bewiesen werden (siehe 2.5.3.2).

Modulierte Polyactide vom Typ B

Die Freisetzung von Cytochrom C aus gepreßten Implantaten bei Verwendung der modulierten Polymere mit dem Startermolekül Propan-1,2-diol betrug zwischen 32,38 % nach 48 Stunden für JP 69 und 75,87 % nach 48 Stunden für JP 72 (Abbildung 30).

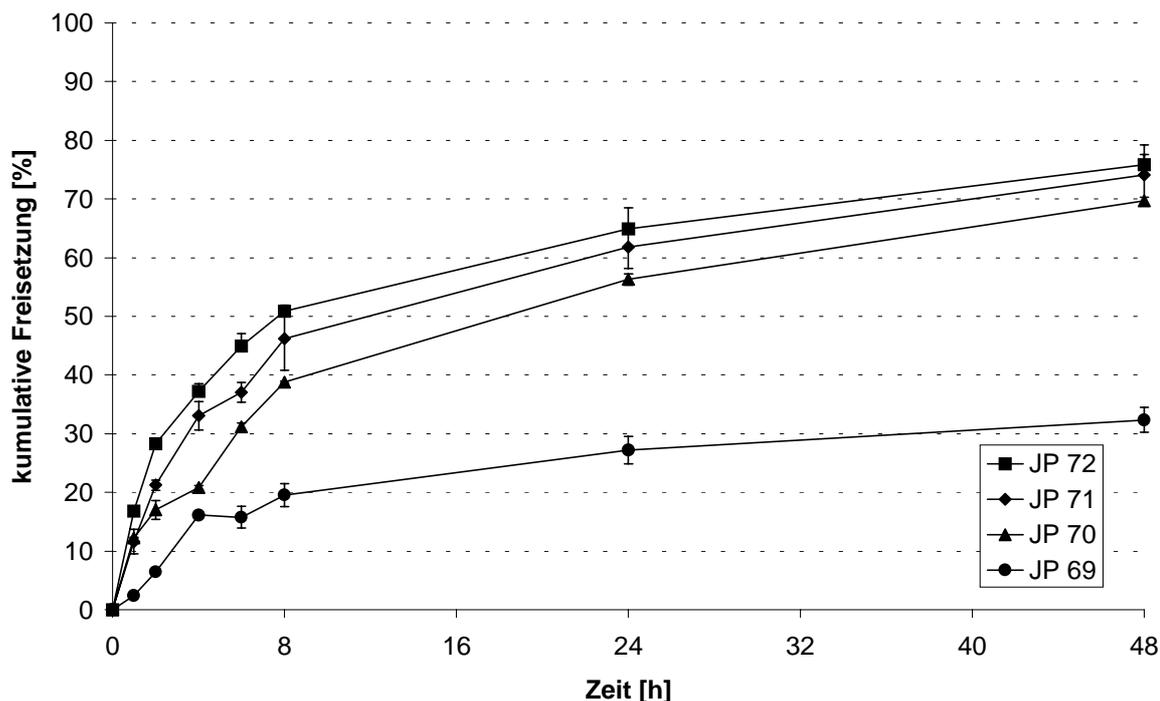


Abbildung 30: Freisetzung von Cytochrom C aus gepreßten Implantaten vom Typ B

Bei den untersuchten Proben handelt es sich um Poly-L-lactide mit 80 WE/OH (JP 72), 120 WE/OH (JP71), 160 WE/OH (JP 70) und 200 WE/OH (JP 69). Durch die Veresterung an beiden Hydroxylgruppen des 1,2-Propandiols entstehen Polymere mit einer hohen Molekülmasse und einer starren Struktur. So kommt es vermutlich während der Verpressung nicht zu einer Inkorporation des Cytochrom C und damit nicht zur Freisetzungsverzögerung. JP 69 mit den längsten Kettenlängen und damit der größten Molmasse ist dagegen in der Lage, die Freisetzung hinsichtlich der Zielkriterien zu steuern. Die kumulative Freisetzung nach 48 Stunden steht in einem Zusammenhang mit der Kettenlänge dahingehend, dass die Freisetzung mit steigender Molmasse abnimmt (Abbildung 31).

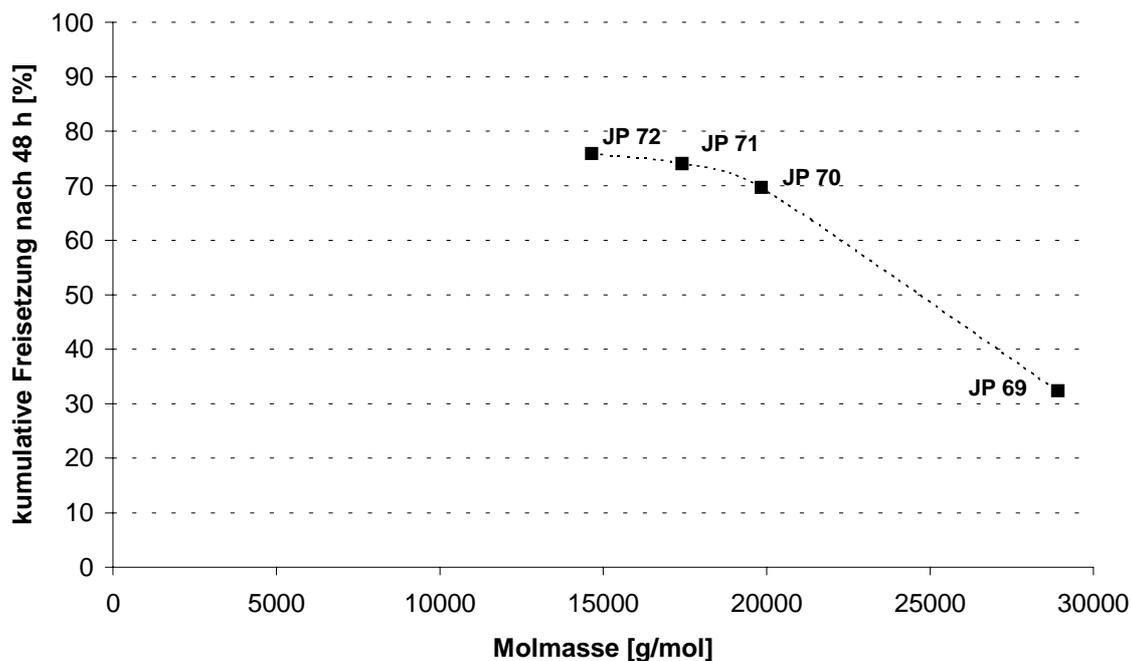


Abbildung 31: Abhängigkeit der kumulativen Freisetzung von der Molmasse der Polylactide vom Typ B

Damit wird deutlich, dass sich unabhängig von einer Molmasse < 15.000 g/mol die Freisetzung nach 48 Stunden ca. 80 % annähert. Das bedeutet, dass sich das Depot, unabhängig von der Geschwindigkeit der Freisetzung, nicht vollständig erschöpft. Dies ist für Depotformulierungen auf Basis von Polylactiden vielfach beschrieben [186, 195, 196, 197]. Andererseits lässt sich durch weitere Erhöhung der Kettenlänge am Startermolekül Propan-1,2-diol die Freisetzung noch weiter verzögern, wie es der lineare Verlauf zwischen Molmasse von ca. 20.000 und ca. 30.000 g/mol ausweist.

Um dies nachzuweisen, müssten weitere Polylactide vom Typ B mit höherer Molmasse als JP 69 synthetisiert und getestet werden. Weiterhin wäre die Formulierung auf Basis von JP 69 über einen Zeitraum von 30 Tagen zu testen um festzustellen, ob dieses gepresste Implantat auch über einen längeren Untersuchungszeitraum als 48 Stunden die Zielkriterien erfüllt.

Modulierte Polylactide vom Typ C

Die Freisetzung von Cytochrom C aus gepressten Implantaten bei Verwendung der modulierten Polymere mit dem Startermolekül 1,1,1-Tris(hydroxymethyl)-propan betrug zwischen 67,34 % nach 48 Stunden für JP 12 und 79,77 % nach 48 Stunden für JP 13 (Abbildung 32).

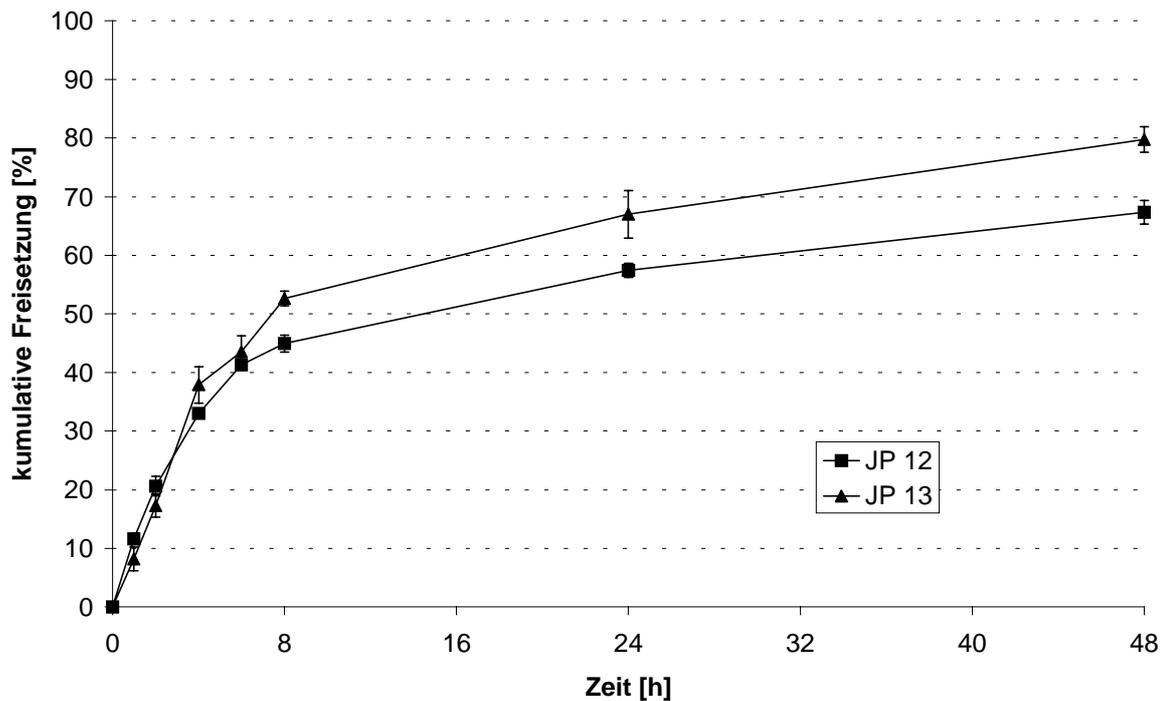


Abbildung 32: Freisetzung von Cytochrom C aus gepreßten Implantaten vom Typ C

Ringtabletten aus den Poly-L-lactiden JP 12 (40 WE/OH) und JP 13 (160 WE/OH) weisen einen zu starken "Initial burst" Effekt auf und setzen bereits nach 2 Tagen mehr als zwei Drittel Cytochrom C frei. Somit eignen sich Typ C Polylactide in gepreßten Implantaten nicht zur kontrollierten Wirkstoffliberation von hydrophilen Makromolekülen.

2.5.3.2 Einfluß des Polymertyps auf die Freisetzung

Um den Einfluß des Typs der modulierten Polylactide betrachten zu können, wurden solche mit gleicher Kettenlänge verglichen, wobei im Falle von Typ B Polylactiden durch die Veresterung an zwei Hydroxylgruppen des Startermoleküls eine annähernd doppelt so große Molmasse und im Falle von Typ C Polylactiden durch die Veresterung an drei Hydroxylgruppen des Startermoleküls eine annähernd dreifach so große Molmasse resultiert.

Die Freisetzung von Cytochrom C aus gepreßten Implantaten mit der Kettenlänge von 80 WE/OH betrug zwischen 55,04 % nach 48 Stunden für JP 16 und 69,42 % nach 48 Stunden für JP 72 (Abbildung 33).

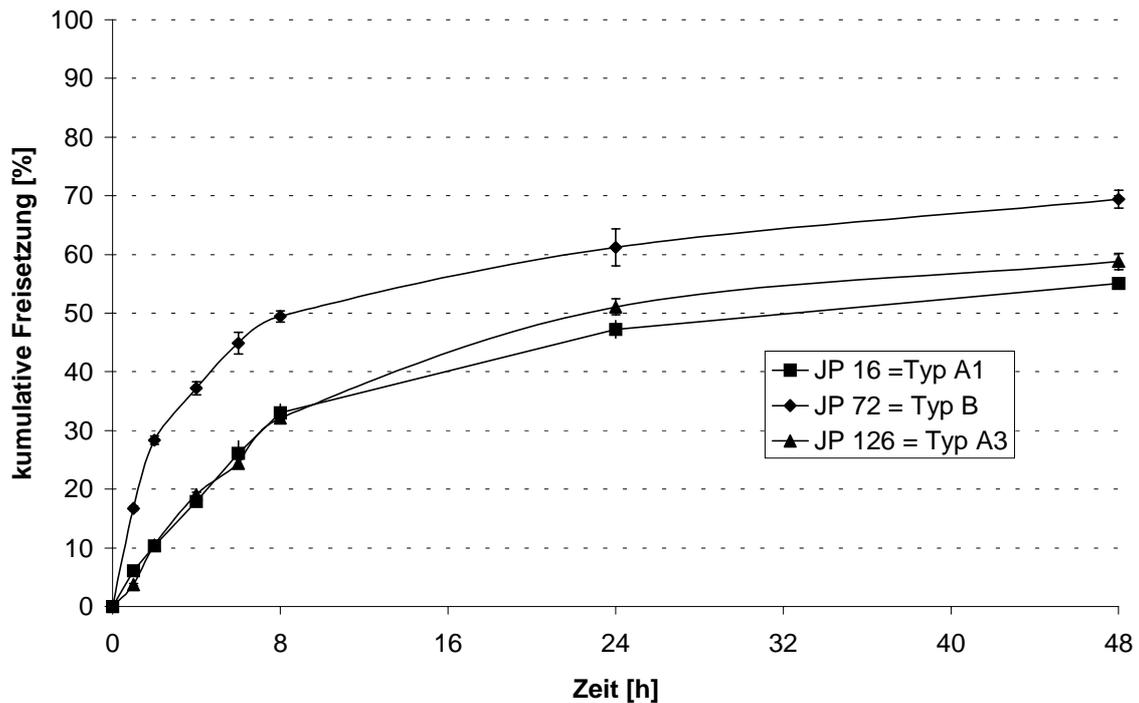


Abbildung 33: Freisetzung von Cytochrom C aus gepreßten Implantaten mit einer Kettenlänge von 80 WE/OH

Anhand der Freisetzungsprofile wird deutlich, dass abgesehen vom unterschiedlichen "Initial burst" Effekt (Freisetzung bis 4 Stunden) keine nennenswerten Unterschiede zu erkennen sind. Somit macht sich der Einfluß des Startermoleküls gegenüber der Kettenlänge von 80 WE/OH nicht bemerkbar. Die größere Molmasse von JP 72 gegenüber den anderen beiden modulierten Polylactiden wirkt sich negativ auf die initiale Freisetzung bis 4 Stunden aus.

Ähnlich verhält es sich bei der nächsten Gruppe, die über die doppelte Anzahl von WE/OH verfügen.

Die Freisetzung von Cytochrom C aus gepreßten Implantaten mit der Kettenlänge von 160 WE/OH betrug zwischen 65,73 % nach 48 Stunden für JP 70 und 79,42 % nach 48 Stunden für JP 13 (Abbildung 34).

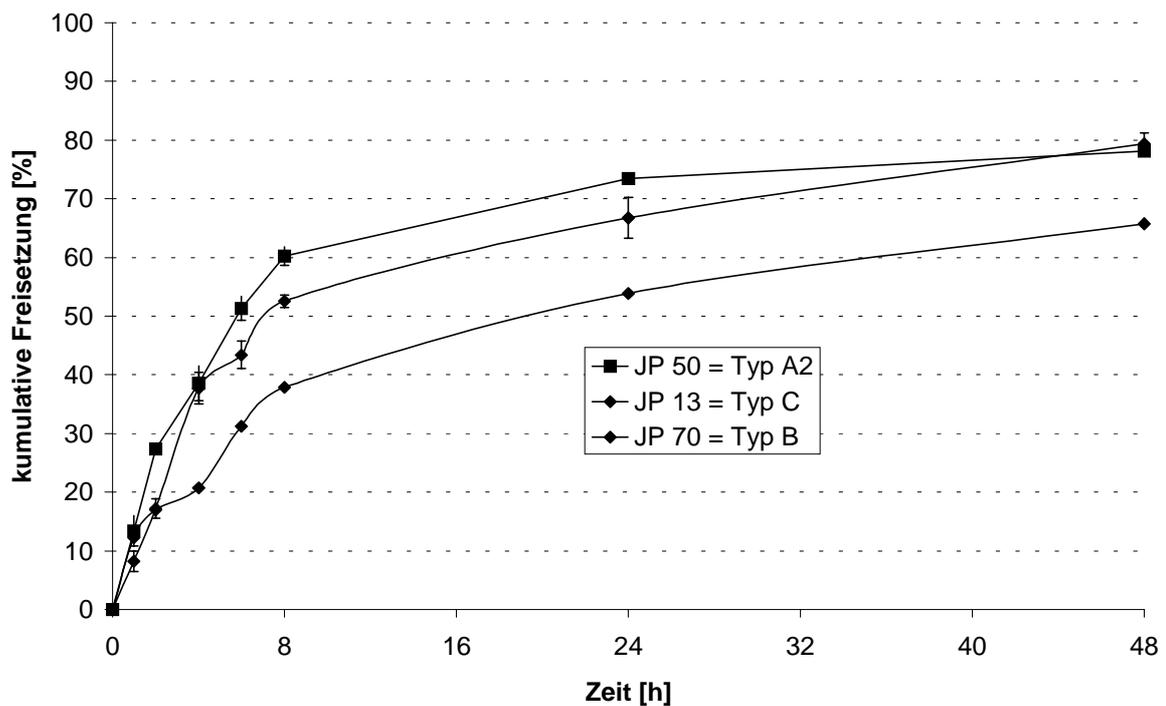


Abbildung 34: Freisetzung von Cytochrom C aus gepreßten Implantaten mit einer Kettenlänge von 160 WE/OH

Auch hier differiert lediglich die initiale Freisetzung bis 4 Stunden, wobei hier allerdings das Polylactid vom Typ B mit der größeren Molmasse gegenüber den anderen modulierten Polylactiden, JP 70, den geringsten "Initial burst" Effekt aufzuweisen hat. Es ist somit kein einheitlicher Trend erkennbar, inwiefern die unterschiedlichen Typen von Polylactiden das Freisetzungsprofil beeinflussen, zu welchem Zeitpunkt der Untersuchungen auch immer.

Dies wird auch anhand der folgenden Gegenüberstellung von modulierten Polylactiden vom Typ A1 (JP 21), Typ A2 (JP 53) und Typ C (JP 12) ersichtlich.

Die Freisetzung von Cytochrom C aus gepreßten Implantaten mit der Kettenlänge von 40 WE/OH betrug zwischen 38,57 % nach 48 Stunden für JP 53 und 66,98 % nach 48 Stunden für JP 12 (Abbildung 35).

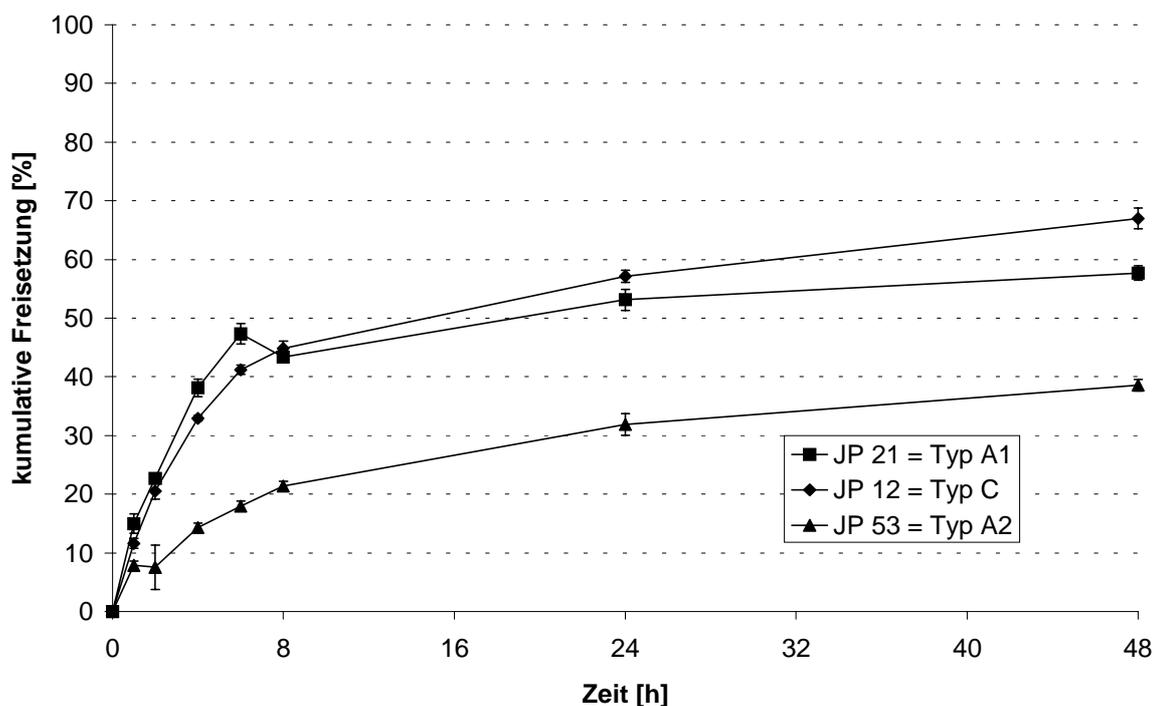


Abbildung 35: Freisetzung von Cytochrom C aus gepressten Implantaten mit einer Kettenlänge von 40 WE/OH

Wie sich schon bei der Untersuchung des Einflusses der Kettenlänge zeigte, eignen sich die modulierten Poly lactide vom Typ A1 als auch vom Typ C nicht für die lang anhaltende Freisetzung von Cytochrom C.

2.5.3.3 Zusammenfassende Diskussion

Die Freisetzung von Cytochrom C aus gepressten Implantaten der untersuchten Poly lactide ist sehr unterschiedlich. Zuerst wurden die kommerziell zugänglichen Poly lactide der Fa. Boehringer Ingelheim untersucht, mit dem Ergebnis, dass sich einige nicht verpressen ließen. Die übrigen setzen das Protein aus der Arzneiform zu schnell frei (> 40 % bzw. ca. 100 % nach 6 Stunden). Somit gewährleisteten diese Poly lactide nicht die Erfüllung der unter 2.3 genannten Zielkriterien.

Im folgenden wurden die modulierten Poly lactide der verschiedenen Typen untersucht, sofern sie sich aufgrund ihrer spezifischen physiko-chemischen Eigenschaften verpressen ließen.

Innerhalb der einzelnen Typen und damit der Startermoleküle ist ein differentes Freisetungsverhalten zu beobachten. Dies ist auf die Kettenlänge und damit direkt auf die Molmasse zurückzuführen. Beide kontrollieren offensichtlich die diffusionsgesteuerte Freisetzung des Proteins.

Poly lactide der Typen A1, A3 und C eignen sich aufgrund ihrer zu schnellen Freisetzung nicht für die Depotanwendung, jedoch stellen sie größtenteils eine Retardierung gegenüber schnellfreisetzenden Arzneiformen wie Tabletten auf Lactosebasis mit Sprengmittel her. Für parenterale Depotformulierungen mit einer Liberation über Wochen spielen sie keine Rolle

Bei den hier untersuchten gepreßten Implantaten führten einzig die Poly lactide JP 53 vom Typ A2 und JP 69 vom Typ B zu einer Freisetzung, die den definierten Zielkriterien entsprach. Untersuchungen über einen Zeitraum von 30 Tagen sind aber unbedingt notwendig, um diese Auswahl zu belegen. Weiterhin sind verschiedene Modifizierungen der Zusammensetzung der gepreßten Implantate denkbar, um durch Zugabe von Hilfsstoffen gezielt auf die Freisetzung einwirken zu können. Verschiedene Autoren haben dies mit Erfolg getan, z.B. durch Zusatz von typischen Tablettierhilfsstoffen wie Lactose [118, 195], mikrokristalline Cellulose und Natrium-carboxymethylstärke [195], Triacetin oder Pluronic [197], aber auch für die parenterale Applikation geeignete Zusätze wie Polyethylenoxide oder Kohlenhydrate [198] und Natriumchlorid [194], dass in physiologischen Medien in unterschiedlichen Konzentrationen vorkommt.

