

**Wirkstofffreisetzung aus porösen biodegradierbaren
Polyestern Polyglycolid (PGA) und
Poly-D,L-lactid (PDLA)**

Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades rer. nat.
des Fachbereichs Chemie
der Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von

**Andrey Kovalchuk
aus Magadan**

Essen 2005

**Institut für Anorganische Chemie
der Universität Duisburg-Essen**

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von März 2002 bis September 2004 am Lehrstuhl für Anorganische Chemie I, Arbeitskreis Prof. Dr. Matthias Epple (Festkörperchemie), an der Ruhr-Universität Bochum und in der Zeit von Oktober 2004 bis März 2005 am Institut für Anorganische Chemie, Arbeitskreis Prof. Dr. Matthias Epple, an der Universität Duisburg-Essen angefertigt.

Tag der mündlichen Prüfung: 13 Juli 2005

Vorsitzender: Prof. Dr. C. Mayer

1. Gutachter: Prof. Dr. M. Epple

2. Gutachter: Prof. Dr. M. Ulbricht

Inhaltsverzeichnis

A	EINLEITUNG	1
A.I	GRUNDLAGEN	1
A.II	VERWENDUNG VON BIODEGRADIERBAREN POLYMEREN ZUR KONTROLLIERTEN WIRKSTOFFFREISETZUNG	3
A.III	BIODEGRADIERBARE POLYESTER: POLYGLYCOLID (PGA) UND POLY-D,L-LACTID (PDLLA) DURCH FESTKÖRPERCHEMISCHE POLYMERISATIONSREAKTIONEN	10
A.IV	ZIELSETZUNG	12
B	SYNTHESE PORÖSER BIODEGRADIERBARER POLYESTER: POLYGLYCOLID (PGA) UND POLY-D,L-LACTID (PDLLA)	16
B.I	GRUNDLAGEN	16
B.II	PRÄPARATIVE ARBEITEN	19
B.III	ERGEBNISSE	23
C	FREISETZUNG AUS UNIAXIAL GEPRESSTEN FORMKÖRPERN	29
C.I	GRUNDLAGEN	29
C.II	PRÄPARATIVE ARBEITEN	32
C.III	ERGEBNISSE	36
C.IV	UNTERSUCHUNG DER ABHÄNGIGKEIT DER FREISETZUNGSKINETIK VOM HERSTELLUNGSDRUCK	44
D	FREISETZUNG AUS EXTRUDIERTEN FORMKÖRPERN	48
D.I	GRUNDLAGEN	48

D.II	PRÄPARATIVE ARBEITEN	49
D.III	ERGEBNISSE	53
D.IV	VERSUCHE ZUR HERSTELLUNG EIGENER IMPLANTATE	71
E	ANDERE ARBEITEN AUF DEN GEBIETEN WIRKSTOFFFREISETZUNG UND BIODEGRADIERBARE POLYESTER	74
E.I	ANALYSE UND AUFREINIGUNGSVERSUCHE DES POLYMERS RESOMER[®] RG95:5H VON BOEHRINGER (PLGA 95:5)	74
E.II	UNTERSUCHUNG DER ZOLADEX-IMPLANTATE MITTELS ¹H-NMR	83
E.III	TG-DTA-IR – UNTERSUCHUNG DES ANTIINSEKTENPFLASTERS HANSAPLAST[®]	85
E.IV	TG-DTA-IR – UNTERSUCHUNG DES KLEBSTOFFS „MA 73A“	87
F	LITERATURVERZEICHNIS	92
G	ZUSAMMENFASSUNG	99
H	ANHANG	105
H.I	EINGESETZTE GERÄTE	105
H.II	SICHERHEIT UND ENTSORGUNG	107
H.III	VERWENDETE ABKÜRZUNGEN	111
H.IV	VERÖFFENTLICHUNGEN	112
H.V	LEBENS LAUF	113
H.VI	DANK	114
H.VII	EIDESSTÄTTLICHE ERKLÄRUNGEN	115

A Einleitung

A.I Grundlagen

Das Interesse an biodegradierbaren Polymeren zum Zweck der zeitbeschränkten therapeutischen Verwendung in Medizin, Chirurgie und Wirkstofffreisetzung steigt ständig. Die Grundvoraussetzungen für solche Materialien sind Biokompatibilität, Ungiftigkeit, gute Verarbeitungsmöglichkeiten und schneller Metabolismus der Degradationsprodukte. In dieser Hinsicht erwiesen sich die aliphatischen Polyester als eine der passenden Klassen organischer Verbindungen.^[1] Innerhalb dieser Stoffklasse gehören die Polymere auf der Basis von Milchsäure (Polylactid, PLA), Glycolsäure (Polyglycolid, PGA) und ihrer Copolymere (Poly(lactid-*co*-glycolid), PLGA) zu den wichtigsten Verbindungen (Abbildung A.1).^[2-5] Diese vielseitigen Materialien werden für Knochenchirurgie, Nahtsetzung, Implantate, Verbandstoffe, Landwirtschaft und vieles mehr verwendet.^[4,6-8] Am häufigsten werden sie zur Herstellung bioresorbierbarer Implantate und für Systeme zur kontrollierten Wirkstofffreisetzung eingesetzt. Diese Systeme stellen meistens eine Polymermatrix mit eingeschlossenem Wirkstoff dar. Wird ein derartiges Polymersystem in einen Organismus (je nach seiner Größe) implantiert oder eingespritzt, tritt es in Wechselwirkungen mit Körperflüssigkeiten. Die Polymermatrix degradiert langsam unter Bildung von ungefährlichen Monomeren: Hydroxyessigsäure aus Polyglycolid, 2-Hydroxypropionsäure (Milchsäure) aus Polylactid und die beiden Säuren aus Poly(lactid-*co*-glycolid) (Abbildung A.2).^[2,9,10] Die Degradation erfolgt durch eine hydrolytische Reaktion^[6] und durch enzymatische Katalyse.^[11] Während die Polymermatrix zersetzt wird, wird der in ihrem Inneren eingeschlossene Wirkstoff langsam an die Umgebung abgegeben. Somit wird der Organismus mit dem Wirkstoff über einen langen Zeitraum versorgt. Diese Verabreichungsmethode ist besonders nützlich für Therapien mit hochwirksamen Wirkstoffen

(z. B. für die Hormontherapie), deren Wirkung optimal bei sehr geringen Konzentrationen ist und sich über eine lange Zeit erstrecken muss. Eine Verabreichung von solchen Wirkstoffen durch übliche Methoden (Einspritzen oder Einnehmen) ist entweder zu uneffektiv oder kann zum Auftreten unerwünschter Nebenwirkungen führen.