2.6 Untersuchungen zur In-vitro-Freisetzung von Cytochrom C aus in situ geformten Implantaten

Das Prinzip Implantate in situ herzustellen, d.h. durch Immobilisierung in Gegenwart eines wäßrigen Mediums, ist bereits beschrieben. Was die Herstellungsmethoden im Wesentlichen unterscheidet, sind die Wahl des Lösungsmittels und der Vorgang der Herstellung der wirkstoffhaltigen Lösung. In jedem Falle muss das richtige Areal auf einem Dreiphasendiagramm erreicht werden, um eine Präzipitation der Lösung von Polymer und Lösungsmittel in der entsprechenden wäßrigen Lösung, z.B. einem Puffer, zu ermöglichen. Shively et al. [121] stellten fest, dass eine minimale Konzentration an Polymer notwendig ist, um eine Präzipitation auszulösen, anderenfalls bildet sich kein Depot heraus. Diese ist entscheidend von der Art des Polymers, vom Lösungsvermögen und somit der Art des Lösungsmittels abhängig. Als biokompatibles Lösungsmittel verwendeten sie, wie auch Lambert et al. [120] und Kranz [186], Dimethylsulfoxid, N-Methyl-2-pyrrolidon und 2-Pyrrolidon, in denen sie definierte Mengen Polylactid unter Rühren lösten und anschließend das Protein hinzu suspendierten. Ebenso verfahren Shah et al. [123] mit Triacetin bzw. Triethylcitrat als Vehikel zur Lösung von Polylactid-co-glycoliden in einem Konzentrationsbereich von 1 - 20 %. Auch Glycofurol eignet sich nach Eliaz und Kost [125] als Lösungsmittel für Polylactid-co-glycolide. Die Autoren erläutern die Einflußfaktoren auf die Freisetzung von Proteinen wie folgt:

1. Konzentration des Polymers in der Lösung,
2. die Art und Molmasse des gelösten Polylactids und
3. die Beladung des Depots mit dem Protein.

Die in situ Implantate wurden mit Hilfe des patentierten Verfahrens [199] hergestellt, in dem das bioabbaubare Polylactid in PEG 400 bzw. einem niedermolekularen flüssigen Oligolactid durch Zuführen von Wärme gelöst wurde und anschließend, nach dem Erkalten der entstandenen klaren Lösung, das Cytochrom C durch intensives Rühren in der Lösung suspendiert wurde. Die entstandenen Suspensionen wurden mit Hilfe einer Spritze in das Freisetzungsmittel unter konstanten Bedingungen appliziert (siehe 3.2.6 und 3.2.7).

Die sich bildenden Präzipitate der untersuchten Lösungen waren von unterschiedlicher Konsistenz, die sich sowohl von der Art des eingesetzten Polylactids, des Lösungsmittels als auch von den Konzentrationsverhältnissen in der Lösung abhängig erwies.

Standardmäßig wurden die Freisetzungsuntersuchungen über einen Untersuchungszeitraum von 48 Stunden durchgeführt. Lag die Freisetzung bei den modulierten Polyactiden zu diesem Zeitpunkt unter 30 %, wurde die jeweilige Untersuchung fortgesetzt.

2.6.1 Freisetzung aus in situ geformten Implantaten mit Polyactiden der Fa. Boehringer Ingelheim

Unter den kommerziell verfügbaren Polyactiden der Fa. Boehringer Ingelheim wurden die Poly-D,L-lactid-co-glycolide RG 503 H und RG 752 sowie das Poly-D,L-lactid R 202 H ausgewählt. Das Poly-L-lactid L 104 konnte unter den verwendeten Versuchsbedingungen zur Herstellung der Lösung des Polymers in PEG 400 nicht gelöst werden. Das PEG 400 und die aufgebrachte Aktivierungsenergie in Form von Erwärmung waren nicht in der Lage, die Kristallstruktur des Polymers zu zerstören und so eine Lösung zu ermöglichen. Daher wurde L 104 nicht berücksichtigt.

Die Freisetzung von Cytochrom C aus in situ geformten Implantaten mit den genannten Polyactiden beträgt zwischen 17,2 % nach 48 Stunden für RG 503 H und 53,3 % nach 4 Stunden für R 202 H (Abbildung 36).

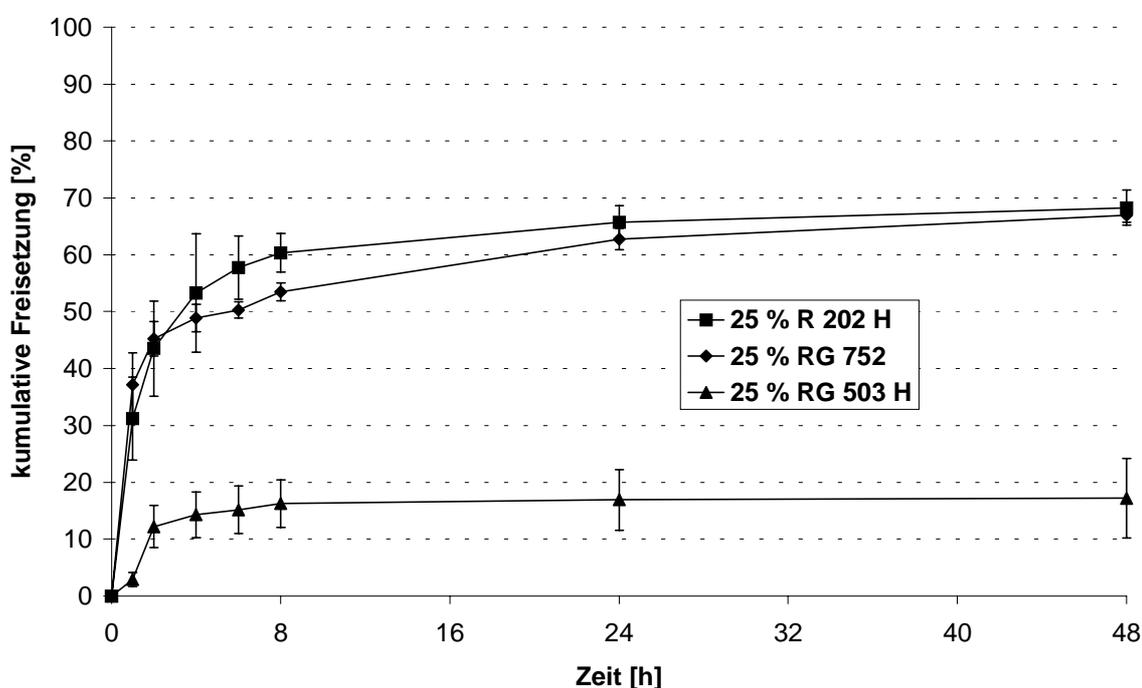


Abbildung 36: Freisetzung von Cytochrom C aus in situ geformten Implantaten mit Polyactiden der Fa. Boehringer Ingelheim

2.6.2 Diskussion

Cytochrom C wird aus den in situ geformten Implantaten auf Basis der Polylactide der Fa. Boehringer Ingelheim sehr unterschiedlich freigesetzt. Implantate mit R 202 H und RG 752 haben bereits nach 4 Stunden mehr als die Hälfte des Proteins freigegeben, während der "Initial burst" Effekt bei Implantaten mit RG 503 H nur ca. 15 % nach 4 Stunden beträgt (Abbildung 36). Danach wird aus allen Implantaten bis zum Untersuchungsende nach 48 Stunden wesentlich langsamer Cytochrom C freigegeben. Dies zeigt, dass nach ca. 4 Stunden der überwiegende Teil des an der Implantatoberfläche haftenden Proteins abgelöst war und die diffusionskontrollierte Freisetzung einsetzte. Lediglich das Implantat mit RG 503 H erfüllte die Zielkriterien einer Freisetzung < 40 % nach 2 Tagen. Es ist aber auch ersichtlich, dass im Zeitraum von 8 bis 48 Stunden nur noch weniger als 1 % des inkorporierten Proteins freigesetzt wird. Dies lässt vermuten, dass sich das Depot sehr schnell erschöpft und eine konstant kontrollierte Freisetzung nicht mehr stattfindet. Erst wenn die Erosion des Polylactid-co-glycolids einsetzt, ist eine weitere Freisetzung von Cytochrom C denkbar.

Daher wurde das Interesse auf die Untersuchung der modulierten Polylactide mit den verschiedenen Typen gelegt, wie diese in der patentierten Depotarzneiform die Freigabe des gewählten Proteins Cytochrom C beeinflussen. Ziel sollte es sein, den ausgeprägten "Initial burst" Effekt zu vermeiden und eine gleichmäßige Wirkstofffreigabe über den gesamten Untersuchungszeitraum zu erzielen.

2.6.3 Freisetzung aus in situ geformten Implantaten mit modulierten Polylactiden

2.6.3.1 Einfluß der Kettenlänge auf die Freisetzung

Modulierte Polylactide vom Typ A1

Die Freisetzung von Cytochrom C aus in situ geformten Implantaten mit modulierten Polylactiden vom Typ A1 beträgt zwischen 4,77 % nach 48 Stunden für JP 25 und 19,23 % nach 48 Stunden für JP 22 (Abbildung 37).

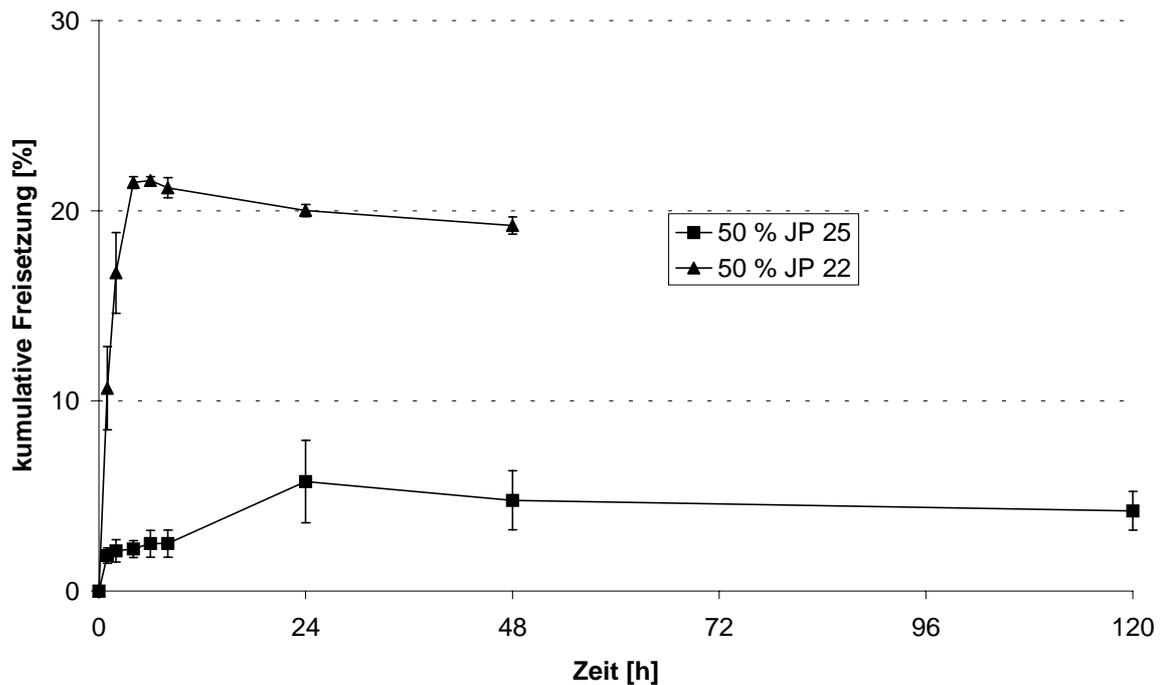


Abbildung 37: Freisetzung von Cytochrom C aus in situ geformten Implantaten mit modulierten Polylactiden vom Typ A1

Cytochrom C wird aus dem in situ geformten Implantat mit 50 % JP 25 nur zu ca. 5 % über 120 Stunden freigesetzt, während bei dem mit 50 % JP 22 nach einer schnellen Freigabe von ca. 20 % Cytochrom C die Readsorption des Proteins der Oberfläche des Implantats einsetzt, indem die Konzentration an freigesetztem Cytochrom C im Freisetzungsmittel abnimmt. Daher sind diese Polylactide in den untersuchten Formulierungen nicht geeignet.

Modulierte Polylactide vom Typ A2, gelöst in flüssigen Oligolactiden vom Typ A1

Bei der Synthese der modulierten Polylactide wurde festgestellt, dass solche vom Typ A1 und nur 2 WE/OH flüssige Oligolactide sind. Bei den Untersuchungen zur Lösbarkeit und Spritzbarkeit hatte sich gezeigt, dass sich Polylactide vom Typ A2 in diesem Oligolactid lösen liessen [175]. Die Poly-D,L-lactide JP 39 (20 WE/OH), JP 37 (40 WE/OH) und JP 38 (80 WE/OH) vom Typ A2 wurden in diesen Untersuchungen also nicht in PEG 400, sondern alternativ in den flüssigen Oligolactiden JP 43 und JP 104 vom Typ A1 gelöst und hinsichtlich Freisetzung geprüft.

Die Freisetzung von Cytochrom C aus in situ geformten Implantaten mit modulierten Polylactiden vom Typ A2 und der modulierten Oligolactide vom Typ A1 als Lösungsmittel beträgt zwischen 14,87 % für JP 39 in JP 104 und 18,95 % für JP 38

in JP 43 nach 8 Stunden und fiel auf 6,97 bzw. 11,22 % nach 168 Stunden (Abbildung 38).

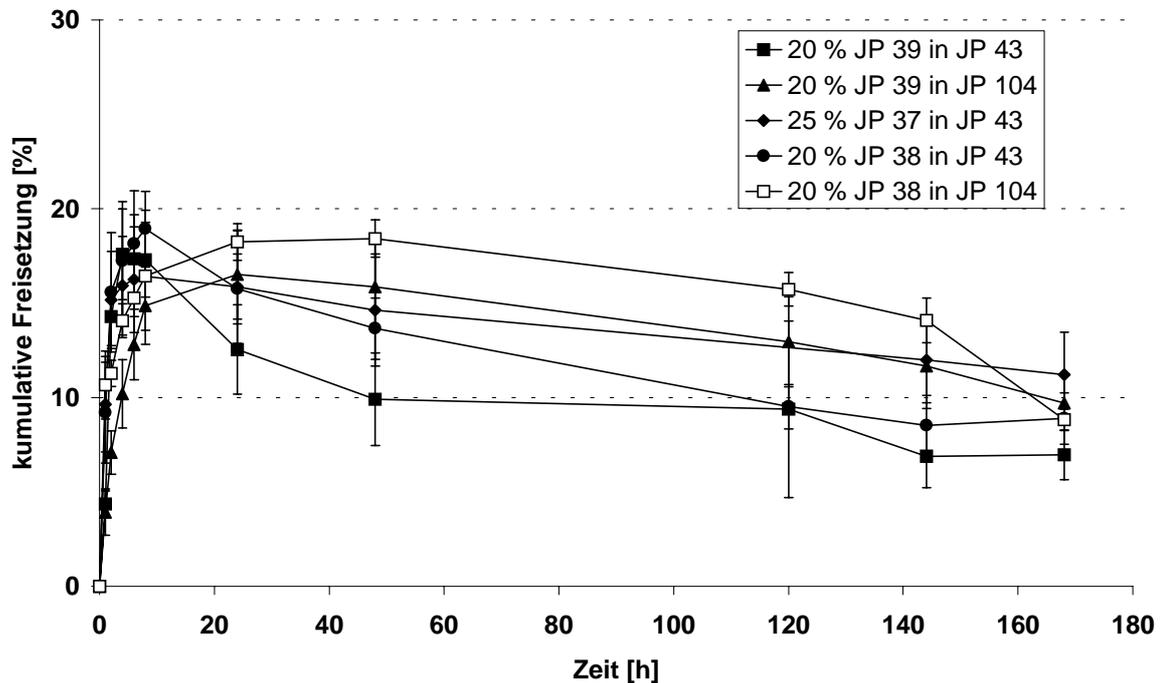


Abbildung 38: Freisetzung von Cytochrom C aus in situ geformten Implantaten mit modulierten Polyactiden vom Typ A2, gelöst in modulierten Oligolactiden vom Typ A1

Bei diesen Formulierungen ist das gleiche Phänomen wie bei den zuvor betrachteten zu beobachten: Nach einem "Initial burst" Effekt von 15 bis 20 % treten bereits nach 8 Stunden Readsorptionseffekte auf. Selbst nach 7 Tagen Untersuchungszeitraum ist dieser Effekt noch nicht durch einen beginnenden Bioabbau der Poly-D,L-lactide überlagert. Es konnte jedoch nicht geklärt werden, ob dieses Phänomen durch die eingesetzten flüssigen Oligolactiden oder die höhermolekularen festen Polyactiden hervorgerufen wird. Da beide jedoch von ihrem chemischen Aufbau abgesehen von dem Startermolekül identisch sind, resultiert die Readsorption vermutlich aus beiden Bestandteilen der Formulierung. Bei den Formulierungen ist darüber hinaus die Readsorption am größten.

Daher wurden die Oligolactide als potentielle Lösungsmittel für die höhermolekularen und festen Polyactide nicht weiter verfolgt.

Modulierte Poly lactide vom Typ A3

Die Freisetzung von Cytochrom C aus in situ geformten Implantaten mit modulierten Poly lactiden vom Typ A3 beträgt zwischen 14,12 % für JP 168 und 42,95 % für JP 170 nach 168 Stunden (Abbildung 39).

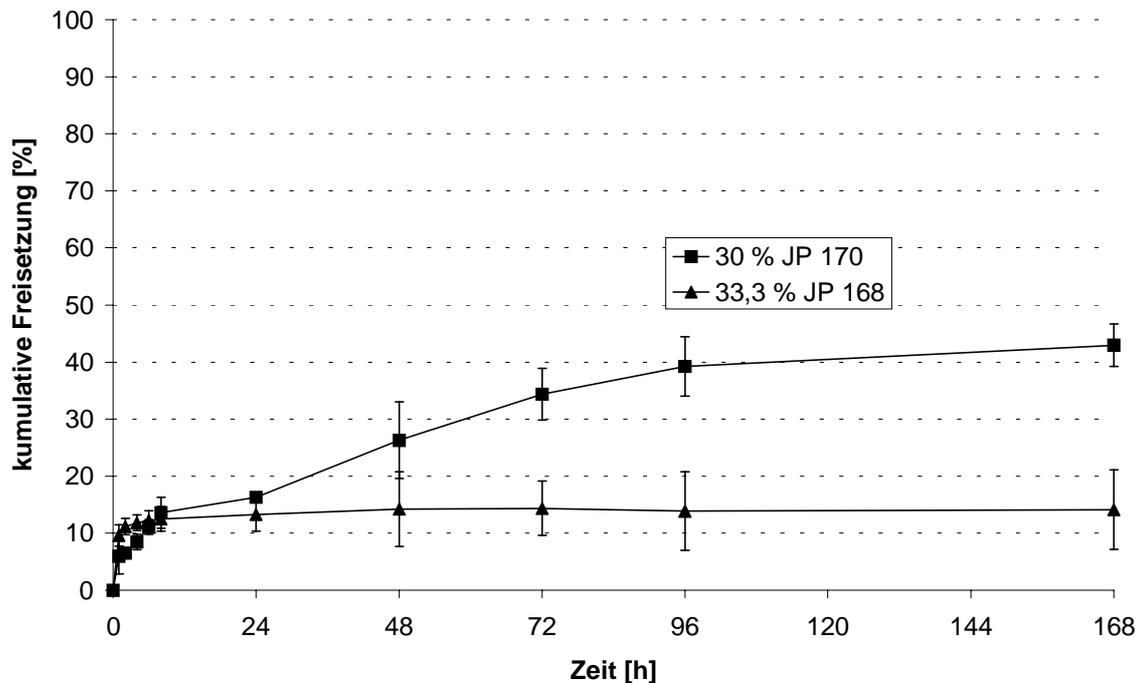


Abbildung 39: Freisetzung von Cytochrom C aus in situ geformten Implantaten mit modulierten Poly lactiden vom Typ A3

Abgesehen von der Tatsache, dass die Konzentrationen der untersuchten Poly lactide geringfügig schwanken, ist feststellbar, dass JP 168 mit der höheren Molmasse (3.154 g/mol) die Freisetzung stark verlangsamt und nach ca. 3 Tagen aufhört. JP 170 dagegen mit einer Molmasse von 1.713 g/mol setzt über den untersuchten Zeitraum von 7 Tagen sehr kontinuierlich Cytochrom C frei und eignet sich daher als potentielle Depotarzneiform, die den Zielkriterien genügt.

Modulierte Poly lactide vom Typ B

Die Freisetzung von Cytochrom C aus in situ geformten Implantaten mit modulierten Poly lactiden vom Typ B beträgt zwischen 16,49 % für JP 68 nach 168 Stunden und 82,46 % für 40 % JP 66 nach 8 Stunden (Abbildung 40).

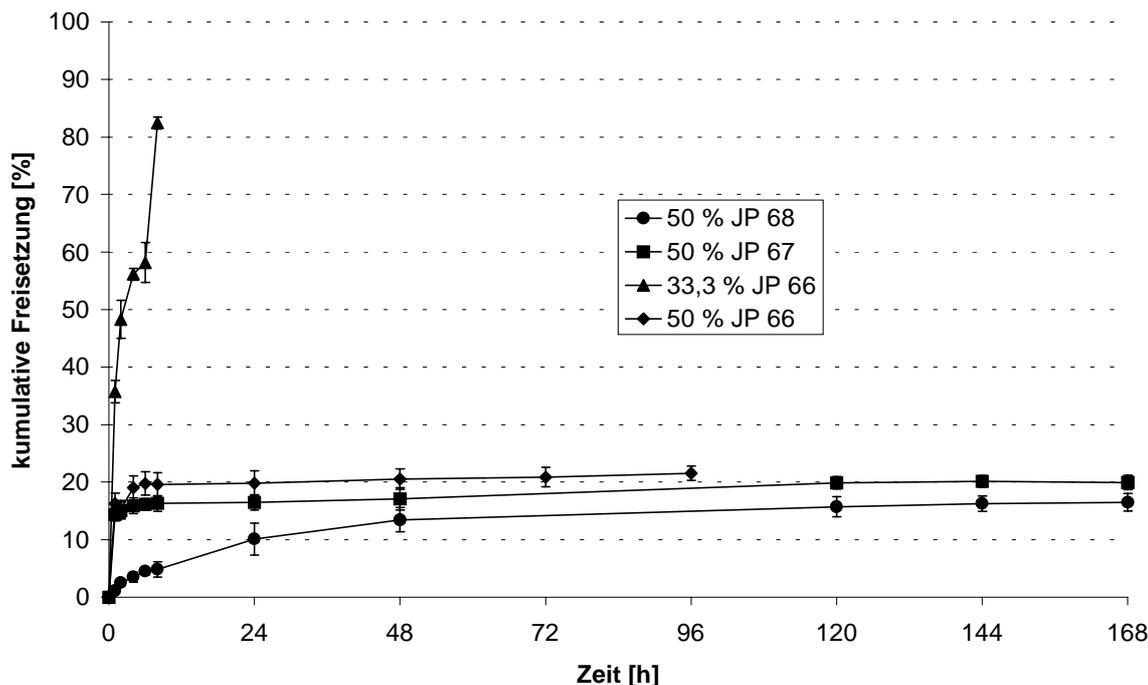


Abbildung 40: Freisetzung von Cytochrom C aus in situ geformten Implantaten mit modulierten Polylactiden vom Typ B

Bei der Probe JP 66, die in zwei verschiedenen Konzentrationen von 33,3 und 50 % untersucht wurde, zeigt sich eine deutliche Abhängigkeit von dem Konzentrationsverhältnis von Polylactid und PEG 400. Während die höhere Konzentration einen "Initial burst" Effekt von < 20 % zeigt, setzt die Formulierung mit 33,3 % JP 66 in PEG 400 bereits mehr als 80 % nach 8 Stunden frei, worauf hin dieser Versuch abgebrochen wurde.