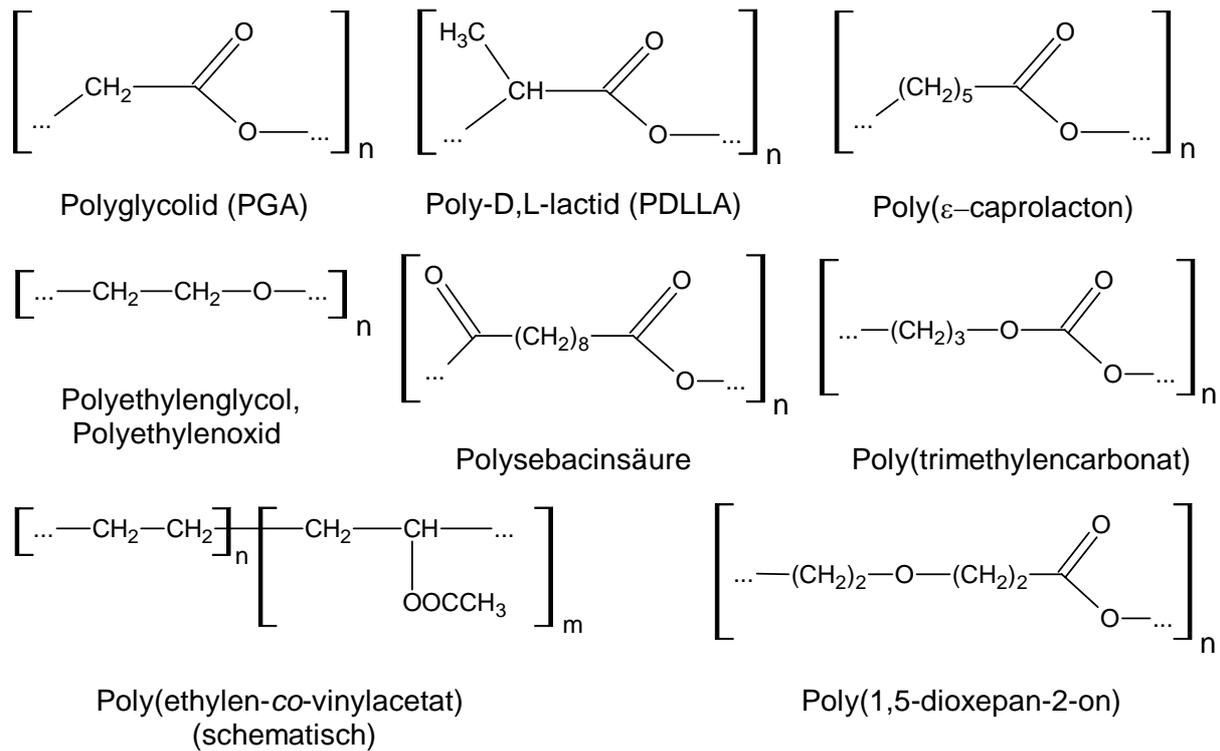


Abbildung A.1. Beispiele von biodegradierbaren Polymeren, die für die kontrollierte Wirkstofffreisetzung verwendet werden.

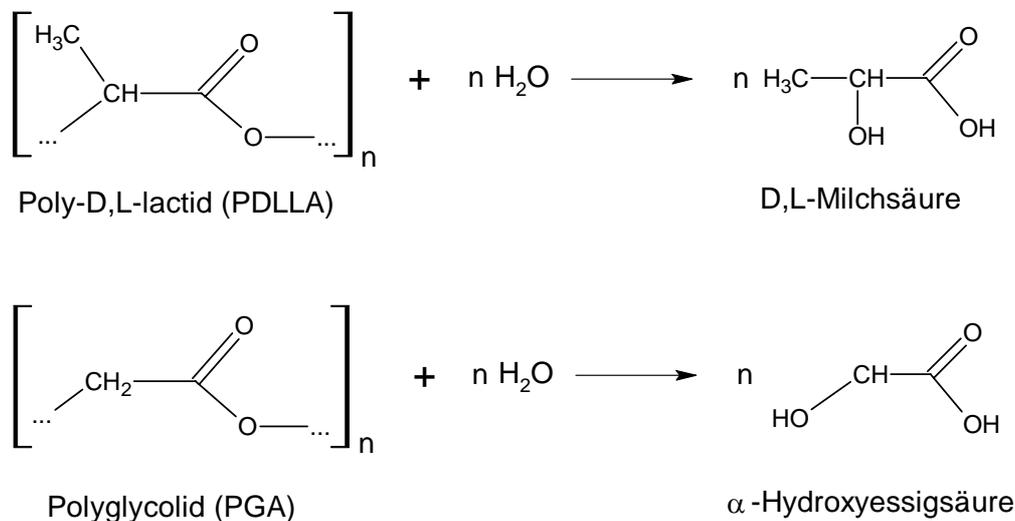


Abbildung A.2. Schematische Darstellung hydrolytischer Degradation von Poly-D,L-lactid und Polyglycolid.

Außer PGA und PLA werden in der Medizintechnik auch andere Makromoleküle als reine Polymere oder als ein Bestandteil eines Copolymers verwendet, z. B. (siehe auch Abbildung A.1):

- natürliche biodegradierbare Polymere und Makromoleküle wie *bovine serum albumin* (BSA), *human serum albumin* (HSA), Kollagen, Gelatine, Hämoglobin;^[12]
- Polycaprolacton (PCL);^[13-17]
- Polyethylenglycol (PEG), wird auch Polyethylenoxid genannt, da es aus Ethylenoxid hergestellt wird;^[18-27]
- Polysebacinsäure;^[28]
- Poly(trimethylencarbonat);^[14]
- Poly(ethylen-*co*-vinylacetat);^[28]
- Poly(1,5-dioxipan-2-on).^[29]

A.II Verwendung von biodegradierbaren Polymeren zur kontrollierten Wirkstofffreisetzung

In vielen Untersuchungen bezüglich Wirkstofffreisetzung aus biodegradierbaren Polymeren werden sogenannte Mikrokapseln verwendet. Sie haben den Vorteil, dass sie sich aufgrund ihrer geringen Größe (<250 µm) in Form einer Dispersion relativ einfach verabreichen lassen. Es gibt einige weit verbreitete Methoden zur Herstellung der Mikrokapseln.

Single emulsion process (Öl-Wasser, o/w). Ein Polymer wird in einem mit Wasser nicht mischbaren und flüchtigen Lösungsmittel gelöst (wie z.B. in Dichlormethan CH₂Cl₂). Ein Wirkstoff wird der Lösung zugefügt. Wenn sich dabei eine Dispersion bildet, so soll die Partikelgröße <20 µm sein.^[30] Danach wird die Lösung (bzw. Dispersion) in einem größeren Volumen Wasser im Gegenwart eines Tensids (z.B. Polyvinylalkohol) emulgiert. Das organische

Lösungsmittel wird entweder durch Verdunstung oder durch Extraktion entfernt.^[31] Die auf diese Weise erhaltenen Mikrokapseln werden gewaschen, filtriert und durchgesiebt oder zentrifugiert, getrocknet oder lyophilisiert. Eine sehr schnelle Verdunstung des Lösungsmittels kann zu „Explosionen“ innerhalb der Mikrosphären und zur Bildung poröser Strukturen führen. Durch die Entfernung des Lösungsmittels mittels Extraktion erhält man auch poröse Kapseln. Durch Variation der Polymerkonzentration und der Vermischungsgeschwindigkeit kann man die Mikrokapseln in verschiedenen Größen erhalten (500 nm-30 µm).