Vergleicht man jedoch die modulierten Polylactide dieses Typs untereinander, liessen sich alle in einer Konzentration von 50 % herstellen, was auf eine gute Lösbarkeit hindeutet. Die Freisetzung ist ebenfalls entsprechend der Zielkriterien verzögert und nach einem "Initial burst" Effekt < 20 % diffusionskontrolliert, was am linearen Verlauf der Freisetzung im Zeitraum von 8 bis 168 Stunden (= 7 Tage) abzulesen ist. Trotzdem setzen diese Depots in dem Zeitraum nur ca. 0,5 %/ Tag frei, was einer zu starken Verzögerung der Freisetzung entspricht. Wie bereits erwähnt, lässt sich diese diffusionskontrollierte Phase, die sich mit dem beginnenden Abbau des Polylactids überschneidet, durch Zusatz geeigneter, die Freisetzung beeinflussender Hilfsstoffe steuern, z.B. den Zusatz hydrophiler Stoffe, die das Eindringen von wässrigem Freisetzungsmittel in das Depot erleichtern und sogenannte Diffusionskanäle bilden können.

Modulierte Poly lactide vom Typ C

Die Freisetzung von Cytochrom C aus in situ geformten Implantaten mit modulierten Poly lactiden vom Typ C beträgt zwischen 51,98 % für JP 3 nach 168 Stunden und 68,82 % für 40 % JP 97 nach 48 Stunden (Abbildung 41).

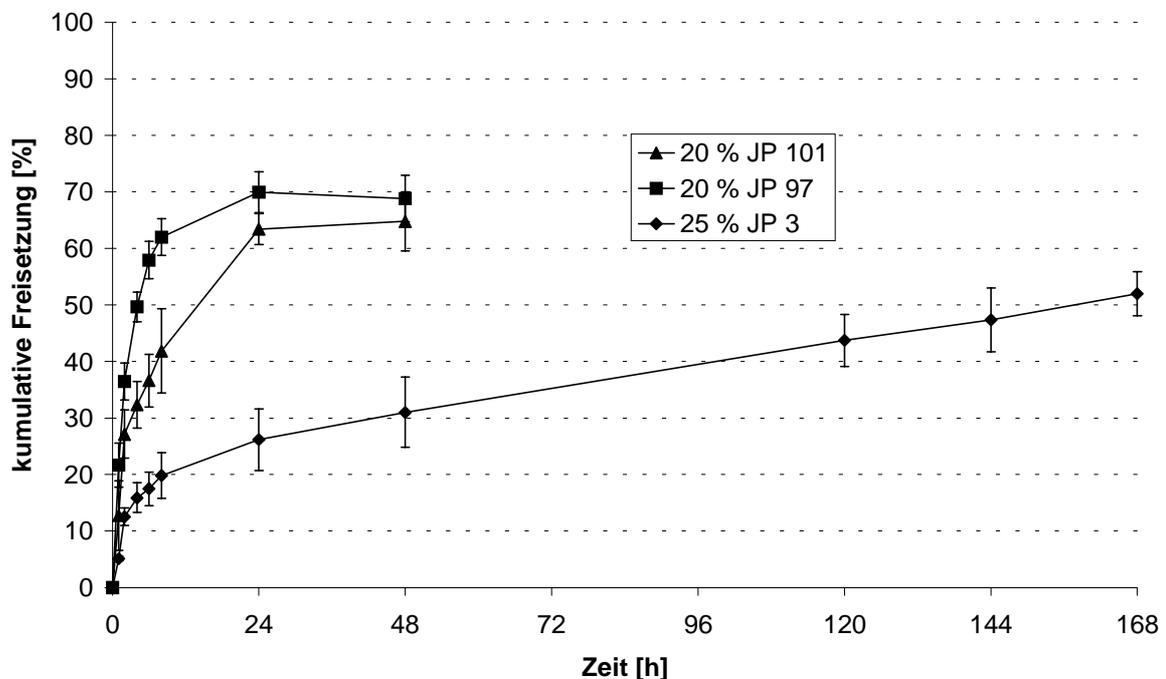


Abbildung 41: Freisetzung von Cytochrom C aus in situ geformten Implantaten mit modulierten Poly lactiden vom Typ C

Der "Initial burst" Effekt für die Freisetzung aus Implantaten mit modulierten Poly-L-lactiden JP 97 und JP 101 mit über 40 % bzw. über 60 % nach 8 Stunden ist zu hoch, und nach 24 Stunden wird kein nennenswerter Anstieg der Freisetzung mehr beobachtet. Dem gegenüber setzt das Implantat mit Poly-D,L-lactid JP 3 mit wesentlich schwächerem "Initial burst" Effekt Cytochrom C über einen Zeitraum von 7 Tagen sehr gleichmäßig frei. Die Zielkriterien entsprechend Kapitel 2.3 an eine verzögerte Freisetzung sind somit für dieses Implantat erfüllt.

Ein geändertes Bild ergibt sich, wenn man die Poly lactid-co-glycolide betrachtet, und zwar die Proben JP 2, JP 154 und JP 19.

Die Freisetzung von Cytochrom C aus in situ geformten Implantaten mit modulierten Poly lactiden vom Typ C beträgt zwischen 12,76 % für 50 % JP 2 nach 48 Stunden und 58,27 % für 25 % JP 19 nach 4 Stunden (Abbildung 42).

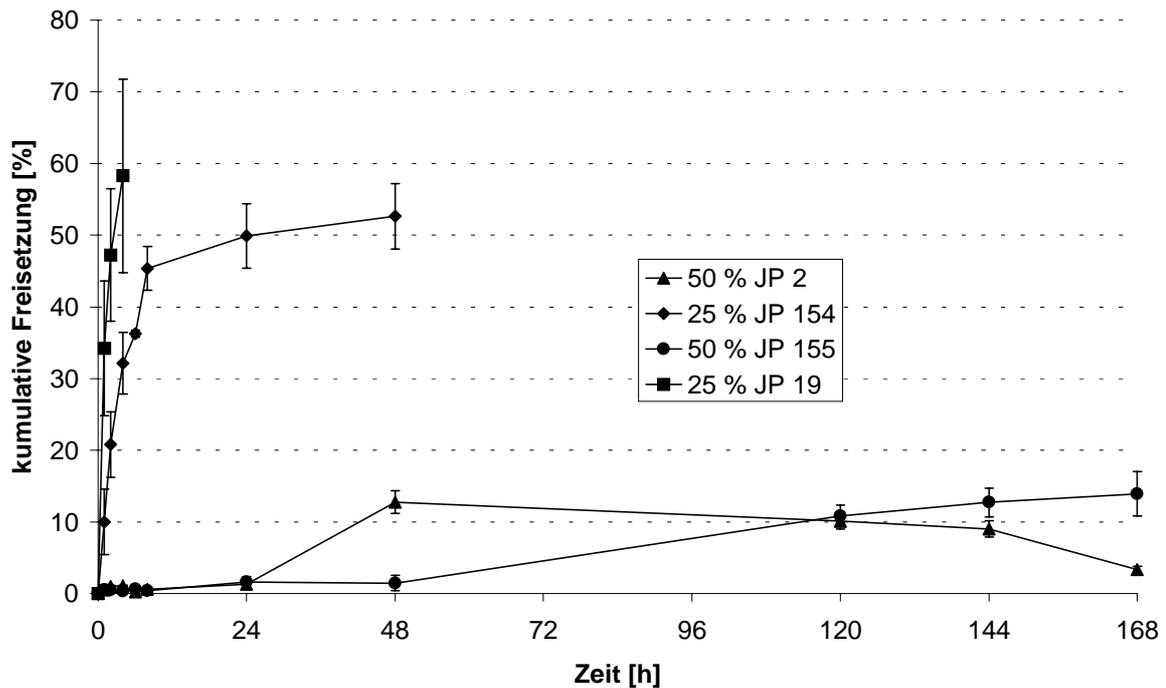


Abbildung 42: Freisetzung von Cytochrom C aus in situ geformten Implantaten mit modulierten Polylactid-co-glycoliden vom Typ C

Die Implantate mit JP 154 und JP 19 weisen einen hohen "Initial burst" Effekt auf und haben nach 4 Stunden bereits ca. 40 bzw. 60 % von Cytochrom C freigesetzt. Die Versuche wurden nach 8 bzw. 48 Stunden abgebrochen. Ein ungewöhnliches Freisetzungverhalten zeigt die Formulierung mit JP 2. Die ersten 24 Stunden findet annähernd keine Liberation statt, die nächsten 24 Stunden ca. 10 %. Danach setzt die Readsorption des Proteins ein, die sich über den gesamten Untersuchungszeitraum fortsetzt. Im Gegensatz dazu steht das Implantat mit JP 155. Nachdem es bis 48 Stunden kaum Cytochrom C freisetzt, steigt die Liberation dann auf ca. 2 bis 3 % pro Tag an und erfolgt auf gleichmäßige Weise. Die Freisetzung ist insgesamt etwas gering, aber der Zusatz von hydrophilen Hilfsstoffen kann zu einer Beschleunigung beitragen (siehe Typ B). Daher eignet sich diese Formulierung als Depotarzneiform entsprechend den Zielkriterien.

2.6.3.2 Einfluß des Konzentrationsverhältnisses PEG - moduliertes Poly lactid auf die Freisetzung

Am Beispiel des Poly-D,L-lactids JP 67 vom Typ B und des Poly-D,L-lactids JP 170 vom Typ A3 wurde die Abhängigkeit des Konzentrationsverhältnisses moduliertes Poly lactid zu PEG 400 auf die Freisetzung von Cytochrom C untersucht. Die Freisetzung mit verschiedenen Konzentrationen von JP 67 in PEG 400 beträgt zwischen 15,97 % für 50 % JP 67 nach 96 Stunden und 68,19 % für 10 % JP 67 nach 48 Stunden (Abbildung 43).

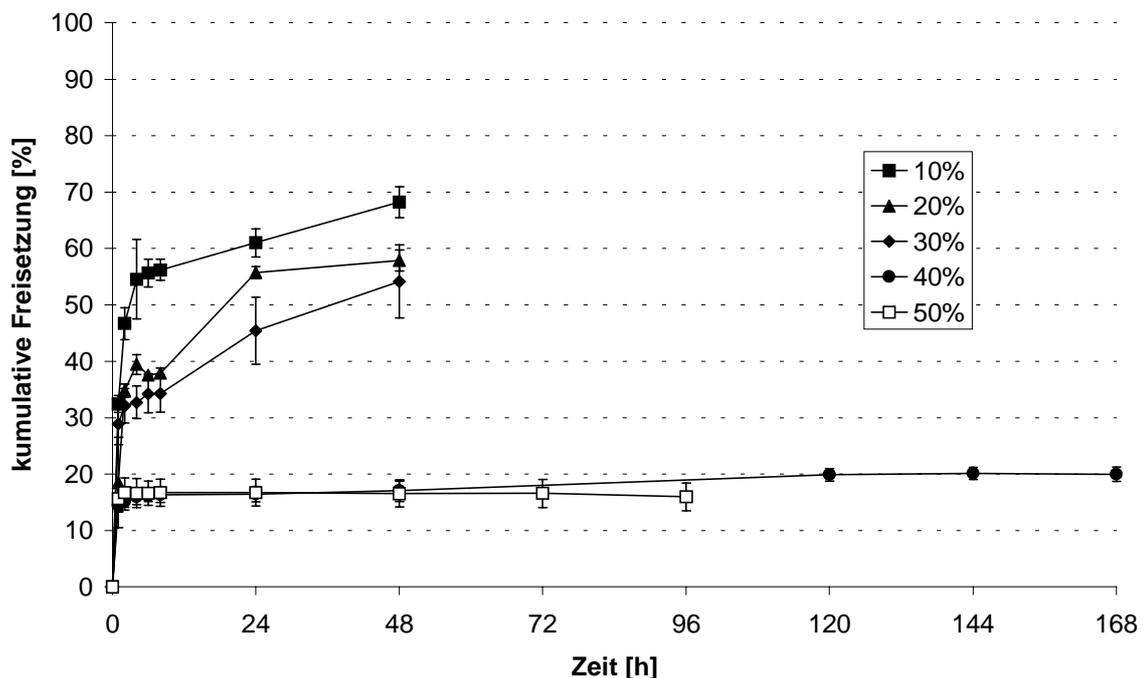


Abbildung 43: Freisetzung von Cytochrom C aus in situ geformten Implantaten mit dem modulierten Poly lactid JP 67 vom Typ B

Wie aus Abbildung 43 ersichtlich ist, läßt sich eine deutliche Abhängigkeit der Freisetzung von der Konzentration des modulierten Poly lactids in der Formulierung feststellen. Während die Formulierungen mit 10, 20 bzw. 30 % JP 67 Cytochrom C sehr schnell freisetzen (> 50 % nach 48 Stunden), sind bei den 40 %- und 50 %-igen Formulierungen entsprechend den Zielkriterien resultierende Verzögerungen in der Liberation von Cytochrom C zu beobachten, verbunden mit einem geringen "Initial burst" Effekt. Das letztgenannte Depot neigt jedoch dazu, das Protein nach 48 Stunden nicht mehr freizusetzen bzw. zu reabsorbieren. Somit deutet sich an, dass hohe Konzentration an moduliertem Poly lactid die Freisetzung hinreichend

kontrollieren, aber auch die Readsorption fördern. Zusätze von oberflächenaktiven Stoffen, z.B. nichtionische Tenside sind in der Lage diese möglicherweise zu unterdrücken. Dieses müsste in weiteren Versuchen zur Verbesserung der Formulierungen untersucht werden.

Bei JP 170 zeigt sich folgendes: Die Freisetzung von Cytochrom C aus in situ geformten Implantaten mit verschiedenen Konzentrationen in PEG 400 beträgt zwischen 15,97 % für 50 % nach 96 Stunden und 68,19 % für 10 % nach 48 Stunden (Abbildung 44).

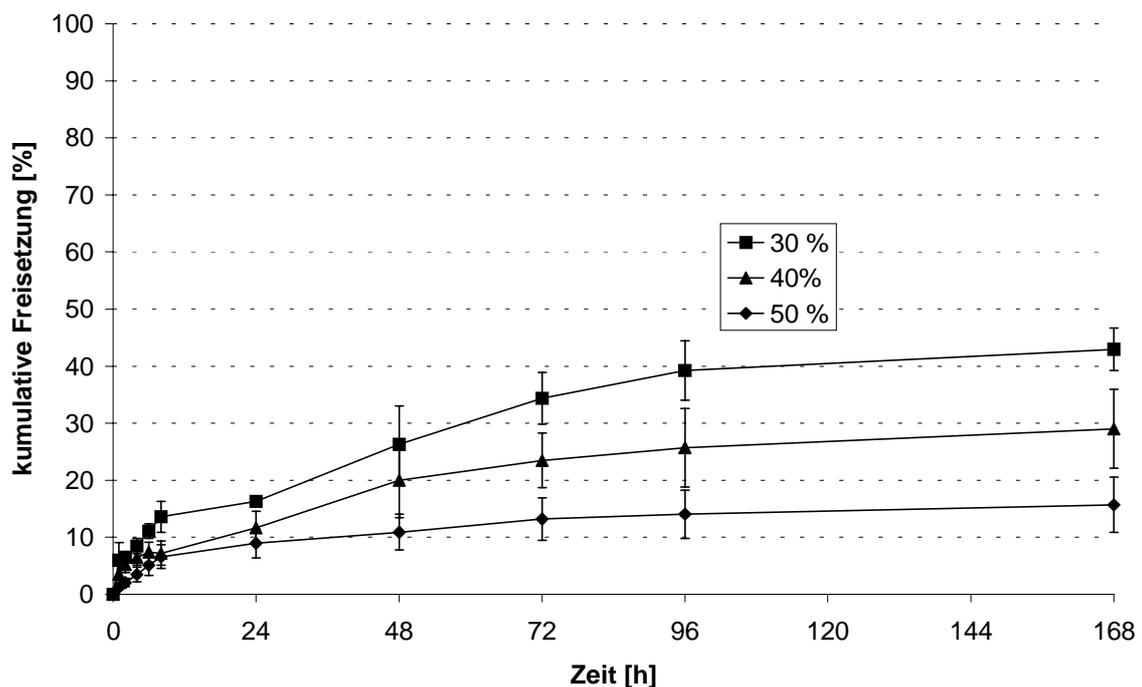


Abbildung 44: Freisetzung von Cytochrom C aus in situ geformten Implantaten mit dem modulierten Polylactid JP 170 vom Typ A3

Somit zeigte sich, dass auch bei JP 170 mit steigender Konzentration des modulierten Polylactids in der Formulierung die Freisetzung von Cytochrom C verlangsamt wird und der "Initial burst" Effekt absinkt. Durch die gleichmäßige Freigabe über einen langen Zeitraum eignen sich diese Formulierungen als Depotarzneiformen.

2.6.3.3 Einfluß des Polymertyps auf die Freisetzung

Um den Einfluß des Typs der modulierten Poly lactide betrachten zu können, wurden solche mit gleicher Kettenlänge verglichen, wobei im Falle von Typ B Poly lactiden durch die Veresterung an zwei Hydroxylgruppen des Startermoleküls eine annähernd doppelt so große Molmasse und im Falle von Typ C Poly lactiden durch die Veresterung an drei Hydroxylgruppen des Startermoleküls eine annähernd dreifach so große Molmasse resultiert. Der Vergleich wurde anhand von modulierten Poly lactiden mit 20 und 40 WE/OH geführt.

Die Freisetzung von Cytochrom C aus in situ geformten Implantaten mit verschiedenen Typen modulierter Poly lactide mit jeweils 20 WE/OH beträgt zwischen 4,22 % für 50 % JP 25 nach 120 Stunden und 68,70 % für 20 % JP 97 nach 48 Stunden (Abbildung 45).

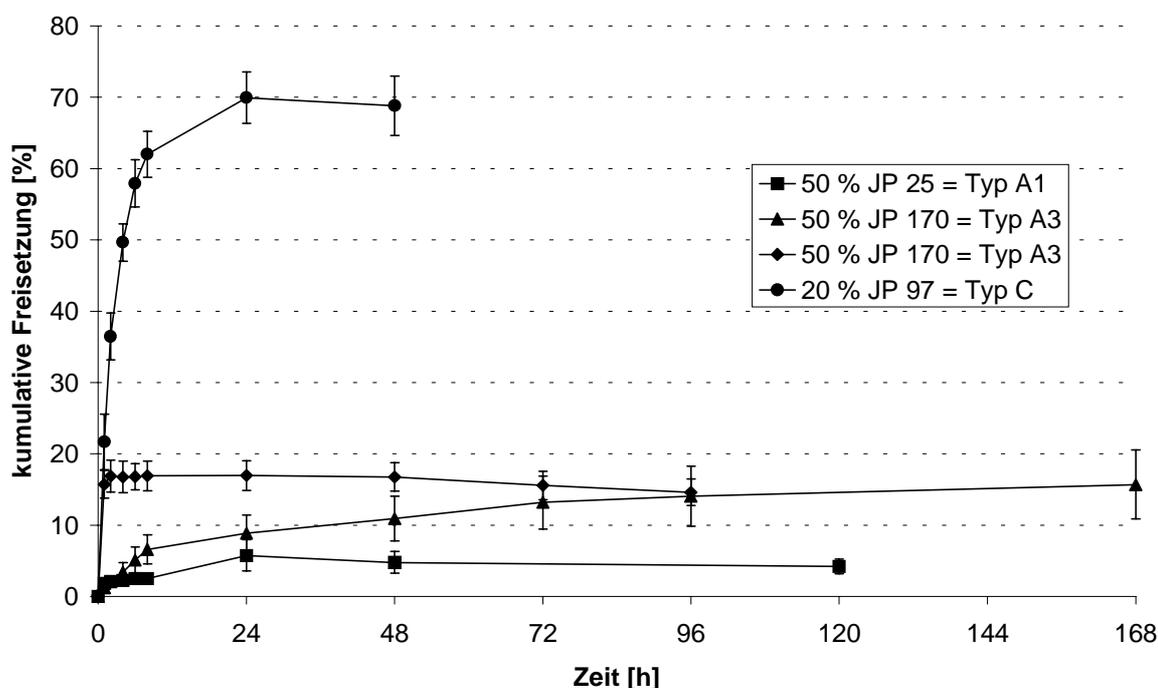


Abbildung 45: Freisetzung von Cytochrom C aus in situ geformten Implantaten mit 20 WE/OH

Der "Initial burst" Effekt beträgt bei den Implantaten mit Typ A Poly lactiden weniger als 10 %, beim Typ B Poly lactid weniger als 20 %, jedoch beim Poly lactid vom Typ C mehr als 60 %. Die Versuche mit dieser Formulierung wurden nach 48 Stunden abgebrochen. Zu berücksichtigen ist bei der Probe JP 97 jedoch, dass sich das modulierte Poly lactid in PEG 400 nur in einer maximalen Konzentration von 20 % spritzen ließ, während bei den anderen Poly lactiden jeweils 50 % in Lösung gebracht

wurden. Da die Konzentration entscheidend die Freisetzung beeinflusst, ist dieses Phänomen nicht eindeutig dem Typ des Polylactids zuweisbar. Wie bereits unter 2.6.3.2 erwähnt, ist das modulierte Polylactid ein geeigneter Kandidat für ein Depot, dass jedoch weiterführend auf seine Eignung untersucht werden muss.

Die Freisetzung von Cytochrom C aus in situ geformten Implantaten mit verschiedenen Typen modulierter Polylactide mit jeweils 40 WE/OH beträgt zwischen 11,22 % für 25 % JP 37 nach 168 Stunden und 20,25 % für 50 % JP 66 nach 96 Stunden (Abbildung 46).

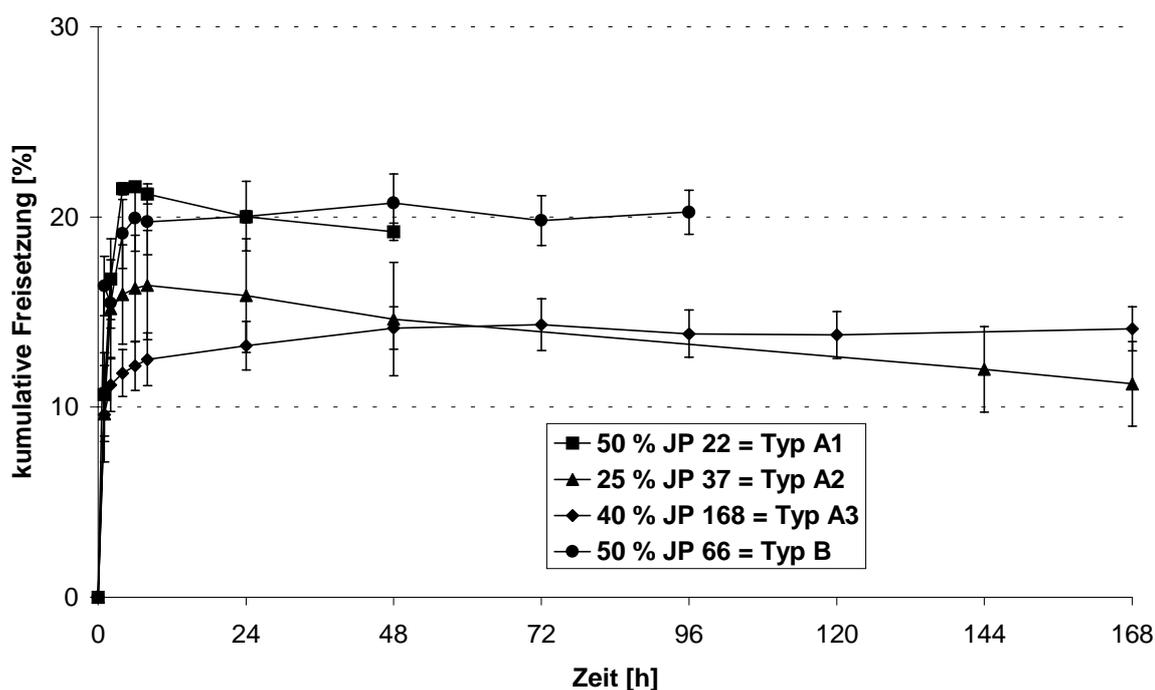


Abbildung 46: Freisetzung von Cytochrom C aus in situ geformten Implantaten mit 40 WE/OH

Bei allen hier untersuchten Implantaten kommt es nach einem moderaten "Initial burst" Effekt von bis zu 20 % zu keiner Freisetzung mehr bzw. zur Readsorption. Aufgrund der hohen Standardabweichung in diesem Bereich ist eine eindeutige Aussage jedoch nicht möglich. Keine dieser Formulierungen erfüllt die Zielkriterien.