Dieses Verfahren ist aber für wasserlösliche Wirkstoffe nicht gut geeignet.^[32,33] Das führt zu einem nicht vollständigen Einschluss des Wirkstoffes in die Mikrokapseln und zu einem sehr starken „burst effect“ (so wird die erhöhte Freisetzungsrates zu Beginn der Freisetzung genannt).^[12] Dafür wurde die Methode der „Öl in Öl“ Emulsion vorgeschlagen.^[12,34,35] In einem wasserlöslichen organischen Lösungsmittel (z.B. Acetonitril, CH₃CN) werden ein Wirkstoff und ein Polymer (PLGA oder PLA) gelöst. Diese Lösung wird danach in einem Öl (z.B. Mineralöl) in der Gegenwart eines Tensids dispergiert. Die Mikrokapseln erhält man durch Verdunstung oder Extraktion des organischen Lösungsmittels. Das Öl wird anschließend mit einem anderen Lösungsmittel wie z.B. Hexan ausgewaschen.

Double (multiple) emulsion process (Wasser-Öl-Wasser, w/o/w). Dieser Prozess ist für wasserlösliche Wirkstoffe wie Proteine, Peptide besonders gut geeignet, im Unterschied zum o/w-Prozess, der für hydrophobe Wirkstoffe wie Steroide geeignet ist.^[12,30,36] Eine wässrige Lösung eines Wirkstoffes, manchmal mit einem stabilisierenden oder verdickenden Protein (z.B. Gelatine), wird zur Lösung eines Polymers in CH₂Cl₂ hinzugefügt und intensiv gerührt. Dieser Emulsion wird ein großes Volumen Wasser-Tensidgemisch zugefügt, damit sich eine „w/o/w“-Emulsion bildet. Das organische Lösungsmittel wird entweder durch Verdunstung oder durch Extraktion entfernt. Die Mikrokapseln werden gewaschen und filtriert, durchgesiebt oder zentrifugiert, getrocknet oder lyophilisiert. Durch Variation der Polymerkonzentration und der

Vermischungsgeschwindigkeit kann man die Mikrokapseln in verschiedenen Größen erhalten (500 nm-30 μm).

Der Prozess der Phasentrennung.^[37] Das Trägerpolymer löst man in einem organischen Lösungsmittel. Wasserlösliche Wirkstoffe werden in Wasser gelöst und in der Polymerlösung dispergiert. Hydrophobe Wirkstoffe werden in der Polymerlösung gelöst oder ggf. dispergiert. Dann fügt man ein anderes Lösungsmittel hinzu, um die Löslichkeit des Polymers wesentlich zu verringern (z.B. Siliconöl, Pflanzenöl, flüssiges Paraffin, flüssiges Polybutadien). Das Polymer bildet sehr weiche Mikrokapseln. Dieses System wird in ein großes Volumen eines anderen Lösungsmittels gegossen, damit sich die Tropfen verhärten (z.B. Hexan, Heptan, Petrolether). Dieser Prozess ist sowohl für wasserlösliche als auch für wasserunlösliche Wirkstoffe geeignet. Für das organische Erstlösungsmittel kommen folgende Verbindungen zur Anwendung: Dichlormethan, Acetonitril, Ethylacetat oder Toluol.

Die Methode der „Aerosol-Trocknung“. Ein Wirkstoff wird in einer PLA (oder PLGA)/ CH_2Cl_2 -Lösung gelöst (ggf. dispergiert) und in Aerosolform versprüht. Das Aerosol trocknet und die Mikrokapseln bilden sich mit einer Größe $<5 \mu\text{m}$.^[38]

Im Körper erfolgt die Freisetzung des Wirkstoffes durch Diffusion und die langsame Degradation der Mikrokapseln. Durch Variation der verwendeten Polymere sowie der Herstellungsbedingungen lassen sich die Degradationsverhalten und somit die Freisetzungsraten variieren.^[39] Ein Nachteil dieses Systems ist die Notwendigkeit der Verwendung von organischen Lösungsmitteln (Chloroform, Dichlormethan) während der Herstellung.^[40] Ein weiteres häufig auftretendes Problem ist die Freisetzung des Wirkstoffes in mehreren Phasen aufgrund eines heterogenen Degradationsmechanismus innerhalb der Mikrokapseln.^[41]

Typischerweise erfolgt die Freisetzung des jeweiligen Wirkstoffes in drei Phasen^[42]: einer erhöhten initialen Freisetzung, gefolgt von einer Phase mit verringerter Freisetzungsraten und schließlich einer degradationsgesteuerten Abgabe. Die erhöhte Freisetzungsraten zu Beginn wird

besonders häufig beobachtet und als „burst effect“ bezeichnet.^[43,44] Dieser Effekt beruht auf der Freisetzung von oberflächennah gebundenen Wirkstoffen und ist in hohem Maße vom Anteil des eingebrachten Wirkstoffes (dem Beladungsgrad) abhängig.^[45] Im Verlauf der zweiten Phase mit verringerter Freisetzungsrage beginnt die Degradation des Polymers. Die mittlere Molmasse nimmt deutlich ab, erlaubt aber noch keine verstärkte Diffusion des Wirkstoffes aus der noch intakten Mikrosphäre. In der dritten Phase ist die Molmasse des Polymers so stark gesunken, dass es partiell gelöst wird und erodiert. Im Verlauf der Erosion des Polymers erhöht sich die Freisetzungsrage wieder.^[46]

Nanopartikel vom Typus „Kern-Schale“ (*core-shell nanoparticles*). Die Verwendung von PLA-Polymeren sowie Copolymeren mit hohem PLA-Anteil wird durch ihre Brüchigkeit und Hydrophobizität beschränkt. Diese Eigenschaften können durch Copolymerisation mit Polyethylenglycol (PEG) verbessert werden. PEG ist ein typisches hydrophiles Polymer, das für Anwendungen innerhalb des menschlichen Körpers zugelassen wurde.^[47] Niedermolekulares PEG wird leicht durch die Nieren aus dem Organismus ausgeschieden. Da sich herausgestellt hat, dass die PLA-PEG-Copolymere eine breite Anwendung finden könnten, wurden einige fundamentale Untersuchungen zu ihren Eigenschaften und zur Synthese durchgeführt.^[47-55] Üblicherweise werden PLA-PEG Copolymere durch ringöffnende Polymerisation von zyklischem Dilactid mit Monomethoxy-PEG hergestellt (Abbildung A.3).^[47]

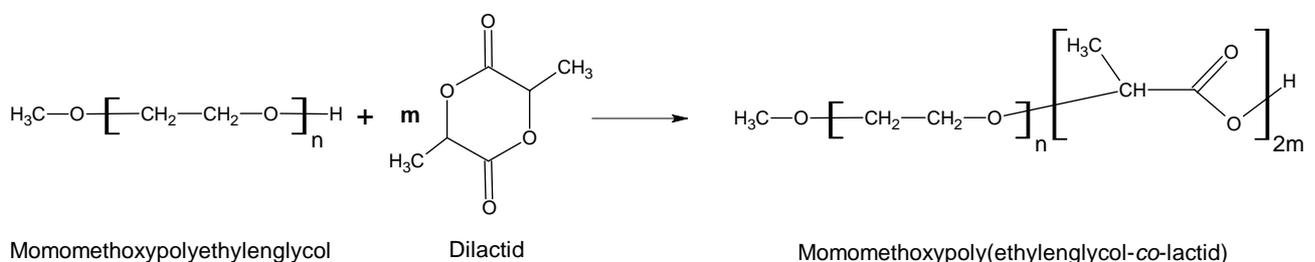


Abbildung A.3. Herstellung von amphiphilen Polyethylenglycol-Polylactid Block-Copolymeren (schematisch).

An einem Ende des Monomethoxy-PEG Moleküls befindet sich eine Methoxygruppe, somit ist eine weitere Polymerisation an diesem Ende ausgeschlossen. Die Anlagerung von Dilactid erfolgt nur an einem Ende des Moleküls. Es entsteht ein sogenanntes Block-Copolymer, in dem die Polymerketten aus den unterschiedlichen Monomeren nur eine bestimmte Stelle im Polymermolekül einnehmen. Wegen ihrer amphiphilen Natur können die PLA-PEG Copolymere je nach Länge der PLA- und PEG-Ketten und ihren Verhältnissen in wässrigen Lösungen in verschiedenen Phasen auftreten. Die Konformation der Moleküle verändert sich in der Art, dass der hydrophobe PLA-Teil vom hydrophilen PEG-Teil abgeschirmt wird. So entstehen „Kern-Schale“ Nanopartikel, in denen der PLA-Teil den hydrophoben Kern und der PEG-Teil die hydrophile Schale (auf der Oberfläche) bilden.^[56,57] Unter geeigneten Bedingungen können sich die Nanopartikel zu Mizellen und andere Aggregate vereinigen.^[58-61] Die „Kern-Schale“ Nanopartikeln wurden als Wirkstoffträger vorgeschlagen, da der hydrophobe Kern die Einschließung von hydrophoben Stoffen ermöglicht.^[56,58-66] Die hydrophile Schale sollte außerdem die PLA-Fragmente vor schneller hydrolytischer Degradation schützen. Wie die Untersuchungen zur Wirkstofffreisetzung aus Nanopartikeln zeigten, ist die Freisetzungsdauer vermutlich wegen der kleinen Größe (ca. 50 nm im Durchmesser) relativ kurz und beträgt nicht mehr als fünf Tage. Am Anfang der Freisetzung wird ein starker „burst effect“ beobachtet.^[26,27] Die Herstellung größerer wirkstoffbeladener Implantate wird häufig durch ein gemeinsames Extrudieren von Polymer und Wirkstoff erreicht. Die Freisetzung erfolgt je nach Größe des Moleküls entweder durch Diffusion des Wirkstoffes aus der Polymermatrix oder aufgrund von Degradation und Erosion des Polymerträgermaterials. Der wichtigste Aspekt bei der Herstellung von Wirkstoffträgern auf der Basis resorbierbarer Implantate ist die Art der Beladung. Die einfachste Methode der Herstellung ist das gemeinsame Verpressen einer homogenen Pulvermischung des Polymers mit dem einzubringenden Wirkstoff unter hohem Druck.^[67]

Weitere vielfach verwendete Methoden sind das Schmelzpressen oder Extrudieren von Polymer/Wirkstoff-Mischungen zu den gewünschten Implantatformen.^[68,69]

Einen entscheidenden Einfluss auf die Freisetzungskinetik hat neben der Art des verwendeten Polymers auch der Mengenanteil des Wirkstoffes (Beladungsgrad). Im Allgemeinen führt eine Steigerung der Beladung zu einer Erhöhung der initialen Freisetzung und im weiteren Verlauf zu einer gesteigerten Freisetzungsrate. Ein Nachteil der üblichen polymertechnischen Verarbeitungsmethoden ist die thermische Belastung des Wirkstoffes während der Fertigung, da die Prozesstemperaturen während des Extrudierens für die häufig verwendeten Poly(lactid-co-glycolid)-Copolymere zwischen 70 und 90° C liegen.^[70] Solche Verfahren eignen sich somit nur für die Verarbeitung von thermisch stabilen Wirkstoffen.

Um auch thermisch instabile Stoffe in Implantate einbringen zu können, muss entweder ein Polymer mit einer sehr niedrigen Schmelz- bzw. Glasübergangstemperatur gewählt werden (z.B. PDLA), oder die Beladungsmethode muss im Hinblick auf die Prozesstemperaturen optimiert werden. Ein hierfür geeignetes Verfahren ist z.B. die Beladung durch gemeinsames Lösen von Wirkstoff und Polymer in einem Lösungsmittel (z.B. Dichlormethan oder Eisessig) und anschließender Gefriertrocknung. Eine Variante dieser Methode verwendet überkritisches Kohlendioxid als Lösungsmittel.^[71] Als Produkt erhält man einen porösen Polymerformkörper, in dem der Wirkstoff weitgehend homogen verteilt ist. Die Untersuchungen zur Freisetzungskinetik zeigen, dass solche porösen Formkörper aufgrund ihrer großen Oberfläche zu einem starken „burst effect“ und zu einer relativ kurzen Freisetzungsdauer neigen.^[72,73]

Eine weitere Formgebung zur Minimierung der Oberfläche ist somit meist nötig, um eine relativ gleichmäßige Freisetzung zu erzielen. In der Regel erfolgt dies durch das Verpressen bei hohen Drücken und möglichst geringen Temperaturen.^[74]

***In situ* entstehende Freisetzungskörper.**^[75,76] Eine Lösung (oder eine Dispersion) wird subkutan oder intramuskulär eingespritzt und verhärtet sich *in situ*. Um das zu erzielen, löst man

PLA (oder PLGA) in einem wasserlöslichen biokompatiblen Lösungsmittel unter Erwärmung (70° C), die Lösung lässt man dann an Luft abkühlen. Als Lösungsmittel werden Glycerintriacetat, Triethylcitrat,^[75] N-Methyl-2-pyrrolidon^[76] verwendet. Zur Einbringung eines Wirkstoffes wurden je nach Wirkstoff verschiedene Verfahren entwickelt: Lösen oder Dispergieren des Wirkstoffes in der Polymer-Lösung; Lösen des Wirkstoffes in einem anderen Lösungsmittel (z. B. Propylenglycol^[75]) und Emulgieren in der Lösung des Polymers. Wird die Lösung (oder Dispersion, Emulsion) in den Körper eingespritzt, so begegnet sie der physiologischen Flüssigkeit und bildet ein Gel. Das Lösungsmittel wird infolge seiner Wasserlöslichkeit ausgewaschen und ein Freisetzungskörper bildet sich.^[76] Wirkstofffreisetzungsdauern von solchen Freisetzungskörpern sind im hohen Maße von eingebrachtem Wirkstoff und von der Konzentration des Polymers im entstehenden Gel abhängig.^[75]