2.6.4 Diskussion

Von jedem Typ der modulierten Poly lactide lassen sich ausgewählte Vertreter, die unter 2.3 hinsichtlich ihrer galenischen Formulierbarkeit bewertet und klassifiziert wurden, in PEG 400 als Lösungsmittel lösen. Cytochrom C kann in diese Lösung suspendiert werden, so dass diese Suspension in das ausgewählte Freisetzungsmedium applizierbar sind. Das dabei jeweils entstehende Implantat setzt den Wirkstoff Cytochrom C auf sehr unterschiedliche Weise frei.

Bei allen Formulierungen ist ein "Initial burst" Effekt in den ersten 4 Stunden zu beobachten, der jedoch sehr unterschiedlich stark ausgeprägt ist. Er schwankt zwischen weniger als 10 und deutlich mehr als 60 %. Dies verdeutlicht, dass es in situ geformte Implantate gibt, die keine Inkorporation des Proteins zum Zeitpunkt der Implantatbildung bewirken, d.h. das Protein haftet an der Oberfläche oder wird sehr schnell durch das eindringende Freisetzungsmedium ausgeschwemmt. Diese Formulierungen sind an sich schon für eine Depotarzneiform ungeeignet, da die verbliebene Menge Cytochrom C nicht ausreicht, um eine Freisetzung über Tage und Wochen zu gewährleisten. Außerdem würde bei einer Applikation *in vivo* eine zu hohe unerwünschte Plasmakonzentration kurz nach der Injektion auftreten.

In der sich anschließenden zweiten Phase, der diffusionskontrollierten Freisetzung, zeigt sich ebenfalls ein sehr differenziertes Bild. Es wurden Formulierungen gefunden, bei denen die Freisetzung abbricht bzw. die kumulative Freisetzung wieder abnimmt. Durch den partiellen Austausch des Freisetzungsmediums können diese Effekte erst erfaßt werden. Die Erklärung dieser Phänomene, die bereits unter 2.4 andiskutiert wurden, sind Adsorptions- und Readsorptionseffekte von Cytochrom C an die modulierten Poly lactide in der Form, dass polarisierte Wechselwirkungen auftreten, die einer freien Verfügbarkeit des Proteins im Freisetzungsmedium entgegenwirken. Diese unerwünschten Effekte führen zu einer diskontinuierlichen Freigabe und nicht zu einem den Zielkriterien entsprechendem Freigabeprofil. Modulierte Poly lactide, die jedoch eine kontinuierliche Freisetzung nach dem "Initial burst" Effekt aufweisen, sind JP 66 - 68, JP 170, JP 155 und JP 3.

Wann der Übergang von der zweiten zur dritten Phase, die durch den Polymerabbau gesteuert wird, erfolgt, ist in jedem Falle schwer festzustellen, da sich beide Prozesse stark überschneiden.

Wie sich an ausgewählten modulierten Poly lactiden (JP 170, JP 67) zeigte, verlangsamt sich die Freisetzung mit zunehmendem Gehalt an moduliertem

Polylactid in der Formulierung. Dieses Phänomen lässt sich wie folgt erklären: Da das PEG 400 während und nach Ausbilden des Implantats aus dem Depot ausgeschwemmt wird und sich mit dem umgebenden Freisetzungsmittel vermischt, unterstützt es als hydrophiles Lösungsmittel ebenfalls das schnelle Herauslösen von Cytochrom C. Somit steigt der "Initial burst" Effekt mit höherer PEG 400 Konzentration in der Formulierung. Dazu kommt, dass das PEG 400, indem es sich löst, Poren bilden kann, die die schnellere Freisetzung des Proteins befördern. Somit lässt sich die Freisetzung mit steigender Polylactid-Konzentration verzögern, sofern eine Löslichkeit des Polylactids in PEG 400 gegeben ist. Die Variation des Verhältnisses von festem Polylactid und Lösungsmittel bietet somit eine geeignete Steuerungsmöglichkeit für die Freisetzung.

Der Einfluß der Molmasse auf die Freisetzung unterscheidet sich stark innerhalb der verschiedenen Polymertypen. Während bei den Typ A1 und B Polylactiden die Freisetzung mit steigender Molmasse zunimmt, tritt bei den Typ A3 und C Polylactiden der umgekehrte Effekt auf. Bei den Typ A2 Polylactiden und den Polylactid-co-glycoliden vom Typ C ist keine Korrelation zwischen Molmasse und Freisetzung zu finden. Die Erklärung dafür liegt in der sinkenden Lösbarkeit und Spritzbarkeit mit zunehmender Molmasse, so dass höhermolekulare Polylactide in geringeren Konzentrationen getestet wurden als die entsprechenden niedermolekularen Vertreter des jeweiligen Typs.

Aus diesem Grunde ist auch ein Vergleich der Typen untereinander schwer zu ziehen. In entscheidendem Maße hängt die Steuerung der Freisetzung davon ab, wieviel moduliertes Polylactid sich in PEG 400 lösen und applizieren lässt. Bevorzugt sind dabei die einzelne Polylactide vom Typ A3, B und mit Einschränkungen auch C, die bereits erwähnt wurden. Je mehr Lösungsmittel in der Formulierung vorliegt, um so mehr hydrophiler Wirkstoff kann in den ersten Stunden herausgelöst werden [121, 120, 123, 200]. Das Lösungsmittel und der Zusatz von oberflächenaktiven Stoffen zur Verhinderung der Readsorption sind wesentliche Steuerungsparameter, um zu einer optimalen Formulierung für die jeweilige pharmakologische Anforderung zu gelangen.

2.7 Vergleich der Freisetzungen aus gepreßten und in situ geformten Implantaten und Diskussion der physiko-chemischen Parameter

Um diese beiden Arzneiformen miteinander vergleichen zu können, muß man zuerst die unterschiedlichen Herstellungsverfahren betrachten. Während die gepreßten Implantate durch Granulierung der modulierten Polylactide mit Mannitol und der Cytochrom C haltigen Lösung und anschließenden Verpressung hergestellt werden, liegt bei den in situ geformten Implantaten bis zur Injizierung in das Freisetzungsmedium eine Suspension des Wirkstoffs in einer Lösung vor, die zuvor durch Lösen des Polylactids in PEG 400 hergestellt wurde. Nach Kontakt mit dem Freisetzungsmedium liegt ein Koagulat vor, das durch das Verschieben des Lösungsgleichgewichts in der Formulierung, verbunden mit dem Ausschwemmen des hydrophilen PEG 400 in das Freisetzungsmedium, resultiert. Demzufolge findet bei den gepreßten Implantaten keine Verkapselung von Cytochrom C während der Herstellung statt, und die Freisetzung erfolgt ausschließlich diffusionskontrolliert. Dies zeigen auch die Freisetzungskurven. Je mehr das Depot an Wirkstoff verarmt, um so geringer wird die Freisetzung. Die Freisetzung folgt also dem Fickschen Diffusionsgesetz.

Durch die unterschiedlichen physiko-chemischen Eigenschaften der modulierten Polylactide sind die kumulativen Freisetzungsraten pro Zeiteinheit sehr unterschiedlich. Sie reichen von annähernd 100 % nach 6 Stunden bis zu knapp über 30 % nach 48 Stunden. Somit gibt es durchaus gepreßte Implantate, die den von uns gestellten Zielkriterien entsprechen (JP 69, JP 53), sie sind aber in ihrer Anzahl sehr begrenzt. Anders verhält sich dies bei den in situ geformten Implantaten. Es konnte eine Reihe von Formulierungen gefunden werden, die entsprechend der Zielkriterien Cytochrom C freisetzen. Dazu zählen z.B. die modulierten Polylactide JP 66 - 68, JP 170, JP 155 und JP 3. Des weiteren besteht die Möglichkeit, durch verschiedene Faktoren, die im Rahmen der Arbeit untersucht wurden, gezielt Einfluß auf die Freisetzung zu nehmen. Diese sind u.a. die Variation der Konzentration von Polylactid und PEG 400 oder der Typ des Polylactids und die Molmasse resp. Kettenlänge des Polylactids. Speziell bei den Polylactiden mit neuartigem Syntheseansatz, nämlich bei denen mit der Veresterung an mehreren Hydroxylgruppen eines multifunktionalen Moleküls, konnten vielversprechende Resultate erzielt werden.

Schlußfolgernd kann man feststellen, dass für diesen neuartigen Ansatz zur Herstellung dieser Art von sowohl nieder- als auch höhermolekularen Polylactiden

sich die patentierte Herstellungsmethode der In-situ-Implantatbildung besser eignet als die zur Herstellung von gepreßten Implantaten in Form von Ringtabletten. Darüber hinaus ist eine *in vivo* Applikation der ersteren nach erfolgter Sterilisation ohne weitere Optimierung möglich.

Ziel der Untersuchungen sollte es auch sein, den Einfluß der physiko-chemischen Parameter auf die Freisetzung zu betrachten.

Bei den gepreßten Implantaten mit günstigen Freisetzungseigenschaften fällt auf, dass das thermodynamische Verhalten und die morphologischen Eigenschaften der modulierten Polylactide JP 53 und JP 69 ähnlich sind, obwohl sie sich in ihren Molmassen stark unterscheiden. Beide kristallinen Proben haben ihren Schmelzpunkt (physikalische Umwandlung erster Ordnung) bei 140 - 150 °C und eine Glasübergangstemperatur (physikalische Umwandlung zweiter Ordnung) von knapp unter 50 °C (47,8 bzw. 49,0 °C), und ihre kristallinen Anteile liegen im mittleren Bereich von 41,9 % (JP 69) und 58,6 % (JP 53). Es ist daher wahrscheinlich, dass der beim Verpressen einwirkende Druck zu einem Schmelzfluß in Folge der eintretenden kurzzeitigen Temperaturerhöhung bei beiden modulierten Polylactiden in gleicher Weise und mit gleichem Ausmaß führt. Auch bei 37 °C im Freisetzungsmedium ist eine annähernd identische Morphologie in den gepreßten Implantaten anzunehmen, die zu diesen verzögerten Freisetzungen führt. Modulierte Polylactide mit höheren Schmelzpunkten und Glasübergangstemperaturen sowie sehr hohen kristallinen Anteilen im Polymer konnten ein Freigabeprofil entsprechend der Zielkriterien nicht erreichen.

Im Falle der in situ geformten Implantate kann man feststellen, dass es sich bei allen modulierten Polylactiden mit verzögerter Freisetzung um amorphe Proben handelt. Dies liegt auch darin begründet, dass sich diese leichter in Lösung bringen lassen aufgrund der geringeren Aktivierungsenergie gegenüber den kristallinen Proben, bei denen zusätzlich das Kristallgitter zerstört werden muß, bevor die Solubilisation stattfinden kann. Es zeigt sich, dass das modulierte Polylactid JP 155 eine Ausnahme unter den bevorzugten Proben bildet. Es ist als einziges ein Poly-D,L-lactid-co-glycolid und weist darüber hinaus gegenüber den anderen modulierten Polylactiden eine wesentlich höhere Molmasse auf.

Leider liegen nicht zu allen modulierten Polylactiden DSC-Daten vor, so dass nur für die Proben JP 66 bis JP 68 konstatiert werden kann, dass diese Glasübergangstemperaturen im Bereich von ca. 20 bis 40 °C aufweisen und in

linearer Abhängigkeit zu den Werten der kumulativen Freisetzung (13,48 - 20,53 %) nach 48 Stunden stehen (Abbildung 47).

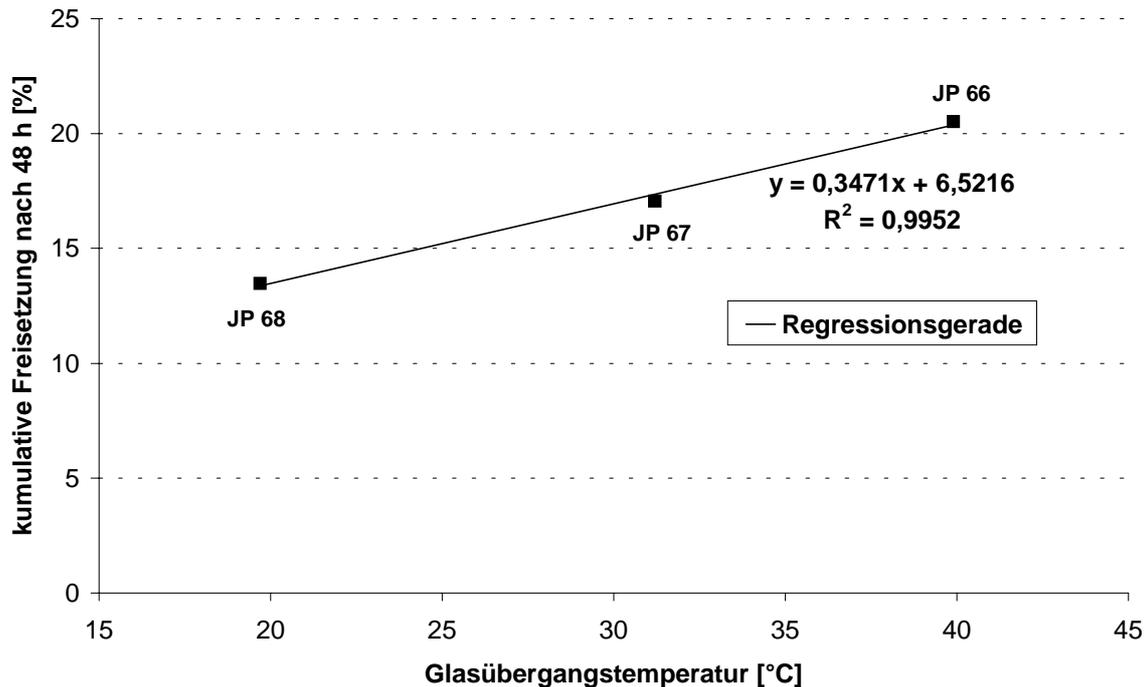


Abbildung 47: Glasübergangstemperaturen und kumulative Freisetzung nach 48 Stunden der modulierten Polylactide JP 66, JP 67 und JP 68

Nach der Präzipitation im FreisetzungsmEDIUM bei 37 °C kann es demzufolge zu glasartigen Zuständen im Depot kommen, die eine diffusionskontrollierte Freisetzung mit geringem "Initial burst" Effekt begünstigen. Es liegt also nahe, dass die Glasübergangstemperatur ein entscheidendes physikalisches Kriterium für die Steuerung der Freigabe darstellt. Betrachtet man die Vorgänge während des Glasübergangs in Richtung der Energiezufuhr, findet ein Prozeß vom ungeordneten Festkörper zur ungeordneten Flüssigkeit statt. Nach der Theorie des freien Volumens (Cohen & Turnbull 1959) [201] wird davon ausgegangen, dass das temperaturabhängige freie Volumen zwischen den Molekülen am Glasübergang den Wert des kritischen freien Volumens überschreitet und somit die Rate der Molekülumlagerungen stark ansteigt. Diese bewirken dann die höhere Kettenbeweglichkeit des Polymers. Diese Vorgänge, speziell die Blockade des kritischen freien Volumens durch die Molekülumlagerungen, verhindern in diesem Falle das schnelle Eindringen von Wasser in das Depot und damit das Ausschwemmen des Proteins. Diese Diffusionsbarrieren sind bei den kommerziell verfügbaren Polylactiden der Fa. Boehringer Ingelheim, deren Glasübergänge bei mehr als 45 °C liegen, nicht zu beobachten, da die erhöhte Kettenbeweglichkeit bei 37 °C noch nicht eingesetzt hat.

Diese geringeren Glasübergangstemperaturen führen sicherlich auch dazu, dass sich diese modulierten Polylactide im Lösungsmittel in höheren Konzentrationen als andere Proben lösen lassen. Da die Konzentrationserhöhung sich verzögernd auf die Freisetzung auswirkt (siehe 2.6.3.2), wurden solche modulierten Polylactide als bevorzugt für in situ geformte Implantate gefunden.

2.8 Bioabbau ausgewählter modulierter Polylactide

2.8.1 Gewichtsverlust ausgewählter modulierter Polylactide

Es wurde untersucht, in welchem Maße sich modulierte Polylactide hinsichtlich der Abbaugeschwindigkeit unterscheiden. Zu diesem Zweck wurde der Gewichtsverlust eines Poly-L-lactids und eines Poly-D,L-lactids vom Typ C verglichen (Abbildung 48). Er beträgt zwischen 58,2 % für JP 101 und 90,4 % für JP 5 nach 12 Wochen.

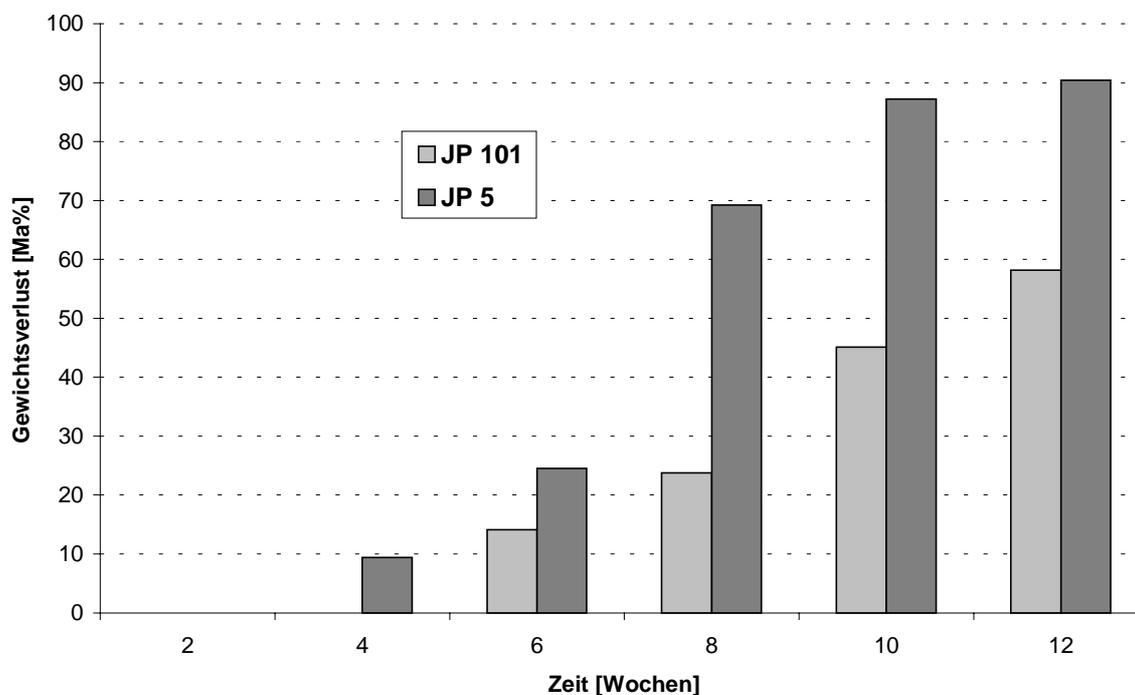


Abbildung 48: Gewichtsverlust von JP 101 und JP 5 während des hydrolytischen Abbaus im SBF

Das kristalline Poly-L-lactid JP 101 baut sich wesentlich langsamer ab als das amorphe Poly-D,L-lactid JP 5, obwohl JP 5 eine höhere Molmasse besitzt.

Aus der Literatur ist bekannt, dass der Abbau von Poly-L-lactiden langsamer erfolgt als der von Poly-D,L-lactiden. Während sich erstere über einen Zeitraum von Wochen und Monaten abbauen, erfolgt der Abbau der Poly-D,L-lactide schneller

innerhalb von wenigen Wochen. Das wird anhand des Gewichtsverlusts von mehr als 90 % nach 10 Wochen deutlich.

Es wurde weiterhin der Gewichtsverlust von Poly-D,L-lactiden unterschiedlichen Typs mit vergleichbarer Molmasse untersucht. (Abbildung 49). Er lag zwischen 63 % für JP 37 und 98 % für JP 67 nach 10 Wochen.

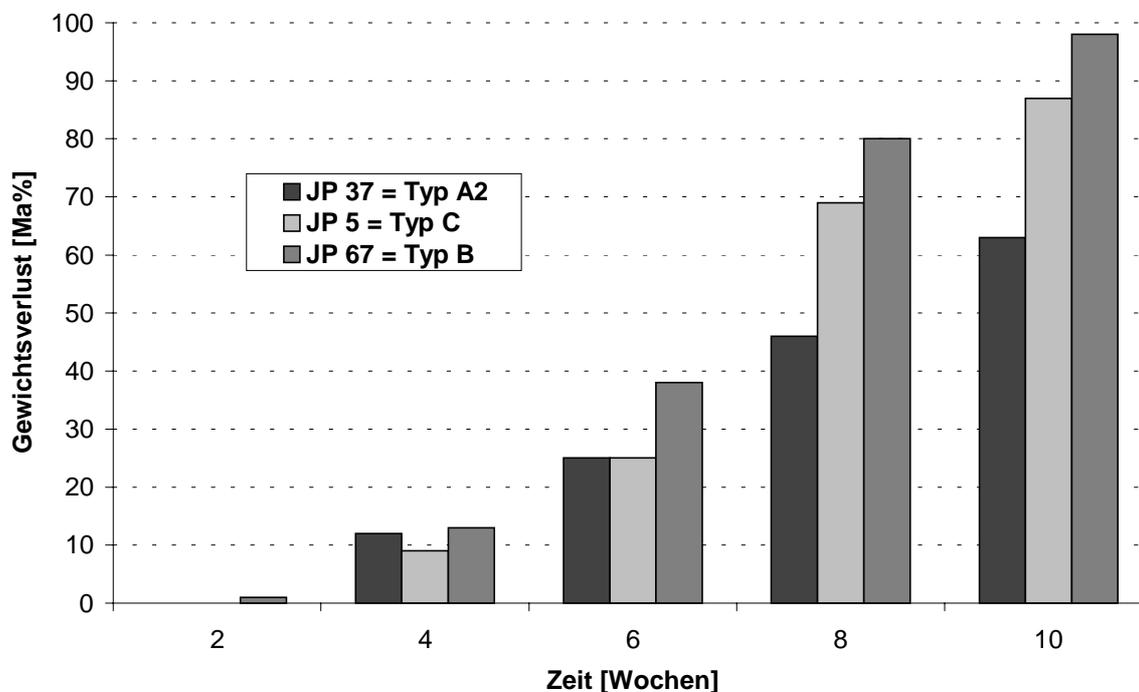


Abbildung 49: Gewichtsverlust von modulierten Polylactiden unterschiedlichen Typs im SBF

Das modulierte Polylactide vom Typ A2 mit linearer Grundstruktur baut sich wesentlich langsamer ab als die modulierten Polylactide vom Typ B und C. Das hydrophobe Startermolekül Cholesterol (Typ A2) verhindert vermutlich die Aufnahme von Wasser in das Polymer und verzögert damit den hydrolytischen Abbau. Zum anderen ist das Wasser bei den modulierten Polylactiden vom Typ B und C in der Lage, an zwei bzw. drei Ketten des Moleküls Esterbindungen zu spalten und demnach den Abbau zu beschleunigen.