Bei Verwendung der biodegradierbaren Implantate aus PGA, PLA und PLGA zur Knochenheilung ergibt sich das Problem einer lokalen pH-Verringerung am Ort der Implantation, da sich α -Hydroxysäuren während der Degradation der biodegradierbaren Polymere im Körper bilden. Die Abbauprodukte können mit dem Blutkreislauf nicht ausgewaschen werden und der lokale pH-Wert kann ein schädigendes Niveau erreichen. Um den pH-Wert in physiologisch annehmbaren Grenzen beizubehalten, werden den Implantaten manchmal basische Salze während der Herstellung zugesetzt (z.B. Calciumcarbonat, Hydroxylapatit, Natriumhydrogencarbonat). Calciumcarbonat ist in der Lage, den pH-Wert neun Wochen lang im Bereich zwischen 6,3 und 7,4 zu halten.^[9] Sehr gute Ergebnisse wurden auch in Studien mit amorphem Calciumphosphat erzielt, das außerdem eine hervorragende Biokompatibilität aufwies.^[77]

A.III Biodegradierbare Polyester: Polyglycolid (PGA) und Poly-D,L-lactid (PDLLA) durch festkörperchemische Polymerisationsreaktionen

Herkömmlich werden biodegradierbare Polyester PGA, PLLA und PLGA durch Polymerisationsreaktionen in flüssiger Phase aus den zyklischen Dimeren Diglycolid, Dilactid und ihren Gemischen gewonnen (Abbildung A.4).^[78] Dennoch stellt die Einbringung von einem Wirkstoff in diese Polymerträgermaterialien ein Problem dar. Dafür wird oft das Verfahren der Extrusion verwendet, was unerwünschte Einwirkungen auf empfindliche Wirkstoffe wie Proteine und Polypeptide durch hohe Extrusionstemperaturen und Drücke zur Folge haben kann.^[79]

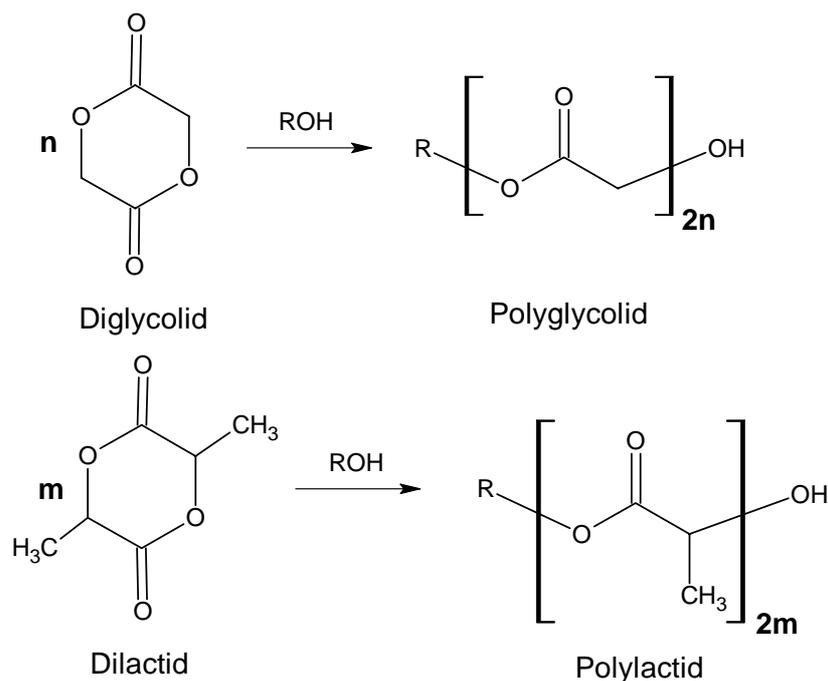


Abbildung A.4. Reaktionen zur Darstellung von Polyglycolid und Polylactids aus zyklischen Dimeren in flüssiger Phase (schematisch).

Durch festkörperchemische Polymerisationsreaktionen können mikroporöse Polyester Polyglycolid (PGA) und Poly-D,L-lactid (PDLLA) aus den entsprechenden Salzen der α -Chlorcarbonsäuren hergestellt werden (Abbildung A.5). Diese Reaktionen waren schon in der

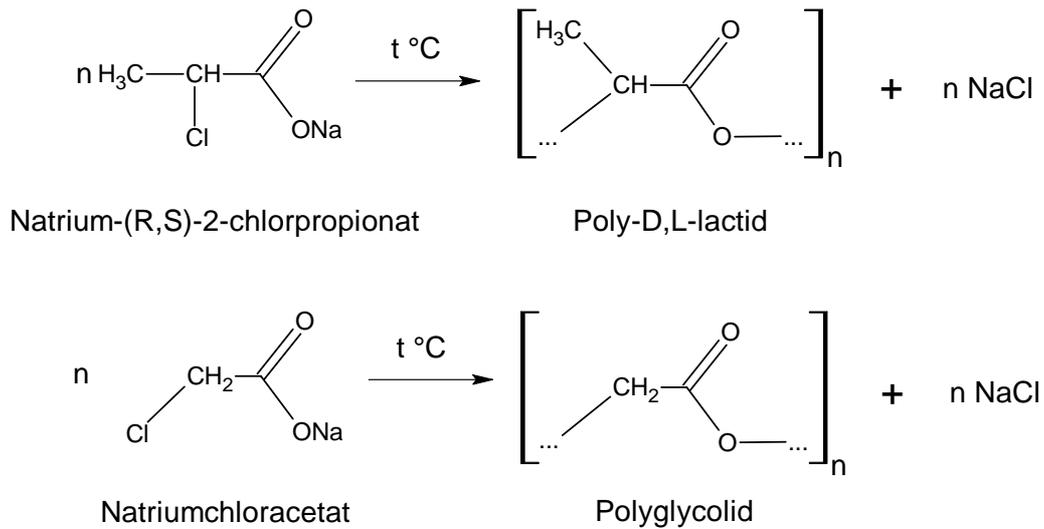


Abbildung A.5. Reaktionen zur festkörperchemischen Darstellung der biodegradierbaren Polyester Poly-D,L-lactid und Polyglycolid.

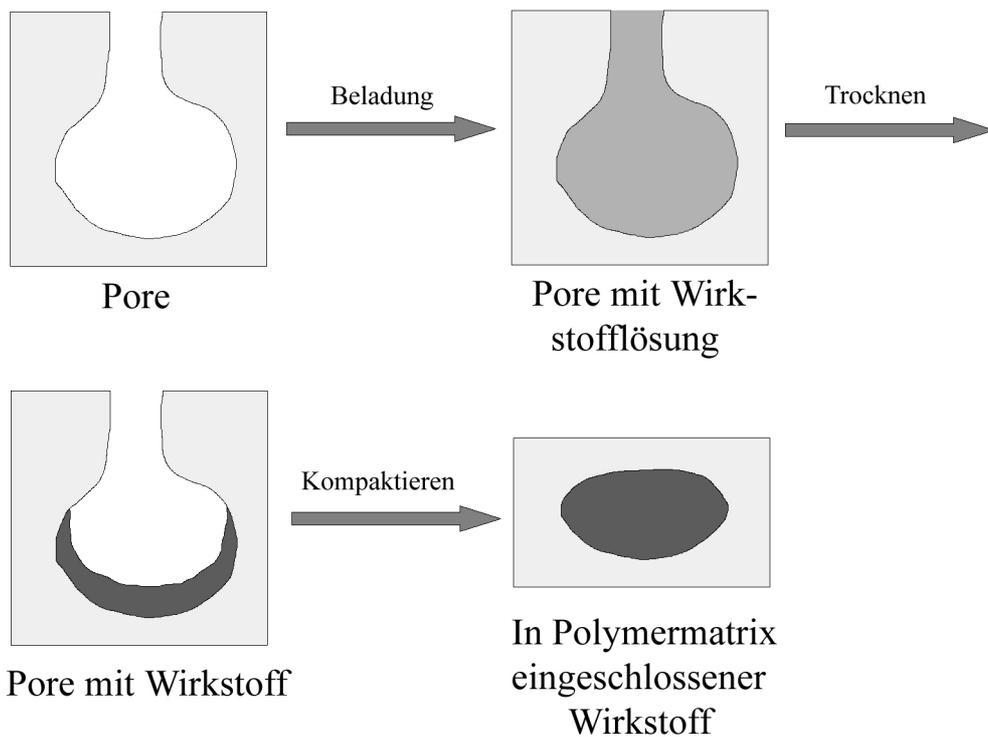


Abbildung A.6. Beladung eines porösen Polymers mit einem Wirkstoff unter Vermeidung von thermischer Belastung.