Es wurde bereits nachgewiesen, dass sich der Abbau durch Modifizierung der Struktur der Polylactide steuern lässt. Migliaresi et al. [45] verglichen Poly-L-lactide und Poly-D,L-lactide und fanden, dass sich kristalline Poly-L-lactide wesentlich langsamer abbauen als die Racemate. Mauduit et al. [149] als auch Park [136] wiesen anhand von Polylactiden unterschiedlicher Molmasse nach, dass die Wasseraufnahme und der Gewichtsverlust entscheidend von den Konzentrationsverhältnissen zwischen niedermolekularem und höhermolekularem Polylactid

abhängen. Fällt die Glasübergangstemperatur durch die Wasseraufnahme und die folgende Esterspaltung unter die Inkubationstemperatur, beschleunigt sich der Abbau. Auch Strukturänderungen durch Mischungen mit anderen Polymeren vermindern den Abbau [90]. Die Wasseraufnahme ist also ein wichtiger Faktor für den Abbau und wurde im folgenden eingehender untersucht.

2.8.2 Wasseraufnahme ausgewählter modulierter Polylactide

Bei den in Abbildung 50 untersuchten Proben handelt es sich um ein Poly-L-lactid (JP 53) und ein Poly-D,L-lactid (JP 37) identischer Molmasse vom Typ A2. Die Wasseraufnahme lag zwischen 17 % für JP 53 und 226 % für JP 37 nach 10 Wochen.

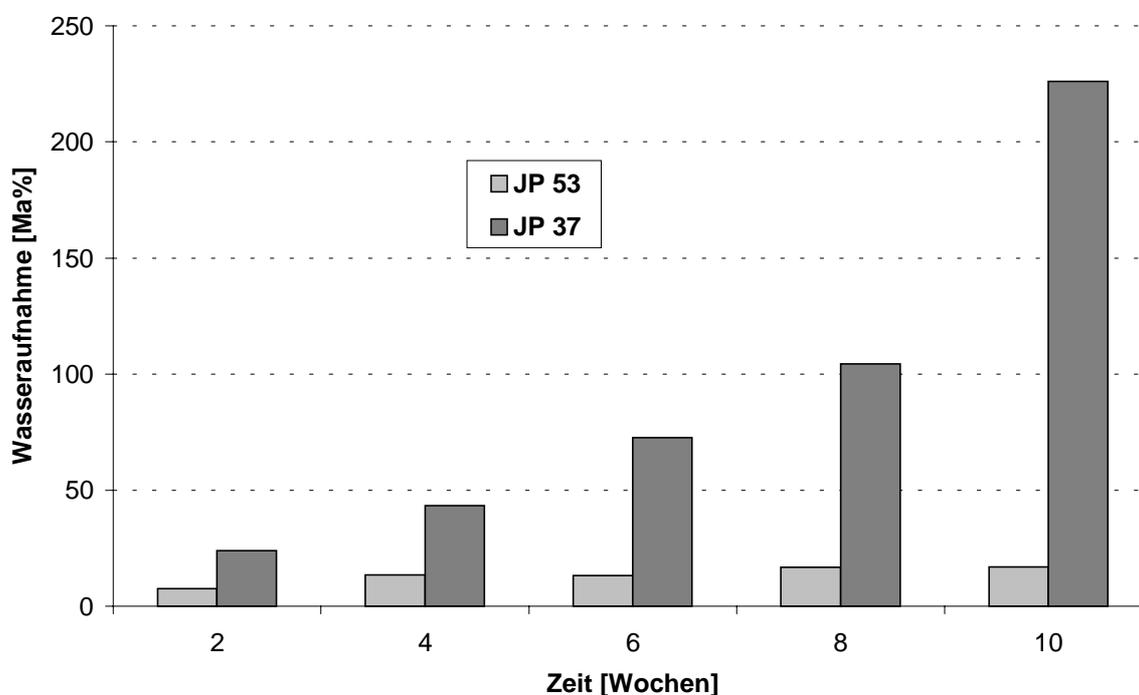


Abbildung 50: Wasseraufnahme von JP 53 und JP 37 vom Typ A2 im SBF

Der hohe kristalline Anteil des Poly-L-lactids führt dazu, dass das Eindringen von Wasser in das Kristallgitter und damit der hydrolytische Angriff erschwert ist und der Abbau verzögert wird. Der in den Abbildungen gezeigte Verlauf des hydrolytischen Abbaus der modulierten Polylactide bestätigt diese Aussagen. Li et al. [132, 137] zeigten bereits, dass die Wasseraufnahme bei Poly-D,L-lactiden sofort einsetzt, dagegen bei Poly-L-lactiden erst nach einigen Wochen, abhängig vom kristallinen Anteil im Polymer. Ebenso verhält es sich mit dem Gewichtsverlust. Daher wurden beide Phänomene miteinander verglichen.

2.8.3 Vergleich von Gewichtsverlust und Wasseraufnahme modulierter Poly lactide

Gewichtsverlust und Wasseraufnahme sind zwei Prozesse, die parallel zueinander beim Bioabbau von Polymeren ablaufen. In Abbildung 51 sind beide anhand zweier modulierter Poly lactide vom Typ A2 mit unterschiedlicher Molmasse gegenübergestellt. Der Gewichtsverlust lag zwischen 1,5 % für JP 38 und 25,2 % für JP 37, das Wasseraufnahme zwischen 19,8 % für JP 38 und 72,6 % für JP 37 nach 6 Wochen.

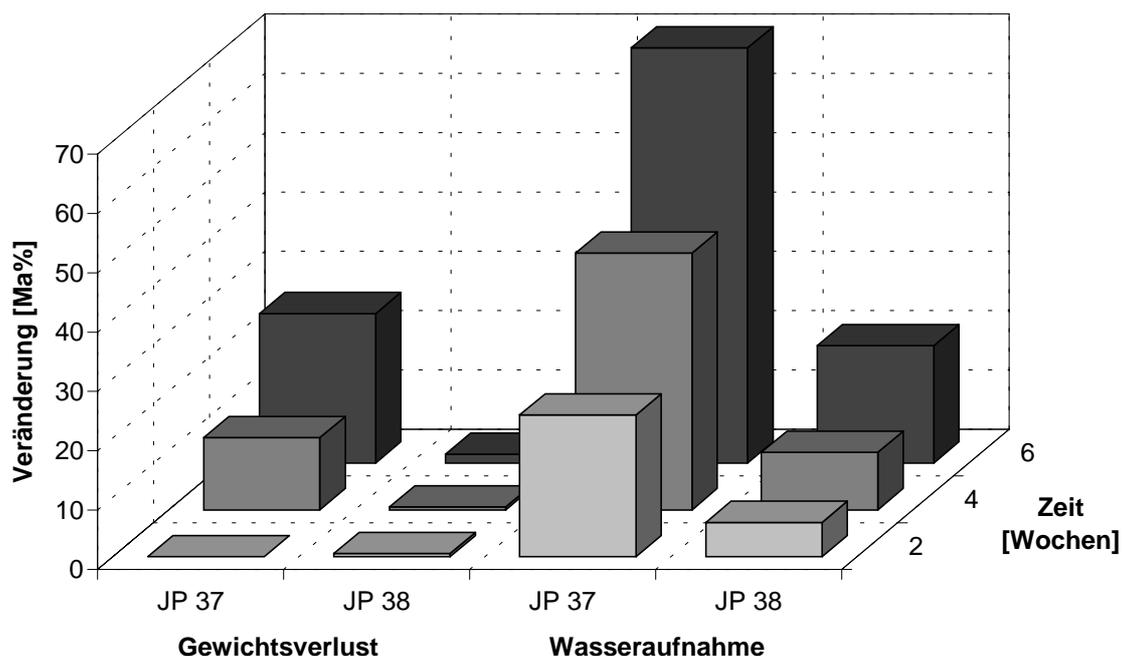


Abbildung 51: Gewichtsverlust und Wasseraufnahme von zwei modulierten Poly lactiden vom Typ A2 im SBF

Da die Molmasse von JP 37 nur die Hälfte der von JP 38 beträgt, wird dieses Polymer erwartungsgemäß schneller abgebaut. Dabei verhalten sich Wasseraufnahme und Gewichtsverlust proportional zueinander. Je höher und schneller die Wasseraufnahme erfolgt, desto größer ist der Gewichtsverlust im gleichen Untersuchungszeitraum. Es entstehen unter der hydrolytischen Esterspaltung also wasserlösliche Oligomere, die durch das SBF ausgeschwemmt werden. Bereits Asano et al. [57] zeigten, dass sich Poly lactide mit geringerer Molmasse schneller abbauen als höhermolekulare. Entscheidend ist dabei die Verzögerung, bis der Gewichtsverlust einsetzt. Diese kann sich über Wochen, sogar bis zu Monaten erstrecken. Am untersuchten Beispiel ist ersichtlich, dass der Bioabbau bei JP 38 noch nicht eingesetzt hat, bei JP 37 aber schon ca. ein Viertel der Masse bereits abgebaut ist.

2.9 Gesamtdiskussion

Mit den im Rahmen dieser Arbeit verwendeten und untersuchten bioabbaubaren Polymeren vom Typ Polylactid bzw. Polylactid-co-glycolid ist es gelungen, gepreßte und in situ geformte Implantate herzustellen, die sich potentiell als parenterale Depotarzneiformen eignen. Durch die definierten Zielkriterien einer kontrollierten Freisetzung über bis zu 30 Tage wurde geprüft, welche Polymere sich besonders als Agens in diesen Formulierungen eignen.

Durch FT-RAMAN-Spektroskopie wurde die Struktur der Polymere aufgeklärt. Bei den Untersuchungen der physiko-chemischen Eigenschaften wurde festgestellt, dass die Poly-L-lactide abhängig von ihrer Molmasse unterschiedlich hohe kristalline Anteile im Polymer besitzen, während die Poly-D,L-lactide und Poly-D,L-lactid-co-glycolide ausschließlich amorph vorliegen. Die Molmasse beeinflusst ebenfalls das thermische Verhalten, das mittels DSC-Messungen untersucht wurde, aber auch der jeweilige Polymertyp.

Zur Untersuchung der In-vitro-Freisetzung wurde eine Modellapparatur entwickelt, die in der Lage war, die untersuchten Polylactide in den Implantaten hinsichtlich ihrer Eignung zu differenzieren.

Wie vermutet waren die kommerziell verfügbaren Polymere der Fa. Boehringer Ingelheim nur sehr eingeschränkt in der Lage, diesen Anforderungen zu genügen. Die aus diesem Grund gezielt für die Verwendung in in situ geformten und gepreßten Implantaten entwickelten und synthetisierten modulierten Polylactide, die sich in verschiedenen Grundtypen darstellen, eignen sich in wesentlich besserem Maße für die Erfüllung der Kriterien. Insbesondere Polylactide vom Typ A3 (JP 170), Typ B (JP 66, JP 67, JP 68) und Typ C (JP 155, JP 3) erfüllten die Zielkriterien in den in situ geformten Implantaten, bei den gepreßten Implantaten waren dies JP 53 (Typ A2) und JP 69 (Typ B). Kritisch ist anzumerken, dass die Freisetzung aus den gepreßten Implantaten insgesamt schneller erfolgte und weniger geeignete Polylactide gefunden wurden. Jedoch wurde bei den in situ geformten Implantaten Readsorptionseffekte festgestellt, die einer kontrollierten Freigabe des Proteins entgegenwirken und wahrscheinlich auf die Anwesenheit von PEG 400 bzw. bestimmter modulierter Polylactide in der Formulierung als immobilisierendes Agens zurückzuführen sind.

Es zeigte sich, dass für die in situ geformten Implantate besonders das thermische Verhalten wie Schmelzpunkt und Glasübergang von Bedeutung sind, aber auch die Molmasse des jeweiligen Polylactids. Des Weiteren wurde das Konzentrations-

verhältnis von Polymer zu Lösungsmittel PEG 400 als stark steuernder Faktor gefunden.

Für die modulierten Polylactide in gepreßten Implantaten waren neben Glasübergangstemperatur und Molmasse besonders die kristallinen Anteile im Polymer von entscheidendem Einfluß auf die kontrollierte Freisetzung von Cytochrom C.

Die Untersuchungen zum Abbau der Polylactide bestätigten die bekannte Abhängigkeit von Wasseraufnahme und Gewichtsverlust. Poly-D,L-lactide bauen sich durch erhöhte Wasseraufnahme schneller ab als die kristallinen Poly-L-lactide, bei der diese durch die Kristallstruktur verzögert eintritt.

3 Experimenteller Teil

3.1 Substanzen

3.1.1 Bioabbaubare Oligomere bzw. Polymere

3.1.1.1 Bioabbaubare Polymere der Firma Boehringer Ingelheim

Tabelle 18: Bioabbaubare Polymere der Firma Boehringer Ingelheim und ausgewählte physiko-chemische Eigenschaften

Substanz	Monomer	Lactid-/ Glycolid-Verhältnis	Aggregatzustand	Molmasse (theor.)
RG 503 H	DLL/GL	50/50	fest	28.000
RG 503	DLL/GL	50/50	fest	48.000
RG 752	DLL/GL	75/25	fest	ca. 17.300
L 104	LL	-	fest	1.500 – 2.250
R 202 H	DLL	-	fest	unbekannt

3.1.1.2 Modulierte bioabbaubare Polymere

3.1.1.2.1 Oligo- bzw. Polylactide durch Ringöffnungspolymerisation von Lactonen mit einwertigen Alkoholen als Starter

Für die Herstellung kettenförmig strukturierter Oligo- und Polylactide wurden als Starter für die Ringöffnungspolymerisation der Lactonmonomere die einwertigen Alkohole L-(-)-Milchsäureethylester, 1-Octadecanol und Cholesterol eingesetzt. Ausgehend von L- bzw. D,L-Lactid wurden die entsprechenden Homo- und Copolymere synthetisiert (Abbildung 52). Im letzteren Fall kamen neben den genannten Monomeren auch Glycolid zum Einsatz.

Die Umsetzung erfolgte bei 110 - 140 °C in Gegenwart von Zinn(II)-ethylhexanoat (Zinnoctanoat) als Katalysator und einer Reaktionszeit von 2 - 12 h. Nach Beendigung der Polymerisation wurden die Reaktionsprodukte in Dichlormethan gelöst und durch Umfällung in Hexan bzw. Heptan gereinigt. Anschließend wurden die Produkte bis zur Gewichtskonstanz im Vakuum getrocknet. Eine Aufstellung der synthetisierten Polylactide ist in 2.1 enthalten.

3.1.1.2.2 Oligo- bzw. Polylactide durch Ringöffnungspolymerisation von Lactonen mit Diolen als Starter

Es wurden mit Propan-1,2-diol ein Diol als Starter für die Ringöffnungspolymerisation eingesetzt. Als Lactone wurden L- und D,L-Lactid eingesetzt (Abbildung 53).

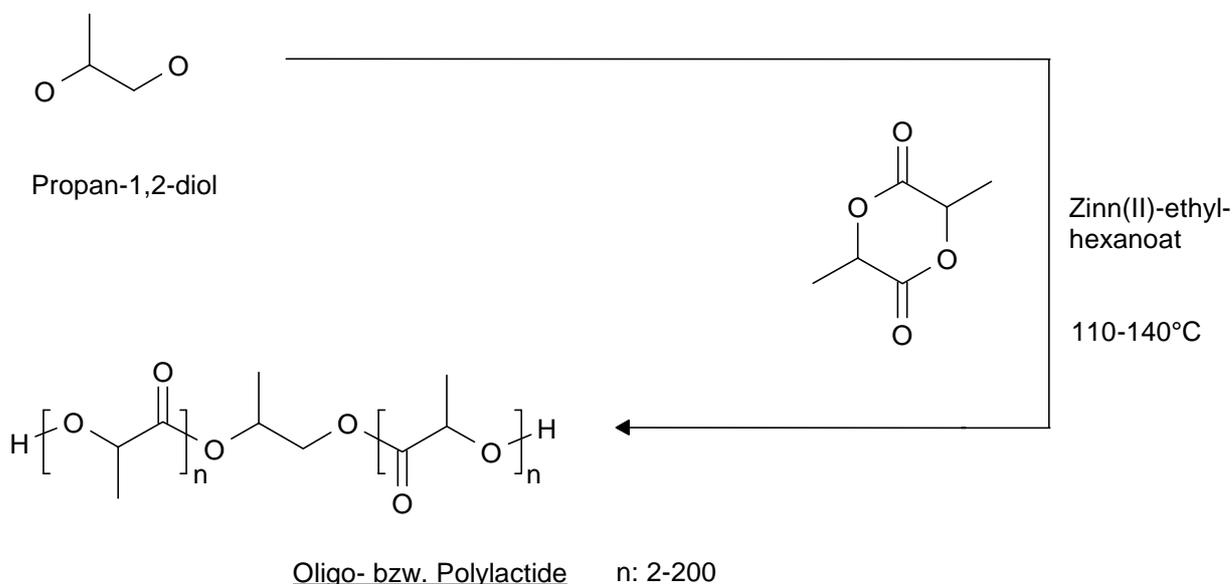


Abbildung 53: Synthese von Oligo- bzw. Polylactiden mit Propan-1,2-diol als Starter für die Ringöffnungspolymerisation

Die Polymerisation zu den entsprechenden Homopolymeren wurde in Gegenwart von Zinn(II)-ethylhexanoat durchgeführt. Auch die Reinigung der Produkte sowie deren analytische Charakterisierung erfolgte in der unter 3.1.1.2.1 angegebenen Weise. Eine Übersicht zu den synthetisierten Derivaten enthält 2.1.

3.1.1.2.3 Oligo- bzw. Polylactide durch Ringöffnungspolymerisation von Lactonen mit einem Triol als Starter

Es wurde mit dem Einsatz eines Triols als Starter für die Ringöffnungspolymerisation die Möglichkeit untersucht, sternförmig verzweigte Oligo- und Polylactide zu synthetisieren. Als Triol wurde für diese Versuche 1,1,1-Tris(hydroxymethyl)-propan ausgewählt (Abbildung 54).

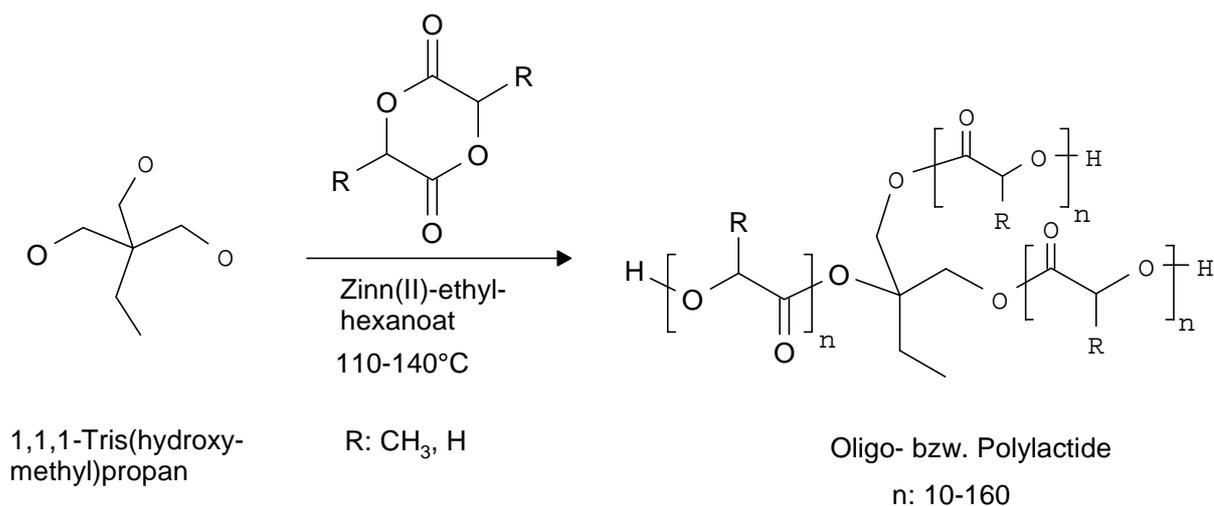


Abbildung 54: Synthese von Oligo- bzw. Polylactiden mit einem Triol als Starter für die Ringöffnungspolymerisation

Es wurden Homopolymere ausgehend von L- und D,L-Lactid und Copolymere aus L- bzw. D,L-Lactid und Glycolid hergestellt. Eine Übersicht zu den synthetisierten Oligo- und Polylactiden ist in 2.1 enthalten.

3.1.2 Sonstige Substanzen

Tabelle 19: Sonstige Substanzen, Hersteller, Qualität und Ch.-B.

Substanz	Hersteller	Qualität	Ch.-B.
Cytochrom C	Fluka Chemie AG	Firmenspez.	388167/1 54498
PEG 400	Merck-Schuchardt	Ph.Eur.	2034733
Mannitol	Merck	Ph.Eur.	422 M 778583
Natriumazid	Fluka Chemie AG	Ph.Eur.	360878/1 34596
Natriumchlorid	Merck	Ph.Eur.	Ktr.-Nr. 1437/95

3.2 Methoden

3.2.1 Molmassenbestimmung mittels Gelpermeationschromatografie

Die als theoretische Molmassen angegebenen Werte beziehen sich auf die unter Annahme eines 100 %-igen Umsatzes aus dem Einsatzmengenverhältnis Starter : Monomer errechneten Molmassen und dienen lediglich der Einordnung der experimentell bestimmten Molmassen.

Für die Messung der vorliegenden GPC-Untersuchungen wurde folgende Geräte und Methoden verwendet:

Geräte: GPC-Anlage (Fa. JASCO) mit

- HPLC-Pumpe PU-980
- Degaser DG-980-50
- UV- Detektor UV-975
- RI- Detektor RI-930
- Säulenofen
- GPC-Software PSS-WIN-GPC

Methode / Kalibrierung:

1. Säule:

- Typ: PSS SDV VS / 100 Å / 1000 Å bzw. SDV VS / 100 Å / 1000 Å / 10⁵ Å
- Dimension: 8 x 300 mm
- Partikelgröße: 5 µm
- Säulentemperatur: 25 °C

2. Eluent:

- Lösungsmittel: Chloroform
- Fluß: 1,0 ml/ min.

3. Kalibrierung:

- Injektionsvolumen: 100 µl
- RI- und UV-Detektor im Bereich von 162 g/mol bis 1.040.000 g/mol mit Polystyrol-Standards

3.2.2 FT-RAMAN-Spektroskopie

Die Aufnahme von Raman- Spektren erfolgte an einem FT-IR-Spektrometer IFS 66 der Firma Bruker mit dem Ramanmodul FRA 106. Als Strahlungsquelle diente ein Nd-YAG-Laser mit einer Wellenlänge von $\lambda = 1064$ nm und einer Leistung von 500 mW. Die Streustrahlung wurde in einem Winkel von 180° zur Probe detektiert. Die Substanzen wurden je nach Konsistenz direkt als Festkörper oder in einem Glasröhrchen untersucht. Die Zahl der akkumulierten Scans betrug 200.

Es wurde der Bereich von Wellenzahl 100 bis 3.500 analytisch erfaßt und ausgewertet. Die Strukturmerkmale der untersuchten Proben wurden entsprechend Schrader [180] nachgewiesen.

3.2.3 Röntgendiffraktometrie

Proben von den zu untersuchenden Polymeren mit einer Probenmasse von bis zu 5 mg wurden einer röntgendiffraktometrischen Untersuchung unterzogen.

Folgende Analysenparameter wurden verwendet:

Monochromator: Germanium (1)

Strahlung: 1.54060 Cu Kupfer

Generator: 40 kV, 30 mA

Detektor: Linear PSD, Moving

Scan Mode: Transmission

Bereich: $2\theta =$ Beginn 3,0; Ende 35,0; Schritt 0,5; 60,0 sec./ Schritt

Die Proben der untersuchten Substanzen wurden zwischen zwei Polyacetatfolien eingebracht und der Zusammenhalt durch Doppelklebeband gesichert.

Um den Kristallinitätsgrad ausgewählter modulierter Polylactide zu bestimmen, wurden Mischungen des Poly-L-lactids L 104 und des Poly-DL-lactid-co-glycolids RG 752 durch Verreiben entsprechender Mengen des jeweiligen Polymers im Mörser hergestellt.

Dies geschah unter der Annahme, dass L 104 als kristalliner Standard mit einer Kristallinität von 100 % verwendet wurde. Dies ist aber bei einem Polymer meist nicht der Fall. Die Probe RG 752 wurde als Standard für die amorphe Phase, also mit 0 % Kristallinität eingesetzt. Werden andere Standards eingesetzt, würden sich die Absolutwerte des bestimmten kristallinen Anteils ändern. In Tabelle 20 sind die Werte der hergestellten Mischungen für die Ermittlung des kristallinen Anteils der einzelnen Proben dargestellt.