Mitte des 19. Jahrhunderts bekannt.^[80,81] Das als Nebenprodukt entstehende Natriumchlorid scheidet sich in Form von Mikrokristallen (mit Größenordnung unter einem Mikrometer) innerhalb der Polymermatrix ab. Durch das Auswaschen von Natriumchlorid mit Wasser entsteht somit ein mikroporöses Polymer.^[82] Die Poren in diesen Polymeren können mit einer

Wirkstofflösung durch Sorption bei Raumtemperatur beladen werden. Nachdem das Lösungsmittel durch Abdampfen entfernt wurde, bleibt der Wirkstoff in den Mikroporen. Nachfolgende Kompaktierung bei Raumtemperatur oder bei leicht erhöhten Temperaturen führt im Idealfall zu einem Polymerimplantat mit dem in der Polymermatrix eingeschlossenem Wirkstoff. Durch diese Methode wird jegliche thermische Einwirkung auf den Wirkstoff vermieden (Abbildung A.6).

A.IV Zielsetzung

Die Anzahl der Untersuchungen zur Wirkstofffreisetzung aus porösen biodegradierbaren Polyestern, die durch festkörperchemische Polymerisationsreaktionen hergestellt wurden, ist im Vergleich zu Untersuchungen mit Polymeren aus den Polymerisationsreaktionen in flüssiger Phase sehr gering. Das Ziel der nachstehenden Untersuchung ist es somit herauszufinden, inwiefern die porösen Polyester Poly-D,L-lactid und Polyglycolid für eine kontinuierliche Wirkstofffreisetzung in wässrigen Medien geeignet sind. Die angestrebte Freisetzung sollte möglichst linear sein und eine beträchtliche Zeitspanne (mehr als drei Monate) andauern. Solche Freisetzungseigenschaften sind insbesondere für eine Hormontherapie förderlich, in der eine geringe Menge Wirkstoff innerhalb eines langen Zeitraumes abgegeben werden soll. Die Konzentration eines Wirkstoffes bei einer Hormontherapie im Blut eines Patienten, bei der die effektivste Wirkung anfällt, ist so gering, dass die herkömmlichen Verabreichungsmethoden wie Einnehmen und Einspritzen hier keine Anwendung finden können.

In der letzten Zeit wird die Hormontherapie immer häufiger für Tumorbehandlungen eingesetzt. Geschlechtshormone waren die ersten gefundenen Wachstumsfaktoren, die zur Entwicklung des Krebses beitragen. Der Brustkrebs der Frau und das Prostatakarzinom des Mannes sind die bekanntesten der als hormonabhängig geltenden Tumore. Laut der Krebsstatistik ist der

Brustkrebs die häufigste Tumorerkrankung der Frau. Beim Mann im fortgeschrittenen Alter spielt das Prostatakarzinom eine ähnlich dominierende Rolle. Die operative Entfernung der jeweiligen Keimdrüsen, die das Geschlechtshormon Östrogen bzw. Testosteron freisetzen (Hoden bzw. Eierstöcke), sind altbekannte und oft effektive, aber wegen der psychischen Belastung problematische Therapien. Durch die moderne Hormontherapie beim fortgeschrittenen Brustkrebs und Prostatakarzinom können solche operative Eingriffe vermieden werden. Hormon-Antagonisten, z. B. LHRH-Antagonisten, hindern das eigentliche Hormon an der Entfaltung seiner wachstumsfördernden Wirkung.^[83-85] LHRH (*luteinizing hormone-releasing hormone*, Synonyme: Gonadotropin-Releasing-Hormon (GnRH) Gonadorelin, sowie Gonadoliberin) spielt mit seinem spezifischen Rezeptor eine zentrale Rolle in der Neuroendokrinologie.^[86] Das Decapeptid LHRH (Abbildung A.7), entdeckt von A. Shally und R. Guillemin,^[87,88] wird in den Zellkörpern hypothalamischer Neuronen gebildet und pulsatil in die Blutbahn sekretiert. Es stimuliert die Ausschüttung der geschlechtsspezifischen Sexualhormone in Hoden und Eierstöcken.

Intensive Forschung führte zur Erkenntnis, dass spezifische Rezeptoren für LHRH und synthetische Analoga auch in der Hirnanhangdrüse und anderen Geweben (z. B. Tumorzellen)^[89] sowie in Organen vorhanden sind. Es wurden drei Konzepte der therapeutischen Anwendung gefunden. Erstens die Wiederherstellung der normalen Physiologie durch die Gabe von LHRH über Infusionspumpen, um Menschen mit fehlgesteuerter endogener LHRH-Sekretion zur Fruchtbarkeit zu verhelfen, und zweitens die Verwendung langanhaltender LHRH-Agonisten, die in Depotform zu einer Desensibilisierung der hypophysären Rezeptoren und damit zu einer Unterbrechung der Signalkaskade führen. Folge ist die biochemische „Kastration“, die gerade bei hormonabhängigen Erkrankungen wie Prostatakrebs, Brustkrebs und Endometriose neue Therapiemöglichkeiten eröffnet. Obwohl die Agonisten allgemein gut vertragen werden, ist deren Nachteil ein initialer Stimulus der Hormonsekretion (Östrogen, Testosteron), bevor es zu

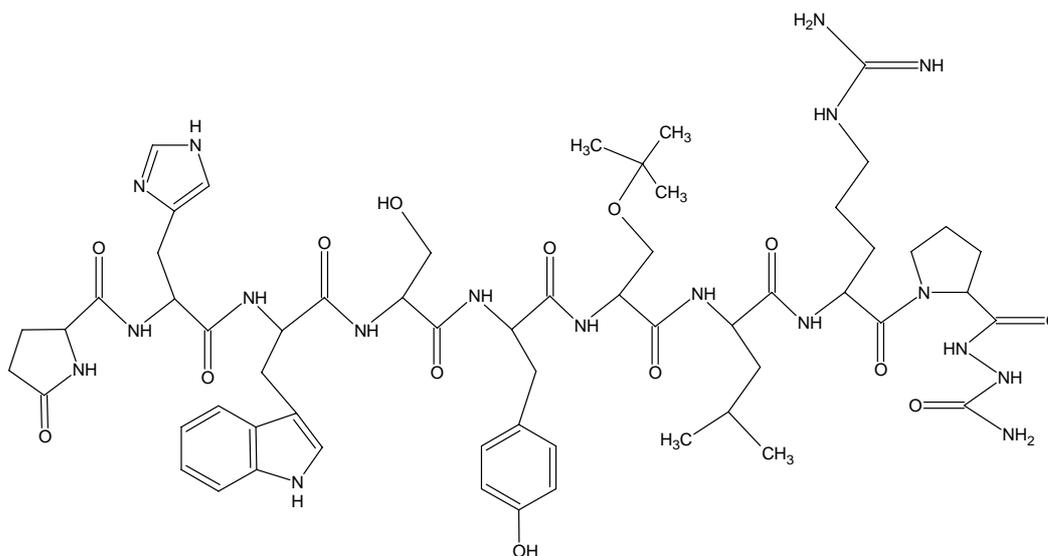
einer Rezeptorverarmung und einer kurzfristigen Verschlimmerung des Krankheitsbildes kommt.^[90] Dies hat zur Entwicklung des dritten Konzepts, der Verwendung von LHRH-Antagonisten, geführt.^[91] Bisher wurden weltweit ca. 5000 LHRH-Analoga synthetisiert und in vitro oder in vivo getestet.^[92,93] Während LHRH-Agonisten bereits seit etwa zehn Jahren am Markt sind, befinden sich die am weitesten entwickelten LHRH-Antagonisten noch immer in der Phase der klinischen Erprobung.^[94,95]

LHRH

Pyroglutamin - Histidin - Tryptophan - Serin - Tyrosin - Glycin - Leucin - Arginin - Prolin - Glycin - NH₂

Goserelin

Pyroglutamin - Histidin - Tryptophan - Serin - Tyrosin - **D-tert-Butylserin** - Leucin - Arginin - Prolin - **Azaglycin** - NH₂



Molekulargewicht

1269 (Base)

Summenformel

C₅₉H₈₄N₁₈O₁₄ (Base)

Abbildung A.7. Strukturformel des Wirkstoffs „Goserelin“ und seine Aminosäuren-Reihenfolge im Vergleich zum LHRH-Decapeptid.

Goserelin ist ein Beispiel der LHRH-Agonisten (Abbildung A.7). Seine Struktur repräsentiert die in zwei Strukturpositionen modifizierte LHRH-Reihenfolge. Wegen seiner relativ stark basischen Eigenschaften wird Goserelin meistens als Monoacetat-Salz verwendet. Die am Markt erhältlichen Präparate mit Goserelin (z. B. Zoladex[®] 3,6 und Zoladex[®] 10,8 von Zeneca) verwenden die Technologie der kontrollierten Wirkstofffreisetzung aus den biodegradierbaren

Polyestern auf der Basis der hochmolekularen Copolymere Poly(lactid-*co*-glycolid) (PLGA). Die Freisetzung von Goserelin aus diesen Präparaten dauert nicht länger als drei Monate und es wird ein „burst effect“ in den ersten wenigen Tagen beobachtet. Es stand also zur Frage, ob man durch Verwendung von mikroporösen Polyestern Polylactid und Polyglycolid die Freisetzung von Goserelin hinsichtlich der Dauer in der Linearität verbessern könnte.

B. Synthese poröser biodegradierbarer Polyester: Polyglycolid (PGA) und Poly-D,L-lactid (PDLA)

B.I Grundlagen

In der Industrie werden die biodegradierbaren Polyester PGA und PDLA überwiegend aus Hydroxyessigsäure oder Milchsäure durch verschiedene Verfahren hergestellt (Abbildung B.1).^[96] Die Direkte Kondensation dieser α -Hydroxycarbonsäuren mit Sb_2O_3 als Katalysator führt zu einem niedermolekularen Produkt mit einem Polymerisationsgrad, der im Bereich von ca. 15 bis 150 liegt.^[97] Ein hochmolekulares Produkt mit einem Polymerisationsgrad von mehr als 1500 lässt sich direkt aus α -Hydroxycarbonsäuren nur durch azeotrope Destillation von Wasser herstellen.^[98] Das niedermolekulare Produkt kann durch Verwendung von Verkettungsreagenzien weiter zu hochmolekularen Ketten polymerisiert werden. Am häufigsten werden diese Polymere aus den zyklischen Dimeren Diglycolid und Dilactid in flüssiger Phase hergestellt. Als Katalysatoren werden Zinn-Verbindungen verwendet. Der Mechanismus dieser Reaktionen und die Molmasse des Produkts hängen von den Reaktionsbedingungen, dem Katalysator und den Zusätzen ab.^[99] Die zyklischen Dimere werden durch Pyrolyse von α -Hydroxycarbonsäuren bei erhöhten Temperaturen erhalten, die eventuell dabei entstehenden niedermolekularen Polymerisationsprodukte werden bei diesen Bedingungen auch in die zyklischen Dimere gespalten.

Polymere, die durch festkörperchemische Polymerisationsreaktionen (Abbildung A.5) hergestellt werden, sind niedermolekular (Polymerisationsgrad < 50). Diese Reaktionen werden bei viel höheren Temperaturen durchgeführt als bei der analogen Synthese aus den zyklischen Dimeren in flüssiger Phase. Bei den Temperaturen der festkörperchemischen Reaktionen konkurriert die Polymerisation mit vielen anderen Nebenreaktionen. In der Abbildung B.2 sind einige Beispiele