Tabelle 20: Ergebnisse der Mischungen von amorpher und kristalliner Probe zur Bestimmung der kristallinen Anteile

Probe	Mischungsanteil L 104 [%]	kristalliner Anteil [%]	Bemerkungen
L104	100	100,0	als kristalliner Standard verwendet
Mischung 1	80	78,7	Mischung aus den Standards
Mischung 2	60	59,5	Mischung aus den Standards
Mischung 3	40	38,6	Mischung aus den Standards
Mischung 4	20	22,3	Mischung aus den Standards
RG752	0	0	als amorpher Standard verwendet

Die resultierende Geradengleichung der Regressionsgeraden der 6 Messwerte ist:

$$y = 0,98586x + 0,55714 \quad (3)$$

mit einem Korrelationskoeffizient $r = 0,99944$.

Anhand dieser Geradengleichung wurden durch Peakauswertung die kristallinen Anteile der untersuchten Polylactide berechnet.

3.2.4 Dynamische Differenz-Kalorimetrie (DSC)

Proben der zu untersuchenden Polylactide mit einer Probenmasse von ca. 4,5 – 16 mg wurden in Aluminium-Standardtiegel mit gelochten Deckeln eingewogen und in das Mettler Toledo Star mit der Meßzelle DSC 822 E mit Flüssig-Stickstoff-Kühlung und Probensammler eingebracht. Die Proben wurden in einem Bereich von - 20 °C bis 200 °C wie folgt erhitzt:

Liste der Temperaturstufen:

Nr.	Modus	Temperatur [°C]	Zeit [min.]	Aufheizrate [K/min.]
0	Start	- 40	-	0
1	Isotherm (Equilibrierung)	- 40	5	0
2	Dynamisch	200	-	10
3	Dynamisch	Raumtemperatur	-	0
1	Isotherm	- 40	5	0
2	Dynamisch	200	-	10

Auswertung: Software Star 6.10, graphische Darstellung

Meßwerte: Schmelzpunkt T_S / Schmelzenthalpie H_S

Rekristallisationstemperatur T_R / Rekristallisationsenthalpie H_R
Glasübergänge mit mittlerer Temperatur T_g
Änderung der Spezifischen Wärme Δc_p

3.2.5 Ermittlung der maximal lösbaren Konzentration der Polylactide

Polylactid und PEG 400/ flüssiges Oligolactid wurden zu gleichen Masseteilen in einen Erlenmeyerkolben eingewogen und über Nacht stehen gelassen. Danach wurden die Mischungen gerührt und gegebenenfalls kurzzeitig auf 90 °C erhitzt, um eine homogene Lösung zu erhalten. Gelingt dies nicht, d.h. blieben ungelöste Partikel zurück, wurde der gleiche Masseteil PEG 400/ flüssiges Oligolactid nochmals hinzugefügt und der Prozeß wiederholt. Der Prozeß wurde so lange wiederholt, bis eine visuell klare Lösung erhalten wurde. Die Konzentration der Lösung, bei der das der Fall war, wurde als maximal lösbare Konzentration [%] angegeben.

Aus diesem Vorgehen resultierte eine Konzentrationsreihe wie folgt:

50 % / 33,3 % / 25 % / 20 % / 16,7 % / 14,3 % / 12,5 %, 11,1 %. Falls bei 11,1 % keine klare Lösung entstand, wurde der Versuch abgebrochen und die maximal lösbare Konzentration mit "0 %" angegeben.

3.2.6 Ermittlung der Spritzbarkeit der Polylactide

Die unter 3.2.5 hergestellten Lösungen mit ihrer maximal lösbaren Konzentration wurden in eine skalierte Ganzglasspritze aufgezogen und durch eine Kanüle zur intravenösen Injektion mit einer Länge von 40 mm und einem Durchmesser von 1,5 mm in das Freisetzungsmittel appliziert. War dies mit einer konstanten Kraft von ca. 75 ± 5 N möglich, wurden die Lösungen als spritzbare Lösungen bezeichnet, war ein Ausdrücken nicht möglich, wurden diese Lösungen, die demnach eine zu hohe Viskosität aufwiesen, als nicht spritzbar eingestuft. Die maximal spritzbare Konzentration [%] wurde erfaßt.

3.2.7 Beurteilung der In-situ-Implantatbildung

Die In-situ-Implantatbildung wurde wie folgt beurteilt: Bildete sich bei der Applikation der Lösungen in das Freisetzungsmedium ein formstabiles Implantat in situ in Kugelform heraus, wurde es als In-situ-Implantat bezeichnet. War dies nicht der Fall, d.h. verteilte sich die Lösung als diffuses Präzipitat oder Flocken im Freisetzungsmedium bzw. zerfiel die Kugelform innerhalb von 5 min., wurde diese Lösung als nicht in situ implantatbildend eingestuft.

3.2.8 Herstellung der in situ geformten Implantate mit Cytochrom C

3.2.8.1 Zusammensetzung

Polylactid	11,1 - 50 %
PEG 400/ flüssiges Oligolactid	50 – 88,9 %

3.2.8.2 Herstellung

Die Rezepturmengen Polylactid und PEG 400/ flüssiges Oligolactid wurden in einen Erlenmeyerkolben eingewogen und über Nacht stehengelassen. Am nächsten Tag wurden die Mischungen, je nach Bedarf, kurzzeitig bis maximal 90 °C erhitzt und so eine homogene, fließfähige Lösung unter Rühren erstellt. Mischungen, die dieser Anforderung nicht entsprachen, wurden von der weiteren Verarbeitung ausgeschlossen. Nach Abkühlung wurde die entsprechende Rezepturmenge Cytochrom C (6 mg/g Lösung) zugegeben und eine homogene Suspension mittels Magnetprüher hergestellt.

3.2.9 Herstellung der gepreßten Implantate (Ringtablette) mit Cytochrom C

3.2.9.1 Zusammensetzung

festes Polylactid/ Polylactid-co-glycolid	1,780 g
Mannitol	0,100 g
Cytochrom C	0,120 g

3.2.9.2 Herstellung

Die Rezepturmengen wurden gemeinsam in einen Mörser mit Pistill eingewogen und mechanisch verrieben. Zur Herstellung der Granulate wurde die Mischung mit einer

ausreichenden Menge Granulierflüssigkeit 50 %-igem Ethanol versetzt und granuliert. Das feuchte Granulat wurde im Trockenschrank eine Stunde bei 45 °C getrocknet. Anschließend wurden die oben beschriebenen Ringtabletten mit einer Masse von $200,0 \pm 2,0$ mg auf einer KBr-Pressen Typ Graseby Specac 15 t mit einer konstanten Preßkraft von 5 t hergestellt. Die erhaltenen Tabletten wiesen einen Tabletten-durchmesser von 8 mm und eine Tablettenhöhe von ca. 5,4 mm auf.

3.2.10 Apparatur zur In-vitro-Freisetzung von Cytochrom C und zur Stabilitätsbeurteilung von Cytochrom C

In einen Erlenmeyerkolben wurden 25,0 ml Freisetzungsmittel vorgelegt. Die gepreßten Implantate wurden in das Medium gegeben, und die in situ geformten Implantate wurden mit skaliertem Ganzglasspritze und durch eine Kanüle zur intravenösen Injektion mit einer Länge von 40 mm und einem Durchmesser von 1,5 mm direkt in die Flüssigkeit eingespritzt (Abbildung 55).



Abbildung 55: Einbringen der in situ geformten Implantate in das Freisetzungsmittel

Gepreßte Implantate wurden gewogen und daraus die für die Berechnung der kumulativen Freisetzung notwendige Masse Cytochrom C in der Arzneiform berechnet. Die Berechnung der Masse von Cytochrom C in den in situ geformten Implantaten erfolgte durch Rückwägung der entleerten Spritze und Berechnung der somit applizierten Menge Lösung, d.h. die genaue Einwaage wurde durch Bestimmen der Masse vor und nach dem Spritzvorgang bestimmt. Es wurden $2,0 \text{ g} \pm 0,2$ g appliziert. Das Gefäß wurde, mit einem Stopfen verschlossen und in einem

Trockenschrank bei 37 °C aufbewahrt. Nach jeweils definierten Zeitintervallen wurden 2 ml Freisetzungsmedium aus den Erlenmeyerkolben entnommen und mit 2 ml frischem, auf 37 °C erwärmten Medium ersetzt. Bei der Untersuchung der gepreßten Implantate wurden das Medium mit Vollpipetten entnommen und ersetzt. Bei den in situ geformten Implantaten erfolgte die Entnahme der 2 ml mit skaliertes Ganzglasspritze und Kanüle. Zwischen Spritze und Kanüle wurde ein Filter eingesetzt. Das Medium wurde durch den Filter in die Spritze aufgezogen und dort entnommen, das frische Freisetzungsmedium wurde dann aus der Spritze durch denselben Filter in den Erlenmeyerkolben gespritzt.

1ml der entnommenen Lösung wurde nötigenfalls verdünnt, und mittels UV-VIS Spektrophotometer wurde die Konzentration bestimmt.

Als Freisetzungsmedium diente eine Lösung folgender Zusammensetzung:

Natriumchlorid	9,0 g
Natriumdodecylsulfat	2,5 g
Natriumazid	0,2 g
Gereinigtes Wasser	ad 1000,0 g

3.2.11 Bestimmung der kumulativen Freisetzung von Cytochrom C

Die photometrische Bestimmung der kumulativen Freisetzung von Cytochrom C wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Gerät	SHIMADZU UV-2102 /3102 PC
	Detektor: Photomultiplier R-928
	spektrale Bandbreite: variabel
	photometrisches System: Doppelstrahl

Von freigesetztem Cytochrom C wurden zunächst die Spektren aufgenommen und aus den Spektren die Extinktionen bei entsprechenden Wellenlängen ermittelt.

Meßwerterfassung: Cytochrom C 406 nm

Berechnung der prozentualen kumulativen Freisetzung von Cytochrom C aus den gemessenen Extinktionen erfolgte nach folgender Gleichung:

$$c [\%] = E_{\text{gemessen}} * 100 / E_{100 \%} \quad (4)$$

c	kumulative Freisetzung [%]
E _{gemessen}	gemessene Extinktion
E _{100 %}	Extinktion des 100 %-Wertes Cytochrom C bezogen auf die eingesetzte Menge aus der Geraden der linearen Regression

3.2.12 Bestimmung der Wasseraufnahme und des Gewichtsverlusts

Proben ausgewählter modulierter Polylactide mit einer Probenmasse von ca. 100 mg pro Form wurden in Hohlformen eingebracht und vor dem Start der Untersuchung gewogen. Auf diese Weise wurde gleichzeitig eine definierte äußere Oberfläche erzeugt, die bei allen Proben die gleiche Abmessung besaß.

Die mit dem Probenmaterial gefüllten Hohlformen wurden in Simulated Body Fluid (SBF) [202] bei pH = 7,4 eingebracht und über einen Zeitraum von 6 bis 12 Wochen untersucht. Im Abstand von 14 Tagen erfolgten die Probenahme zur Bestimmung des Gewichtsverlustes und der Wasseraufnahme. Für die Bestimmung des Gewichtsverlustes wurde die Probe bis zur Massekonstanz getrocknet.

Die Wasseraufnahme wurde nach folgender Gleichung berechnet:

$$WA = 100 (W_1 - W_0) / W_0 \quad (5)$$

WA	Wasseraufnahme [%]
W_1	Masse der Probe nach der Zeit t [g]
W_0	Masse der Probe zum Zeitpunkt t_0 [g]

Der Gewichtsverlust wurde nach folgender Gleichung berechnet:

$$WL = 100 (W_0 - W_2) / W_0 \quad (6)$$

WL	Gewichtsverlust [%]
W_2	Masse der Probe nach der Zeit t und dem anschließenden Trocknen [g]
W_0	Masse der Probe zum Zeitpunkt t_0 [g]

4 Zusammenfassung

Als Alternative zu Mikropartikeln, Microsphaeren, Nanospheren und anderen potentiellen Depotarzneiformen wurde ein neuartiges in situ geformtes Implantat entwickelt [176], das sich durch die Kombination aus einem modulierten Polylactid und einem biokompatiblen Lösungsmittel PEG 400 auszeichnet, in das Wirkstoffe, bevorzugt Proteine, in gelöster oder suspendierter Form, vorliegen können. Diese Formulierungen bilden sich nach dem Kontakt der Polylactid-PEG-Lösung mit wäßrigen Freisetzungsmitteln. Sie sind geeignet, den inkorporierten Wirkstoff, im Rahmen dieser Arbeit das Protein Cytochrom C, über einen Zeitraum von Tagen bis Wochen freizusetzen.

Voraussetzung für die Spritzbarkeit und Implantatbildung ist es jedoch, in ausreichender Konzentration ein geeignetes Polylactid im PEG 400 lösen zu können. Dabei stellte sich heraus, dass die kommerziell angebotenen Polylactide der Fa. Boehringer Ingelheim dafür nur in sehr eingeschränktem Maße geeignet sind.

Daher wurden im Rahmen dieser Arbeit modulierte Polylactide synthetisiert, die durch Verwendung bestimmter Startermoleküle, die das Grundgerüst des Polymers bestimmen, gekennzeichnet sind. So resultieren aus der Wahl des Startermoleküls lineare und sternförmig verzweigte Produkte, die sich hinsichtlich ihrer Molmasse durch Variation in Zusammensetzung und Wahl der Reaktionsbedingungen während der Synthese unterscheiden.

Diese und die kommerziell angebotenen Polylactide der Fa. Boehringer Ingelheim wurden hinsichtlich ihrer physiko-chemischen Eigenschaften mittels FT-RAMAN-Spektroskopie zur Strukturaufklärung, GPC zur Bestimmung der Molmassen, Röntgendiffraktometrie zur Ermittlung der morphologischen Eigenschaften und DSC-Untersuchungen zur Bestimmung der thermischen Eigenschaften charakterisiert. Diese Untersuchungen zeigten, dass sich die modulierten Polylactide in Gruppen hinsichtlich ihres Polymeraufbaus, in ihre Molekülgröße und den Typ des Polylactids einteilen lassen. Während die Poly-L-lactide ausschließlich amorph vorliegen, fällt bei den Poly-D,L-lactiden der kristalline Anteil im Polymer mit steigender Kettenlänge. Gleichzeitig wurden der Teil der modulierten Polylactide, die sich nicht zur Herstellung von in situ geformten Implantaten eignen, zur Herstellung von gepreßten Implantaten verwendet.

Die gepreßten Implantate waren als Ringtabletten ausgebildet. Sie enthielten bevorzugt modulierte Poly-L-lactide bzw. höhermolekulare Produkte.

In den In-vitro-Untersuchungen wurde festgestellt, dass es eine begrenzte Anzahl von modulierten Polylactiden gibt, die eine kontrollierte Freisetzung des Cytochrom C aus den gepreßten und den in situ geformten Implantaten über Tage und Wochen ermöglichen können. Es zeigte sich jedoch deutlich, dass sich die Liberation durch die zu untersuchenden Faktoren wie Polymertyp, Kettenlänge, Konzentration des Polymers in den Formulierungen steuern lässt.

Bei den Untersuchungen zum Einfluß der physiko-chemischen Eigenschaften auf die Freisetzung wurde festgestellt, dass die thermischen Eigenschaften wie insbesondere die Glasübergangstemperatur, aber auch die Molmasse des jeweiligen Polymertyps wichtige Faktoren darstellen, die eine Aussage zur Abhängigkeit liefern. Damit sind Voraussagen zur Optimierung der untersuchten Formulierungen hinsichtlich des Polymertyps und dessen Struktur ableitbar.

Was bei der Entwicklung zur parenteralen Depotarzneiform noch zu klären ist, sind die Fragen der Implantierbarkeit und der Sterilisation des Formulierungen.

Die gepreßten Implantate müssen so verändert werden, dass Stäbchen bzw. Stifte herstellbar sind, die mittels Applikator injiziert werden können. Bei den in situ geformten Implantaten steht das Problem der Stabilisierung des Proteins in der Applikationsform - es ist eine Doppelkammerspritze mit Lösung und lyophilisiertem Protein denkbar - und der homogenen Verteilung in der Polymerlösung.

Die bekannten Sterilisationsmethoden wie Hitze, Dampf, Strahlung und chemische Immobilisierung mit Ethylenoxid wurden bereits eingehend auf ihre Vor- und Nachteile untersucht [26, 203] und Testverfahren zur Beurteilung der Sterilität entwickelt [204]. Erste Untersuchungen an den im Rahmen dieser Arbeit geprüften Formulierungen auch mit alternativen Sterilisationsverfahren (Mikrowellenbehandlung) wurden bereits erfolgreich durchgeführt [205, 206].

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass zum einen der Einfluß von untersuchten Polymereigenschaften auf die Freisetzung durch die Wahl eines geeigneten Testverfahrens heraus gearbeitet werden konnte. Zum anderen zeigte sich, dass sich die hergestellten modulierten Polylactide für die Verwendung in gepreßten und in situ geformten Implantaten als Hilfsstoffe zur kontrollierten Freisetzung von Proteinen, vorzugsweise dem im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Cytochrom C, über einen Zeitraum von Tagen und Wochen eignen.

5 Literaturverzeichnis

- 1 T. Kissel, Y.X. Li, C. Volland, S. Gorich, R. Koneberg, Parenteral protein delivery systems using biodegradable polyesters of ABA block structure, containing hydrophobic poly(lactide-co-glycolide) A blocks and hydrophilic poly(ethylene oxide) B blocks. *J. Contr. Rel.* 39 (1996) 315 – 326
- 2 J. Heller, in: *Medical applications of controlled release Vol. I*, CRC Press, Boca Raton, 1984, S. 69
- 3 T. Kissel, Injizierbare Retardformen, *Acta Pharm. Technol.* 29 (1983) 221 – 239
- 4 B. Conti, P. Giunchedi, U. Conte, Cellulose microparticles in drug delivery. *STP Pharm. Sci.* 7 (1997) 331 - 342
- 5 C. Damge, H. Vranckx, P. Balschmidt, P. Couvreur, Poly(alkyl cyanoacrylate) nanospheres for oral administration of insulin. *J. Pharm. Sci.* 86 (1997) 1403 - 1409
- 6 S. Aftabroushad, E. Doelker, Factors influencing the entrapment of a water soluble model drug into injectable microparticles prepared using solvent evaporation and phase separation techniques, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 40 (1994) 232 - 242
- 7 W.R. Gombotz, D.K. Pettit, Biodegradable polymers for protein and peptide drug delivery. *Bioconj. Chem.* 6 (1995) 332 – 351
- 8 G.W. Hastings, P. Ducheyne, *Macromolecular Biomaterials*. CRC Press, Boca Raton, 1984
- 9 R.U. Jalil, Biodegradable poly (lactic acid) and poly (lactide-co-glycolide) polymers in sustained drug delivery. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 16 (1990) 2353 - 2367
- 10 M.K. Yeh, S.S. Davis, A.G. Coombes, Improving protein delivery from microparticles using blends of poly(DL lactide co-glycolide) and poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide) copolymers. *Pharm. Res.* 13 (1996) 1693 - 8
- 11 S.M. Li, H. Garreau, M. Vert, M. Therin, P. Christel, In vivo degradation mechanism of massive aliphatic polyesters derived from lactic and glycolic acids. *R. Soc. Chem.* 109 (1992) 263 - 266
- 12 H.V. Maulding, Prolonged delivery of peptides by microcapsules. *J. Contr. Rel.* 6 (1987) 167 - 176

- 13 A.U. Daniels, M.S. Taylor, K.P. Aadriane, J. Heller, Toxicity of absorbable polymers for fracture fixation devices, 38th Annual Meet., Orthopaedic Soc., February 17 - 20, Washington D.C. 1992
- 14 H. Greim, K.H. Summer, Toxikologische Bewertung der Inkorporation von Polymeren und Copolymeren aus L- und D-Lactid und Glycolid. Boehringer Ingelheim 1985
- 15 H. Kobayashi, K. Shiraki, Y. Ikada, Toxicity test of biodegradable polymers by implantation in rabbit cornea, Fourth World Biomaterials Congress, April 24 – 28, 1992, Berlin
- 16 J. Sandow, W. von Rechenberg, H. Seidel, M. Keil, Experimental studies on tissue tolerance and on biodegradation of polylactide/glycolide-buserelin implants in rats. *Klin. Exp. Urol.* 20 (1989) 157–166
- 17 A. Van Sliedregt, A.M. Radder, K. de Groot, C.A. van Blitterswijk, In vitro biocompatibility testing of polylactides. Part I: proliferation of different cell types, *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* 3 (1992) 365 – 370
- 18 Y. Tabata, Y. Ikada, Macrophage phagocytosis of biodegradable microspheres composed of L-lactic acid/glycolic acid homo- and copolymers, *J. Biomed. Mater. Res.* 22 (1988) 837 – 858
- 19 G.E. Visscher, R.L. Robison, G.J. Argentieri, Tissue Response to biodegradable injectable microcapsules, *J. Biomater. Appl.* 2 (1987) 118 - 131
- 20 J.M. Anderson, In vivo biocompatibility of implantable delivery systems and biomaterials, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 40 (1994) 1 - 8
- 21 M. Schellhorn, B. Buchholz, Hydrolytic degradation kinetics of amorphous resorbable polymers. A study of the temperature dependency. *Proceed. Intern. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.* 23 (1996)
- 22 D. Bodmer, T. Kissel, E. Traechslin, Factors influencing the release of peptides and proteins from biodegradable parenteral depot systems. *J. Contr. Rel.* 21 (1992) 129 - 137
- 23 A.S. Chawla, T.M.S. Chang, In vivo degradation of poly(lactic acid) of different molecular weights, *Biomater. Med. Dev. Art. Org.* 13 (1985/86) 153 - 162
- 24 G.E. Visscher, J.E. Pearson, J.W. Fong, G.J. Argentieri, R.L. Robison, H.V. Maulding, Effect of particle size on the in vitro and in vivo degradation rates of poly(D,L-lactide-co-glycolide) microcapsules, *J. Biomed. Mater. Res.* 22 (1988) 733 – 746

- 25 M. Vert, S. Li, H. Garreau, More about the degradation of LA/GA-derived matrices in aqueous media. *J. Contr. Rel.* 16 (1991) 15 - 26
- 26 R. Mank, G. Rafler, B. Nerlich, Parenterale Depotarzneiformen auf der Basis von biologisch abbaubaren Polymeren. *Pharmazie* 46 (1991) 9 – 18
- 27 D.L. Wise, T.D. Fellmann, J.E. Sanderson, R.L. Wentworth, *Drug Carriers in Biology and Medicine*. Academic Press, 1979, S. 237
- 28 R.K. Kulkarni, E.G. Moore, A.F. Hegyeli, F. Leonard, Biodegradable poly(lactic acid) polymers. *J. Biomed. Mater. Res.* 5 (1971) 169 - 181
- 29 R.K. Kulkarni, K.C. Pani, C. Neuman, F. Leonard, Polylactic acid for surgical implants. *Arch. Surg.* 93 (1966) 839 - 843
- 30 M. Tsakala, J. Gillard, M. Roland, F. Chabot, M. Vert, Pyrimethamine sustained release systems based on bioresorbable polyesters for chemoprophylaxis of rodent malaria. *J. Contr. Rel.* 5 (1988) 233 - 242
- 31 A. Smith, I.M. Hunneyball, Evaluation of poly(lactic acid) as a biodegradable drug delivery system for parenteral administration. *Int. J. Pharm.* 30 (1986) 215 - 220
- 32 J. Rak, J.L. Ford, C. Rostron, V. Walters, The preparation and characterization of poly(D,L-lactic acid) for use as a biodegradable drug carrier. *Pharm. Acta Helv.* 60 (1985) 162 - 169
- 33 K. Avgoustakis, J.R. Nixon, Biodegradable controlled release tablets: 1: Preparative variables affecting the properties of poly(lactide-co-glycolide) copolymers as matrix forming material. *Int. J. Pharm.* 70 (1991) 77 - 85
- 34 H.R. Kricheldorf, D. Damrau, Polymerizations of L-lactide initiated with Zn(II)-L-lactate and other resorbable Zn salts. *Macromol. Chem. Phys.* 198 (1997) 1753 – 1766
- 35 R.K. Kulkarni, E.G. Moore, A.F. Hegyeli, F. Leonard, Biodegradable poly(lactic acid) polymers. *J. Biomed. Mater. Res.* 5 (1971) 169 - 181
- 36 M. Phillips, J.D. Gresser, Sustained-release characteristics of a new implantable formulation of disulfiram. *J. Pharm. Sci.* 73 (1984) 1718 - 1720
- 37 D.K. Gilding, A.M. Reed, Biodegradable polymers in surgery – polyglycolic/poly(lactic acid) homo and copolymers: 1. *Polymer* 20 (1979) 1459 - 1464
- 38 S.Y. Kim, I.G. Shin, Y.M. Lee, Preparation and characterization of biodegradable nanospheres composed of methoxy poly(ethylene glycol) and DL-lactide block copolymer as novel drug carriers. *J. Contr. Rel.* 56 (1998) 197 - 208

- 39 J. Matsumoto, Y. Nakada, K. Sakurai, T. Nakamura, Y. Takahashi, Preparation of nanoparticles consisted of poly(L-lactide)-poly(ethylene glycol)-poly(L-lactide) and their evaluation in vitro. *Int. J. Pharm.* 185 (1999) 93 - 101
- 40 M. Morlock, T. Kissel, Y.X. Li, H. Koll, G. Winter, Erythropoietin loaded microspheres prepared from biodegradable LPLG-PEO-LPLG triblock copolymers: protein stabilization and in-vitro release properties. *J. Contr. Rel.* 56 (1998) 105 - 115
- 41 B. Jeong, Y.H. Bae, D.S. Lee, S.W. Kim, Biodegradable block copolymers as injectable drug-delivery systems. *Nature* 388 (1997) 860 - 862
- 42 H.S. Yoo, T.G. Park, Biodegradable polymeric micelles containing doxorubicin conjugated PLGA-PEG block copolymers. *Proceed. Int. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.* 27 (2000)
- 43 A. Rothen-Weinhold, J. Heller, J. Barr, R. Gurny, Poly(ortho esters) implants for the sustained delivery of a protein: factors influencing the release behavior of BSA in vitro. *Proceed. Int. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.* 27 (2000)
- 44 J. Tessmar, A. Mikos, A. Goepferich, New biodegradable polymers for the development of biomimetic biomaterials. *Proceed. Int. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.* 27 (2000)
- 45 C. Migliaresi, L. Fambri, D. Cohn, A study on the in vitro degradation of poly(lactic acid). *J. Biomater. Sci. Polymer Edn.* 5 (1994) 591 - 606
- 46 G. Rafler, M. Jobmann, Controlled release systems of biodegradable polymers - 1st communication: Hydrolytic degradation of biodegradable aliphatic polyesters. *Pharm. Ind.* 56 (1994) 565 - 570
- 47 D. Cohn, H. Younes, G. Marom, Amorphous and crystalline morphologies in glycolic acid and lactic acid polymers. *Polymers* 30 (1989) 1342 - 1349
- 48 M.O. Omelczuk, J.W. McGinity, The influence of polymer glass transition temperature and molecular weight on drug release from tablets containing poly-(D,L-lactic acid). *Pharm. Res.* 9 (1992) 26 - 32
- 49 K. Jamshidi, S.H. Hyon, Y. Ikada, Thermal characterisation of polylactides. *Polymer* 29 (1988) 2229 - 2234
- 50 H. von Büren, Herstellung und Charakterisierung von Polyaktidimplantaten. Dissertation Universität Heidelberg 1989
- 51 C. Hartmann, Herstellung und Eigenschaften umhüllter Poly-D,L-Laktid Mikropartikel. Dissertation Universität Heidelberg 1993

- 52 M. Herrlinger, In vitro Polymerabbau und Wirkstofffreigabe von poly-D,L-Laktid-Formlingen. Dissertation Universität Heidelberg 1994
- 53 J. Mauduit, N. Bukh, M. Vert, Gentamycin/poly(lactic acid) blends aimed at sustained release local antibiotic therapy administered per-operatively. I. The case of gentamycin base and gentamycin sulfate in poly(dl-lactic acid) oligomers. *J. Contr. Rel.* 23 (1993) 209 - 220
- 54 K. Suzuki, J.C. Price, Microencapsulation and dissolution properties of a neuroleptic in a biodegradable polymer, poly(d,l-lactide). *J. Pharm. Sci.* 74 (1985) 21 - 24
- 55 B. Wichert, P. Rohdewald, A new method for the preparation of drug containing polylactic acid microparticles without using organic solvents. *J. Contr. Rel.* 14 (1990) 269 - 283
- 56 M. Asano, H. Fukuzaki, M. Yoshida, M. Kumakura, In vivo characteristics of low molecular weight copoly(d,l-lactic acid) formulations with controlled release of LH-RH agonist. *Biomater.* 10 (1989) 569 - 573
- 57 M. Asano, H. Fukuzaki, M. Yoshida, M. Kumakura, T. Mashimo, H. Yuasa, K. Imai, H. Yamanaka, Application of poly d,l-lactic acids of varying molecular weight in drug delivery systems. *Drug Des. Del.* 5 (1990) 301 - 320
- 58 A.G. Hausberger, P.P. De Luca, Characterization of biodegradable poly(D,L-lactide-co-glycolide) polymers and microspheres. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 13 (1995) 747 - 760
- 59 S. Yoshioka, K. Iwaki, Y. Hayashi, Y. Aso, Y. Takeda, M. Uchiyama, Application of gel permeation chromatograph-low angle laser light scattering system to kinetic study on degradation of bioerodible polymers. *Chem. Pharm. Bull.* 36 (1988) 4951 - 4957
- 60 E.W. Fischer, H.J. Sterzel, G. Wegner, Investigation on the structure of solution grown crystals of lactide copolymers by means of chemical reactions. *Kolloid. Z. Z. Polym.* 251 (1973) 980 - 990
- 61 H.V. Maulding, T.R. Tice, D.R. Cowsar, J.W. Fong, D.E. Parson, J.P. Nazareno, Biodegradable microcapsules: Acceleration of polymeric excipient hydrolytic rate by incorporation of a basic medicament. *J. Contr. Rel.* 3 (1986) 103 - 117
- 62 D.K. Gilding, A.M. Reed, I.N. Askill, Calibration in gel permeation chromatography: Primary, universal and empirical methods. *Polym.* 22 (1981) 505 - 512

- 63 R.A. Kenley, M.O. Lee, T.R. Mahoney, L.M. Sanders, Poly(lactide-co-glycolide) decomposition kinetics in vivo and in vitro. *Macromol.* 20 (1987) 2398 - 2403
- 64 S.S. Shah, Y. Cha, C.G. Pitt, Poly(glycolic acid-co-DL-lactic acid): Diffusion or degradation controlled drug delivery? *J. Contr. Rel.* 18 (1992) 261 - 270
- 65 D.T. O'Hagan, H. Jeffery, S.S. Davis, The preparation and characterization of poly(lactide-co-glycolide) microparticles: III. Microparticle/ polymer degradation rates and the in vitro release of a model protein. *Int. J. Pharm.* 103 (1994) 37 - 45
- 66 S.A.M. Ali, P.J. Doherty, D.F. Williams, Molecular biointeractions of biomedical polymers with extracellular exudate and inflammatory cells and their effects on the biocompatibility, in vivo. *Biomater.* 10 (1994) 779 - 785
- 67 J.A.P.P. van Dijk, J.A.M. Smit, F.E. Kohn, J. Feijen, Characterization of poly(D,L-lactic acid) by gel permeation chromatography. *J. Polym. Sci. Polym. Chem. Ed.* 21 (1983) 197 - 208
- 68 Z. Grubisic, P. Rempp, H. Benoit, A universal calibration for gel permeation chromatography. *J. Polym. Sci. Part B* 5 (1967) 753 - 759
- 69 J.M. Hotz, M.A. Leenellett, Improved method for determination of polymer molecular weight in PLGA microspheres. *Proceed. Int. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.* 27 (2000)
- 70 D.W. Grijpma, A.J. Pennings, (Co)polymers of L-lactide, 1. Synthesis, thermal properties and hydrolytic degradation. *Macromol. Chem. Phys.* 195 (1994) 1633 - 1647
- 71 M. Asano, H. Fukuzaki, M. Yoshida, M. Kumakura, H. Yuasa, K. Imai, H. Yamanaka, U. Kawaharada, K. Suzuki, In vivo controlled release of a luteinizing hormone-releasing hormone agonist from poly(D,L-lactic acid) formulations of varying degradation pattern. *Int. J. Pharm.* 67 (1991) 67 - 77
- 72 C. Jie, K.J. Zhu, Preparation, characterization and biodegradable characteristics of poly(1,3-trimethylene carbonate co glycolide). *Macromol.* 24 (1996) 369 - 375
- 73 Y. Cha, C.G. Pitt, The acceleration of degradation-controlled drug delivery from polyester microspheres. *J. Contr. Rel.* 8 (1989) 75 - 85
- 74 M.J. Dorta, O. Munguia, M. Llabres, Effects of polymerization variables on PLGA properties: molecular weight, composition and chain structure. *Int. J. Pharm.* 100 (1993) 9 - 14

- 75 Y. Cha, C.G. Pitt, One week subdermal delivery on biodegradable microcapsules. *J. Contr. Rel.* 7 (1988) 69 - 78
- 76 A. Demirdere, T. Kissel, U. Siemann, H. Sucker, Permeability and release properties of biodegradable polyesters Part I: Feasibility of reservoir systems. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 37 (1991) 42 – 48
- 77 D. Bendix, Auswahl und Charakterisierung resorbierbarer Polymere. APV-Kurs Nr. 541, 1991
- 78 J.M. Ruiz, B. Tissier, J.P. Benoit, Microencapsulation of peptide: A study of the phase separation of poly(dl-lactic-co-glycolic acid) co-polymers 50/50 by silicone oil. *Int. J. Pharm.* 49 (1989) 69 - 77
- 79 J.P. Kitchell, S.C. Crooker, D.L. Wise, L.J.D. Zaneveld, Preparation of biodegradable levonorgestrel rods, in: G.I. Zatuchni, A. Goldsmith, J.D. Shelton, J.J. Sciarra, Long-acting contraceptive delivery systems. Harper and Row, Philadelphia 1984
- 80 F. Chabot, M. Vert, S. Chapelle, Configurational structures of lactic acid stereocopolymers as determined by $^{13}\text{C}\{-^1\text{H}\}$ NMR. *Polymer* 24 (1983) 53 - 59
- 81 W. Dittich, R.C. Schulz, Kinetik und Mechanismus der ringöffnenden Polymerisation von L(-)-Lactid. *Angew. Makromol. Chem.* 15 (1971) 109 - 126
- 82 A. Schindler, D. Harper, Polylactide II. Viscosity-molecular weight relationships and unperturbed chain dimensions. *J. Polym. Sci.* 17 (1979) 2593 - 2599
- 83 D. Bendix, Analytical studies on the solubility problem of poly(d,l-lactid-co-glycolide) 50:50. *Proceed. Intern. Symp. Contr. Rel. Bioact. Mater.* 17 (1990) 248 - 249
- 84 H.R. Kricheldorf, J.M. Jonte, M. Berl, Polylactones 3. Copolymerization of glycolide with l,l-lactide and other lactones. *Makromol. Chem. Suppl.* 12 (1985) 25 - 38
- 85 A. Schindler, K.D. Gaetano, Poly(lactate) III. Stereoselective polymerization of meso-dilactide. *J. Polym. Sci. Polym. Lett.* 26 (1988) 47 - 48
- 86 A. Schindler, D. Harper, Poly(lactic acid) I. Stereosequence distribution in the polymerization of racemic dilactide. *J. Polym. Sci. Polym. Lett.* 14 (1976) 729 - 734
- 87 H. Fukuzaki, M. Yoshida, M. Asano, M. Kumakura, Synthesis of copoly(D,L-lactide acids) with relative low molecular weight and their in vitro degradation. *Eur. Polym. J.* 25 (1989) 1019 - 1026

- 88 T. Kissel, A. Demirdere, Microspheres – A controlled release system for parenteral application, In: Controlled Drug Delivery, B.W. Müller (Ed.), Paperback APV Band 17, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart 1987, 103 - 131
- 89 C.X. Song, V. Labhasetwar, R.J. Levy, Proc. Int. Symp. Contr. Rel. Bioact. Mater. 23 (1996) 473 - 474
- 90 T.G. Park, S. Cohen, R. Langer, Poly(L-lactid acid)/pluronic blends: Characterization of phase separation behavior, degradation, and morphology and use as protein- releasing matrices. Macromolecules 25 (1992) 116 - 122
- 91 X. Zhang, U.P. Wyss, D. Pichora, B. Amsden, M.F.A. Goosen, Controlled release of albumin from biodegradable poly(D,L-lactide) cylinders. J. Contr. Rel. 25 (1993) 61 - 69
- 92 K. Mäder, G. Bacic, A. Domb, H.M. Swartz, Proc. Int. Symp. Contr. Rel. Bioact. Mater. 22 (1995) 780 - 781
- 93 K. Mäder, G. Bacic, A. Domb, H.M. Swartz, Proc. Int. Symp. Contr. Rel. Bioact. Mater. 22 (1995) 77 - 78
- 94 M. Asano, M. Yoshida, I. Kaetsu, K. Imai, T. Mashimo, H. Yuasa, H. Yamanaka, K. Suzuki, I. Yamazaki, Biodegradability of hot-pressed poly(lactic acid) formulation with controlled release of LHRH agonist and its pharmacological influence on rat prostate. Makromol. Chem. Rapid Commun. 6 (1985) 509 - 513
- 95 Y.Y. Hsu, J.D. Gresser, D.J. Trantolo, C.M. Lyons, R.J. Gangadharam, D.L. Wise, J. Contr. Rel. 40 (1996) 293 - 302
- 96 K. Whang, K.E. Healy, Proc. Int. Symp. Contr. Rel. Bioact. Mater. 22 (1995) 536 - 537
- 97 S.C.R. Catharino, A. Dashevsky, R. Bodmeier, Reconstitution of PLGA polymers (powder or lyophilized) in biocompatible solvents just prior to injection for the formation of in-situ implants. Proceed. Int. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater. 27 (2000)
- 98 R. Bodmeier, H. Wang, D.J. Dixon, S. Mawson, K.P. Johnston, Polymeric microspheres prepared by spraying into compressed carbon dioxide. Pharm. Res. 12 (1995) 1211 - 1217
- 99 H.T. Wang, E. Schmitt, D.R. Flanagan, R.J. Linhardt, Influence of formulation methods on the in vitro controlled release of protein from poly(ester) microspheres. J. Contr. Rel. 17 (1991) 23 - 31

- 100 B. Gander, E. Wehrli, R. Alder, H.P. Merkle, Quality improvement of spray-dried, protein-loaded D,L-PLA microspheres by appropriate polymer solvent selection. *J. Microencapsul.* 12 (1995) 83 – 97
- 101 P. Wehrle, B. Magenheimer, S. Benita, The influence of process parameters on the PLA nanoparticle size distribution, evaluated by means of factorial design. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 41 (1995) 19 - 26
- 102 G. Rafler, M. Jobmann, Controlled release systems of biodegradable polymers, 2nd communication: Microparticle preparation by spray drying. *Pharm. Ind.* 56 (1994) 655 - 660
- 103 G. Owusu-Ababio, J.A. Rogers, Formulation and release of ciprofloxacin from poly(L-lactic acid) microparticles. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 42 (1996) 188 - 192
- 104 M. Ramchandani, M. Pankaskie, D. Robinson, The influence of manufacturing procedure on the degradation of poly(lactide-co-glycolide) 85:15 and 50:50 implants. *J. Contr. Rel.* 43 (1997) 161 - 173
- 105 C. Thomasin, H.P. Merkle, B.A. Gander, Physico-chemical parameters governing protein microencapsulation into biodegradable polyesters by coacervation. *Int. J. Pharm.* 147 (1997) 173 - 186
- 106 H. Murakami, H. Yoshino, M. Mizobe, M. Kobayashi, H. Takeuchi, Y. Kawashima, *Proc. Int. Symp. Contr. Rel. Bioact. Mater.* 23 (1996) 361 - 362
- 107 T. Niwa, H. Takeuchi, T. Hino, N. Kunou, Y. Kawashima, In vitro drug release behavior of D,L-lactide/glycolide copolymer (PLGA) nanospheres with nafarelin acetate prepared by a novel spontaneous emulsification solvent diffusion method. *J. Pharm. Sci.* 83 (1994) 727 - 732
- 108 Y. Hayashi, S. Yoshioka, Y. Aso, A. Li Wan Po, T. Terao, Entrapment of proteins in poly(L-lactide) microspheres using reversed micelle solvent evaporation. *Pharm. Res.* 11 (1994) 337 - 340
- 109 J.C. Leroux, E. Allemann, E. Doelker, R. Gurny, New approach for the preparation of nanoparticles by an emulsification-diffusion method. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 41 (1995) 14 - 18
- 110 M.K. Yeh, A.G. Coombes, P.G. Jenkins, S.S. Davis, Novel emulsification-solvent extraction technique for production of protein loaded biodegradable microparticles for vaccine and drug delivery. *J. Contr. Rel.* 33 (1995), 437 - 445

- 111 P.B. O'Donnell, J.W. McGinity, Influence of processing on the stability and release properties of biodegradable microspheres containing thioridazine hydrochloride. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 45 (1998) 83 - 94
- 112 F. Pavanetto, B. Conti, P. Giunchedi, I. Genta, U. Conte, Polylactide microspheres for the controlled release of diazepam. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 40 (1994) 27 - 31
- 113 H. Sah, M.S. Smith, R.T. Chern, A novel method of preparing PLGA microcapsules utilizing methylethyl ketone. *Pharm. Res.* 13 (1996) 360 - 367
- 114 U.V. Singh, N. Udupa, In vitro characterization of methotrexate-loaded poly(lactic acid) microspheres of different molecular weights. *Drug Del.* 5 (1998) 57 - 61
- 115 H. Jeffery, S.S. Davis, D.T. O'Hagan, Preparation and characterization of poly(lactide-co-glycolide) microparticles. Part 2. Entrapment of a model protein using a (water-in-oil)-in-water emulsion solvent evaporation technique. *Pharm. Res.* 10 (1993) 362 - 368
- 116 G.F. Dawson, G.W. Halbert, *Proc. Int. Symp. Contr. Rel. Bioact. Mater.* 22 (1995) 424 - 425
- 117 J.C. Leroux, E. Allemann, F. De Jaeghere, E. Doelker, R. Gurny, *J. Contr. Rel.* 39 (1996) 339 - 350
- 118 A. Kader, R. Jalil, Formulation factors affecting drug release from poly(lactic acid) (PLA) microcapsule tablets. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 25 (1999) 141 - 151
- 119 R. Steendam, C.F. Lerk, Poly(D,L-lactic acid) as a direct compression excipient in controlled release tablets. Part I: Compaction behaviour and release characteristics of poly(DL-lactic acid) matrix tablets. *Int. J. Pharm.* 175 (1998) 33 - 46
- 120 W.J. Lambert, K.D. Peck, Development of an in situ forming biodegradable poly-lactide-co-glycolide system for the controlled release of proteins. *J. Contr. Rel.* 33 (1995) 189 - 195
- 121 M.L. Shively, B.A. Coonts, W.E. Renner, J.L. Southard, A.T. Bennett, Physico-chemical characterization of a polymeric injectable implant delivery system. *J. Contr. Rel.* 33 (1995) 237 - 243
- 122 R. Gurny, N.A. Peppas, D.D. Harrington, G.S. Banker, Development of biodegradable and injectable latices for controlled release of potent drugs. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 7 (1981) 1 - 25

- 123 N.H. Shah, A.S. Railkar, F.C. Chen, R. Tarantino, A.W. Malick, Biodegradable injectable implant for delivering micro and macromolecules using poly(lactic-co-glycolic) acid (PLGA) copolymers. *J. Contr. Rel.* 27 (1993) 139 - 147
- 124 G. Chandrashekar, N. Udupa, Biodegradable injectable implant systems for long term drug delivery using poly (lactic-co-glycolic) acid copolymers. *J. Pharm. Pharmacol.* 48 (1996) 669 - 674
- 125 R. Eliaz, J. Kost, Biodegradable injectable in-situ forming implants for protein delivery. *Proc 4th World Meeting APV/APGI, Berlin, Florence 2002*
- 126 H. Rackur, Phase inversion of PLGA/ drug solutions in NMP and role of drug molecular weight on release characteristics, *Proc 3rd World Meeting APV/APGI, Berlin, April 2000*
- 127 A. Fahr, T. Kissel, Mikropartikel und Implantate: Arzneiformen zur parenteralen Applikation, in: R.H. Müller, G.E. Hildebrand, *Pharmazeutische Technologie: Moderne Arzneiformen*, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart 1997
- 128 T. Kissel, A. Demirdere, Microspheres – A controlled release system for parenteral application, *Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart 1987*
- 129 A. Göpferich, Polymer degradation and erosion: mechanisms and applications. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 42 (1996) 1 - 11
- 130 J. Heller, Controlled release of biologically active compounds from bioerodible polymers. *Biomater.* 1 (1980) 51 - 58
- 131 J. Heller, Bioerodible systems, in: R.S. Langer, D.L. Wise, *Medical applications of controlled release*. CRC Press, Boca Raton, 1984
- 132 S.M. Li, H. Garreau, M. Vert, Structure-property relationships in the case of the degradation of massive poly(α -hydroxy acids) in aqueous media. *J. Mater. Sci.: Mater. in Med.* 1 (1990) 198 - 206
- 133 C. Pitt, Z. Gu, Modification of the rates of chain cleavage of poly(ϵ -caprolactone) and related polyesters in the solid state. *J. Contr. Rel.* 4 (1987) 283
- 134 B. Buchholz, Accelerated degradation test on resorbable polymers, in: H. Planck, M. Dauner, M. Renardy, *Degradation phenomena on polymeric biomaterials*. Springer Verlag, Berlin Heidelberg 1992

- 135 A. Schindler, R. Jeffcoat, G.L. Kimmel, C.G. Pitt, M.E. Wall, R. Zweidinger, Biodegradable polymers for sustained release drug delivery, in: E.M. Pearce, J.R. Schaefgen, Contemporary topics in polymer science. Plenum Press, New York 1977
- 136 T.G. Park, Degradation of poly(D,L-lactic acid) microspheres: effect of molecular weight. *J. Contr. Rel.* 30 (1994) 161 - 173
- 137 M. Vert, S.M. Li, H. Garreau, New insights on the degradation of bioresorbable polymeric devices based on lactic and glycolic acids. *Clin. Mater.* 10 (1992) 3 - 8
- 138 J.W. Leenslag, A.J. Pennings, R.R.M. Bos, F.R. Rozema, G. Boering, Resorbable materials of poly(l-lactide). VII. In vivo and in vitro degradation. *Biomater.* 8 (1987) 311 - 314
- 139 R. Miller, J. Brady, D. Cutright, Degradation rates of oral resorbable implants (polylactides and polyglycolates): Rate modification with changes in PLA/GA-copolymer ratios. *J. Biomed. Mater. Res.* 11 (1977) 711 - 719
- 140 C.G. Pitt, Non microbial degradation of polyesters, In: M. Vert, J. Feijen, J. Albertson, G. Scott, E. Chiellini, Biodegradable polymers and plastics. Redwood Press Ltd, Melksham, UK (1992) 7 - 20
- 141 J. Heller, Chemically self regulated drug delivery systems. *J. Contr. Rel.* 8 (1988) 111 - 125
- 142 J. Kaetsu, M. Yoshida, M. Asano, H. Yamanaha, K. Imai, H. Suasa, T. Mashimo, K. Suzuki, R. Katakai, M. Oya, Biodegradable implant composites for local therapy. *J. Contr. Rel.* 6 (1987) 249 - 263
- 143 Y. Aso, S. Yoshioka, A.L.W. Po, T. Terao, Effect of temperature on mechanisms of drug release and matrix degradation of poly(D,L-lactide) microspheres *J. Contr. Rel.* 31 (1994) 33 - 39
- 144 B. Ronneberger, Biodegradable polyesters: Degradation behavior in vivo and in vitro and characteristics of biocompatibility. Cuvillier Verlag, Göttingen 1995
- 145 M. Hakkarainen, A.C. Albersson, S. Karlsson, Weight losses and molecular weight changes correlated with the evolution of hydroxyacids in simulated in vivo degradation of homo and copolymers of PLA and PGA. *Polym. Degrad. Stabil.* 52 (1996) 283 - 291
- 146 A.M. Reed, D.K. Gilding, Biodegradable polymers in surgery – polyglycolic/poly(lactic acid) homo and copolymers: 2. In vivo degradation. *Polym.* 22 (1981) 494 - 498

- 147 K. Makino, H. Ohshima, T. Kondo, Mechanisms of hydrolytic degradation of poly(L-lactide) microcapsules: Effect of pH, ionic strength and buffer concentration. *J. Microencaps.* 3 (1986) 203 - 212
- 148 K. Makino, M. Arakawa, T. Kondo, Preparation and in vitro degradation properties of polylactide microcapsules. *Chem. Pharm. Bull.* 33 (1985) 1195 - 1201
- 149 J. Mauduit, E. Perouse, M. Vert, Hydrolytic degradation of films prepared from blends of high and low molecular weight poly(DL-lactic acid)s. *J. Biomed. Mater. Res.* 30 (1996) 201 - 207
- 150 X. Zhang, U.P. Wyss, D. Pichora, M.F.A. Goosen, An investigation of poly(lactic acid) degradation. *J. Bioact. Comp. Polym.* 9 (1994) 80 - 100
- 151 K. Makino, H. Ohshima, T. Kondo, Effects of plasma proteins on degradation properties of poly(L-lactide) microcapsules. *Pharm. Res.* 4 (1987) 62 - 65
- 152 C.G. Pitt, Y. Cha, S.S. Shah, K.Y. Zhu, Blends of PVA and PLGA: control of the permeability and degradability of hydrogels by blending. *J. Contr. Rel.* 19 (1992) 189 - 200
- 153 G. Crotts, T.G. Park, Stability and release of bovine serum albumin encapsulated within poly (D,L-lactide-co-glycolide) microparticles. *J. Contr. Rel.* 44 (1997) 123 - 134
- 154 M.D. Blanco, M.J. Alonso, Development and characterization of protein-loaded poly(lactide-co-glycolide) nanospheres. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 43 (1997) 287 - 294
- 155 R.L. Cleek, K.C. Ting, S.G. Eskin, A.G. Mikos, Microparticles of poly(D,L-lactic-co-glycolic acid)/ poly(ethylene glycol) blends for controlled drug delivery. *J. Contr. Rel.* 48 (1997) 259 - 268
- 156 L. Chen, R.N. Apte, S. Cohen, Characterization of PLGA microspheres for the controlled delivery of IL-1 alpha for tumor immunotherapy. *J. Contr. Rel.* 43 (1992) 261 - 272
- 157 L.S. Liu, S.Q. Liu, S.Y. Ng, M. Froix, T. Ohno, J. Heller, Controlled release of interleukin-2 for tumour immunotherapy using alginate/chitosan porous microspheres. *J. Contr. Rel.* 43 (1992) 65 - 74
- 158 R.C. Mehta, R. Jeyanthi, S. Calis, B.C. Thanoo, P.P. DeLuca, Biodegradable microspheres as depot system for parenteral delivery of peptide drugs. *J. Contr. Rel.* 29 (1994) 375 - 384

- 159 A.K. Kwong, S. Chou, A.M. Sun, M.V. Sefton, M.F.A. Goosen, In vitro and in vivo release of insulin from poly(lactic acid) microbeads and pellets. *J. Contr. Rel.* 4 (1986) 47 - 62
- 160 T. Heya, H. Okada, Y. Ogawa, H. Toguchi, In vitro and in vivo evaluation of thyrotrophin releasing hormone release from copoly(dl-lactic/glycolic acid) microspheres. *J. Pharm. Sci.* 83 (1994) 636 - 640
- 161 T. Heya, Y. Mikura, A. Nagai, Y. Miura, H. Toguchi, Controlled release of thyrotrophin releasing hormone from microspheres: evaluation of release profiles and pharmacokinetics after subcutaneous administration. *J. Pharm. Sci.* 83 (1994) 798 - 801
- 162 R. Burns, G. McRae, L. Sanders, One year controlled release implant for the luteinizing hormone releasing hormone superagonist RS-49947. Part 2. Clinical performance results. *J. Contr. Rel.* 14 (1990) 233 - 241
- 163 R. Burns, K. Peterson, L. Sanders, One year controlled release implant for the luteinizing hormone releasing hormone superagonist RS-49947. Part 1. Implant characterization and analysis of in vitro results. *J. Contr. Rel.* 14 (1990) 221 - 232
- 164 F.G. Hutchinson, B.J. Furr, Biodegradable polymer systems for the sustained release of polypeptides. *J. Contr. Rel.* 13 (1990) 279 - 294
- 165 S. Cohen, T. Yoshioka, M. Lucarelli, L.H. Hwang, R. Langer, Controlled delivery systems for proteins based on poly(lactic/glycolic acid) microspheres. *Pharm. Res.* 8 (1991) 713 - 720
- 166 W. Lu, T.G. Park, Protein release from poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres: protein stability problems. *PDA J. Pharm. Sci. Technol.* 49 (1995) 13 - 19
- 167 P. Couvreur, F. Puisieux, Nano- and microparticles for the delivery of polypeptides and proteins. *Adv. Drug Delivery Rev.* 10 (1993) 141 - 162
- 168 D. Gilbert, S. Kim, Macromolecular release from collagen monolithic devices. *J. Biomed. Mater. Res.* 24 (1990) 1221 - 1239
- 169 B. Koneberg, Tetanus-Toxoid-Mikropartikel aus bioabbaubaren Polyestern: Untersuchungen zur Entwicklung eines neuen adjuvanten Trägersystems mit Langzeitwirkung. Dissertation, Marburg/ Lahn 1996
- 170 C. Witschi, E. Doelker, Influence of the microencapsulation method and peptide loading on poly(lactic acid) and poly(lactic-co-glycolic acid) degradation during in vitro testing. *J. Contr. Rel.* 51 (1998) 327 - 341

- 171 R. Wada, S.H. Hyon, T. Nakamura, Y. Ikada, In vitro evaluation of sustained drug release from biodegradable elastomer. *Pharm. Res.* 8 (1991) 1292 - 1296
- 172 H. Okada, Y. Doken, Y. Ogawa, H. Toguchi, Preparation of three-month depot injectable micro-spheres of leuporelin acetate using biodegradable polymers. *Pharm. Res.* 11 (1994) 1143 - 1147
- 173 X. Zhang, U.P. Wyss, D. Pichora, M.F.A. Goosen, A. Gonzal, C.L. Marte, Controlled release of testosterone and estradiol-17 β from biodegradable cylinders. *J. Contr. Rel.* 29 (1994) 157 - 161
- 174 B. Bittner, Protein loaded biodegradable microspheres: Effects of the manufacturing techniques and polymers on particle characteristics. Dissertation, Universität Göttingen 1998
- 175 Patent Nr. DE 199 08 753 / EP 1 152 776
- 176 P. Möller, Diplomarbeit, MLU Halle-Wittenberg, Halle/S. 1996
- 177 R.C. Mehta, B.C. Thanoo, P.P. DeLuca, Peptide containing microspheres from low molecular weight and hydrophilic poly(d,l-lactide-co-glycolide), *J. Contr. Rel.* 41 (1996) 249 - 257
- 178 B. Amecke, D. Bendix, G. Entenmann, in: D.L. Wise, *Encyclopedic Handbook of Biomaterials and Bioengineering. Part A: Materials.* Marcel Dekker New York 1995, Vol. 2, S. 977 - 1007
- 179 B. Schrader, *Infrared and Raman Spectroscopy*, Weinheim, VCH Verlagsgesellschaft, 1995
- 180 D. Cohn, H. Younes, G. Marom, Amorphous and crystalline morphologies in glycolic acid and lactic acid polymers. *Polymers* 28 (1987) 2018 - 2022
- 181 R.P. Batycky, J. Hanes, R. Langer, D.A. Edwards, A theoretical model of erosion and macromolecular drug release from biodegrading microspheres, *J. Pharm. Sci.* 86 (1997) 1464 - 1476
- 182 C.G. Pitt, A. Schindler, The kinetics of drug cleavage and release from matrices containing covalent polymer-drug conjugates, *J. Contr. Rel.* 33 (1995) 391 - 395
- 183 A. Joshi, K.J. Himmelstein, Dynamics of controlled release from bioerodible matrices, *J. Contr. Rel.* 15 (1991) 95 - 104
- 184 J. Siepmann, N.A. Peppas, Hydrophilic matrices for controlled drug delivery: an improved mathematical model to predict the resulting drug release kinetics (the "sequential layer" model), *Pharm. Res.* 17 (2000) 1290 - 1298

- 185 V. Lemaire, J. Belair, P. Hildgen, Structural modeling of drug release from biodegradable matrices based on a combined diffusion/ erosion process, *Int. J. Pharm.* 258 (2003) 95 - 107
- 186 H. Kranz, In situ forming biodegradable drug delivery systems, Dissertation Freie Universität Berlin, 2000
- 187 M.O. Omelczuk, J.W. McGinity, A comparative investigation of the compaction and dissolution properties of tablets containing poly(DL-lactic acid) as a binder and retardant polymer, *STP Pharm. Sci.* 5 (1995) 181 - 186
- 188 B. Oraceska, R.U. Jalil, J.R. Nixon, A comparison of dissolution properties from matrix tablets prepared from microcapsules and mixtures containing phenobarbitone and poly(DL-lactic acid), in: J.R. Nixon: *Pharmaceutical Technology – Controlled Drug Release Vol. 2*, Ellis Horwood, 1992, 142 - 152
- 189 A. Kamijo, S. Kamei, A. Saikawa, Y. Igari, Y. Ogawa, In vitro release test system of (D,L-lactic-glycolic) acid copolymer microcapsules for sustained release of LHRH agonist (leuprorelin), *J. Contr. Rel.* 40 (1996) 269 - 276
- 190 D. Schulz, Diplomarbeit, MLU Halle-Wittenberg, Halle/S. 1999
- 191 G. Crotts, H. Sah, T.G. Park, Adsorption determines in-vitro protein release rate from biodegradable microspheres: quantitative analysis of surface area during degradation, *J. Contr. Rel.* 47 (1997) 101 - 111
- 192 P. Quellec, R. Gref, L. Perrin, E. Dellacherie, F. Sommer, J.M. Verbavatz, M.J. Alonso, Protein encapsulation within polyethylene glycol-coated nanospheres. I. Physicochemical characterization. *J. Biomed. Mater. Res.* 42 (1998) 45 - 54
- 193 J.P. Wan, Y.Y. Yang, S. Ng, T.S. Chung, J. Heller, Properties and release profiles of POE-PEG-POE triblock copolymer microspheres, *Proceed. Symp.* 27 (2000) *Contr. Rel. Soc., Inc.*
- 194 R. Bodmeier, H. Chen, Evaluation of biodegradable poly(lactide) pellets prepared by direct compression. *J Pharm. Sci.* 78 (1989) 819 - 822
- 195 T. Remmele, Wirkstoffbeladung und Freigabeeigenschaften von Polylaktid-Implantaten. Dissertation Universität Heidelberg 1989
- 196 A. Brunner, Bioabbaubare Polymere als Träger von Peptid-Arzneistoffen. Dissertation Universität Erlangen-Nürnberg 1998
- 197 C. Lucas, Herstellung, in vitro und in vivo Prüfung parenteraler Depotarzneiformen aus Polylactid und Polylactid-co-trimethylencarbonat. Dissertation Universität Heidelberg 1998
- 198 A.K. Hannig, Diplomarbeit Freie Universität Berlin 1990

- 199 Patent Nr. DE 197 01 912
- 200 R.A. Jain, C.T. Rhodes, A.M. Railkar, A.W. Malick, N.H. Shah, Controlled release of drugs from injectable in situ formed biodegradable PLGA microspheres: effect of various formulation variables. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 50 (2000) 257 - 262
- 201 J. Salbeck, T. Fuhrmann, *Physik und Chemie der Makromoleküle: Theorien zum Glasübergang*, Publikation Universität Kassel 2002
- 202 "Protocol for preparing Simulated Body Fluid (SBF)", Department of Material Chemistry, Graduate School of Engineering, Kyoto University, www.kuic.kyoto-u.ac.jp/others/SBF
- 203 K.A. Athanasiou, G.G. Niederauer, C.M. Agrawal, Sterilization, toxicity, biocompatibility and clinical applications of polylactic acid/ polyglycolic acid copolymers, *Biomater.* 17 (1996) 93 - 102
- 204 F.H. Furkert, A validated test for sterility of microparticles made of polylactid-co-glycolide, *Pharm. Ind.* 60 (1998) 905 - 907
- 205 M. Pfeifer, S. Fricke, K. Pawlik, Effect of standard sterilization techniques on molecular and release properties of a parenteral depot formulation containing poly(D,L-lactide-co-glycolide), 4th World Meeting APV/APGI, Florenz April 2002
- 206 S. Fricke, M. Pfeifer, E. Kleemann, First experiences with alternative sterilization techniques for biodegradable parenterals, 4th World Meeting APV/APGI, Florenz April 2002

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Verzeichnis der Abbildungen

<u>Abb.-Nr.</u>	<u>Titel</u>	<u>Seite</u>
1	Synthese von Polylactiden durch direkte Polykondensation	4
2	Synthese von Polylactiden durch Ringöffnungspolymerisation	4
3	Freisetzung und Abbau von parenteralen Depotarzneiformen auf Basis bioabbaubarer Polymere, schematisch unter Berücksichtigung von Literaturangaben	11
4	Einfluß von Wasser- und Wirkstoffdiffusion, Erosionsgeschwindigkeit und Quellungsverhalten des Polymers auf den Freisetzungsmechanismus aus einer parenteralen Depotarzneiform	12
5	Grundtypen modulierter Polylactide, die als Ergebnis des gewählten Synthesekonzepts zu erwarten waren	20
6	FT-RAMAN-Spektrum jeweils eines für den Polymertyp A1 repräsentativen Poly-L-lactids JP 18 und eines Poly-D,L-lactids JP 20	27
7	FT-RAMAN-Spektrum eines für den Polymertyp A2 repräsentativen Poly-L-lactids JP 52	27
8	FT-RAMAN-Spektren jeweils eines für den Polymertyp A3 repräsentativen Poly-L-lactids JP 167 und eines Poly-D,L-lactids JP 168	28
9	FT-RAMAN-Spektren jeweils eines für den Polymertyp B repräsentativen Poly-L-lactids JP 72 und eines Poly-D,L-lactids JP 65	28
10	FT-RAMAN-Spektren der vergleichsweise untersuchten kommerziellen Polylactide der Fa. Boehringer Ingelheim L 104, R 202 H, RG 503 H und RG 752	29
11	Pulverdiffraktogramm Probe JP 66 mit amorpher Struktur	30
12	Pulverdiffraktogramm der Probe JP 16 mit kristalliner Struktur	30
13	Kristalline Anteile der Polymere in Abhängigkeit von der Molmasse	32
14	DSC-Kurve des Polylactids JP 21 (1. Heizen)	33
15	DSC-Kurve des Polylactids JP 21 (2. Heizen)	34
16	DSC-Kurve des Polylactids JP 68 (1. Heizen)	35
17	DSC-Kurve des Polylactids JP 68 (2. Heizen)	35

<u>Abb.-Nr.</u>	<u>Titel</u>	<u>Seite</u>
18	Darstellung der Abhängigkeit des Schmelzpunktes, der Rekristallisation und des Glasübergangs von der Molmasse am Beispiel der modulierten Poly-L-lactide vom Typ A1	38
19	Darstellung der Abhängigkeit des Schmelzpunktes, der Rekristallisation und des Glasübergangs von der Molmasse am Beispiel der modulierten Poly-L-lactide vom Typ A2	39
20	Darstellung der Abhängigkeit des Schmelzpunktes, der Rekristallisation und des Glasübergangs von der Molmasse am Beispiel der modulierten Polylactide vom Typ B	39
21	Darstellung der Abhängigkeit der Glasübergangstemperatur von der Molmasse am Beispiel der modulierten Poly-L-lactide der Typen A2 und C	40
22	Darstellung des Schmelzpunktes, der Rekristallisation und des Glasübergangs für Polylactide verschiedenen Typs	41
23	Maximal spritzbare Konzentration der Polylactide JP 62, JP 64 – 68 vom Typ B und deren Abhängigkeit von der Molmasse	44
24	Zeitprofile für eine kumulative Freisetzung	46
25	Gehalt von Cytochrom C in dem verwendeten Freisetzungsmedium in Abhängigkeit von der Zeit	47
26	Freisetzung von Cytochrom C aus gepreßten Implantaten auf Basis Polylactiden der Fa. Boehringer Ingelheim	50
27	Freisetzung von Cytochrom C aus gepreßten Implantaten vom Typ A1	52
28	Freisetzung von Cytochrom C aus gepreßten Implantaten vom Typ A2	53
29	Freisetzung von Cytochrom C aus gepreßten Implantaten vom Typ A3	54
30	Freisetzung von Cytochrom C aus gepreßten Implantaten vom Typ B	55
31	Abhängigkeit der kumulativen Freisetzung von der Molmasse der Polylactide vom Typ B	56
32	Freisetzung von Cytochrom C aus gepreßten Implantaten vom Typ C	57
33	Freisetzung von Cytochrom C aus gepreßten Implantaten mit einer Kettenlänge von 80 WE/OH	58

<u>Abb.-Nr.</u>	<u>Titel</u>	<u>Seite</u>
34	Freisetzung von Cytochrom C aus gepreßten Implantaten mit einer Kettenlänge von 160 WE/OH	59
35	Freisetzung von Cytochrom C aus gepreßten Implantaten mit einer Kettenlänge von 40 WE/OH	60
36	Freisetzung von Cytochrom C aus in situ geformten Implantaten mit Polylactiden der Fa. Boehringer Ingelheim	63
37	Freisetzung von Cytochrom C aus in situ geformten Implantaten mit modulierten Polylactiden vom Typ A1	65
38	Freisetzung von Cytochrom C aus in situ geformten Implantaten mit modulierten Polylactiden vom Typ A2, gelöst in modulierten Oligolactiden vom Typ A1	66
39	Freisetzung von Cytochrom C aus in situ geformten Implantaten mit modulierten Polylactiden vom Typ A3	67
40	Freisetzung von Cytochrom C aus in situ geformten Implantaten mit modulierten Polylactiden vom Typ B	68
41	Freisetzung von Cytochrom C aus in situ geformten Implantaten mit modulierten Polylactiden vom Typ C	69
42	Freisetzung von Cytochrom C aus in situ geformten Implantaten mit modulierten Polylactid-co-glycoliden vom Typ C	70
43	Freisetzung von Cytochrom C aus in situ geformten Implantaten mit dem modulierten Polylactid JP 67 vom Typ B	71
44	Freisetzung von Cytochrom C aus in situ geformten Implantaten mit dem modulierten Polylactid JP 170 vom Typ A3	72
45	Freisetzung von Cytochrom C aus in situ geformten Implantaten mit 20 WE/OH	73
46	Freisetzung von Cytochrom C aus in situ geformten Implantaten mit 40 WE/OH	74
47	Glasübergangstemperaturen und kumulative Freisetzung nach 48 Stunden der modulierten Polylactide JP 66, JP 67 und JP 68	79
48	Gewichtsverlust von JP 101 und JP 5 während des hydrolytischen Abbaus im SBF	80
49	Gewichtsverlust von modulierten Polylactiden unterschiedlichen Typs im SBF	81

<u>Abb.-Nr.</u>	<u>Titel</u>	<u>Seite</u>
50	Wasseraufnahme von JP 53 und JP 37 vom Typ A2 im SBF	82
51	Gewichtsverlust und Wasseraufnahme von zwei modulierten Polylactiden vom Typ A2 im SBF	83
52	Synthese von Oligo- bzw. Polylactiden, ausgehend von einwertigen Alkoholen als Starter für die Ringöffnungspolymerisation	87
53	Synthese von Oligo- bzw. Polylactiden mit Propan-1,2-diol als Starter für die Ringöffnungspolymerisation	88
54	Synthese von Oligo- bzw. Polylactiden mit einem Triol als Starter für die Ringöffnungspolymerisation	89
55	Einbringen der in situ geformten Implantate in das FreisetzungsmEDIUM	95

Verzeichnis der Tabellen

<u>Tab.-Nr.</u>	<u>Titel</u>	<u>Seite</u>
1	Wirkstoffe und Handelsnamen parenteraler Depotarzneiformen verschiedener Hersteller, die auf bioabbaubaren Polymeren basieren	3
2	Möglichkeiten der Arzneiformung auf Basis bioabbaubarer Polymere	9
3	Eigenschaften der synthetisierten Oligo- und Polylactide vom Typ A1	23
4	Eigenschaften der synthetisierten Oligo- und Polylactide vom Typ A2	23
5	Eigenschaften der synthetisierten Oligo- und Polylactide vom Typ A3	24
6	Eigenschaften der synthetisierten Oligo- und Polylactiden vom Typ B	24
7	Eigenschaften der synthetisierten Oligo- und Polylactiden vom Typ C	25
8	Ermittelte FT-RAMAN Banden für die untersuchten modulierten und kommerziell verfügbaren Polylactide und Zuordnung der funktionellen Gruppen entsprechend der Literatur	26
9	Kristallinität der untersuchten Polylactide (Röntgendiffraktometrie, Bezug L 104 = 100%, RG 752 = 0 %)	31
10	Übersicht wesentlicher DSC-Daten der Polylactide vom Typ A1	36
11	Übersicht wesentlicher DSC-Daten der Polylactide vom Typ A2	36
12	Übersicht wesentlicher DSC-Daten der Polylactide vom Typ A3	36
13	Übersicht wesentlicher DSC-Daten der Polylactide vom Typ B	37
14	Übersicht wesentlicher DSC-Daten der Polylactide vom Typ C	37

<u>Tab.-Nr.</u>	<u>Titel</u>	<u>Seite</u>
15	Übersicht wesentlicher DSC-Daten kommerziell verfügbarer Polylactide der Fa. Boehringer Ingelheim	37
16	Maximal lösbare Konzentration der Polylactide, maximal spritzbare Konzentration und In-situ-Implantatbildung der erhaltenen Lösungen	42
17	Orientierende Zielkriterien für die kumulative Freisetzung von Cytochrom C pro Zeiteinheit	46
18	Bioabbaubare Polymere der Firma Boehringer Ingelheim und ausgewählte physiko-chemische Eigenschaften	86
19	Sonstige Substanzen, Hersteller, Qualität und Ch.-B.	89
20	Ergebnisse der Mischungen von amorpher und kristalliner Probe zur Bestimmung der kristallinen Anteile	92

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Christoph Völkel
Geburtsdatum: 24. Dezember 1968
Geburtsort: Leipzig
Familienstand: ledig

Schulbildung:

1975 - 1985 Polytechnische Oberschule Bad Dürrenberg bzw.
Querfurt
1985 - 1987 Erweiterte Oberschule Querfurt
Abschluß: Abitur (Note: 1,0)

Studium:

1990 Famulatur in Halle/S. und Querfurt
1990 - 1995 Pharmazie-Studium in Halle/S.
1995: Diplom, Thema: "Untersuchungen des
Einflusses des Ordnungsgrades auf den Hautdurchtritt
von Steroid-Hormonen" (Note: sehr gut)
1995: Approbation

Berufstätigkeit:

seit 1995 Wissenschaftlicher Mitarbeiter in der
Pharmazeutischen Forschung und Entwicklung der
Jenapharm GmbH
2000 Arbeitsgruppenleiter in der Pharmazeutischen
Entwicklung der Schering AG Berlin im Rahmen eines
Personalaustauschs
seit 2001 Fachgruppenleiter Klinische Prüfpräparate der
Jenapharm GmbH & Co. KG

Erklärung

Hiermit erkläre ich gemäß § 5 (2) b) der Promotionsordnung der Fakultät, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfaßt habe und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Christoph Völkel