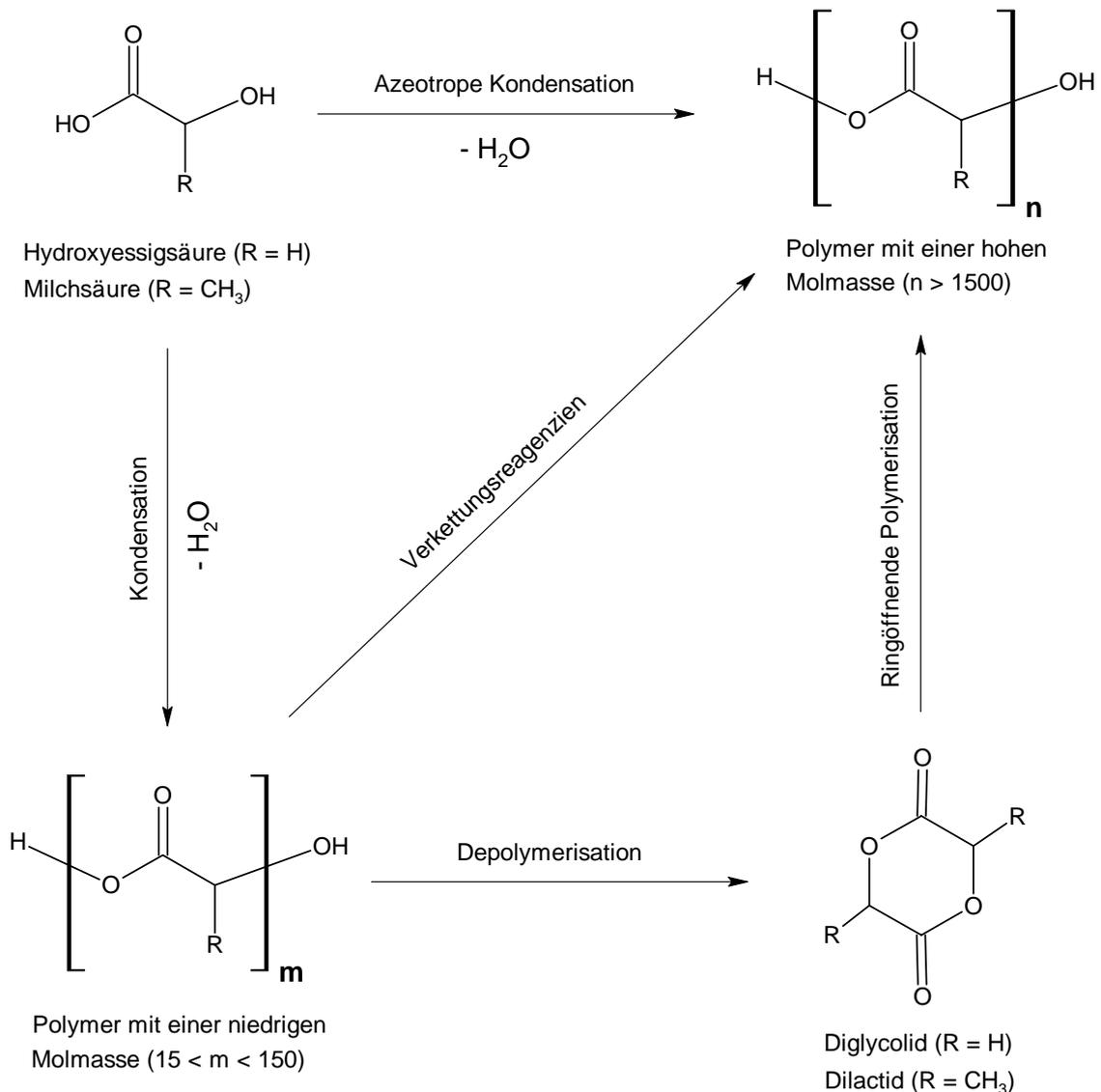


Abbildung B.1. Industrielle Herstellungsmethoden von Polylactid und Polyglycolid aus Milchsäure und Hydroxyessigsäure.

solcher Reaktionen dargestellt. Durch Pyrolyse wird ein Molekül des jeweiligen zyklischen Dimers vom Ende einer Polymerkette abgespalten, der Polymerisationsgrad verringert sich somit um 2 Monomereinheiten. Dieser Prozess kann mit demselben Molekül weiter vorgehen. Für die festkörperchemischen Synthesen ist die Anwesenheit von Wasser entscheidend. Bei diesen Temperaturen reagiert Wasser leicht mit den Natrium-Salzen der 2-Chlorcarbonsäuren, dabei entstehen entsprechende α -Hydroxycarbonsäuren, die sich entweder verflüchtigen oder zu den zyklischen Dimeren reagieren. Das Wassermolekül wird im letzten Fall wieder regeneriert. Wasser kann außerdem die wachsenden Polymerketten an einer beliebigen Stelle durch

Hydrolyse spalten, dabei verringert sich der Polymerisationsgrad wesentlich. Leider ist es praktisch unmöglich, Wasser aus der Reaktionssphäre völlig auszuschließen, da es immer in geringen Mengen in den Ausgangssalzen und in der Luft vorhanden ist. Für die Synthese in flüssiger Phase beeinflussen all diese Nebenreaktionen den Polymerisationsgrad entweder durch geringere Temperaturen oder durch Verdünnung unwesentlich. Dennoch sind die festkörperchemischen Synthesen bisher der einzige Weg, die mikroporösen PGA und PDLLA mit einer großen Porosität und einer gleichmäßigen Porenverteilung zu erhalten.

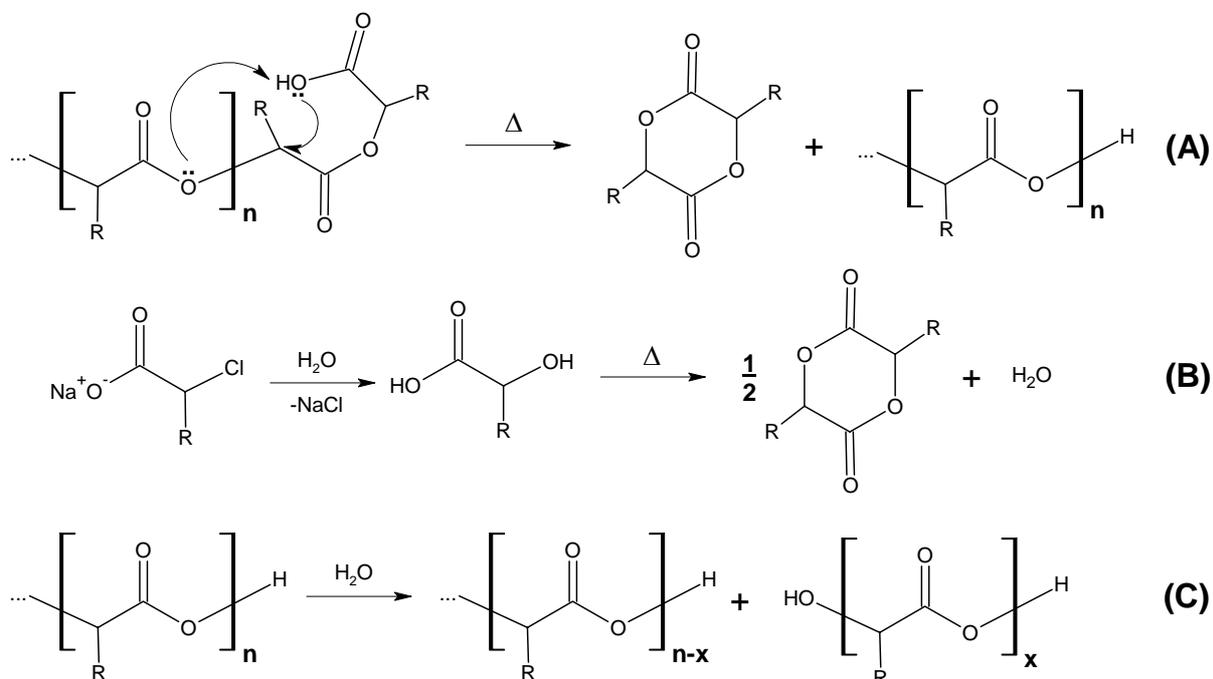


Abbildung B.2. Mögliche Nebenreaktionen bei festkörperchemischer Herstellung von Polyglycolid und Polylactid aus Natriumsalzen entsprechender α -Chlorcarbonsäuren: (A) – Abspaltung des zyklischen Dimers von der wachsenden Polymerkette durch Pyrolyse; (B) – Hydrolyse des Ausgangssalzes und Dimerisierung; (C) – Spaltung einer Polymerkette an einer beliebigen Stelle durch Hydrolyse.

B.II Präparative Arbeiten

Poröses Polyglycolid

Die Synthese des porösen PGA erfolgte durch eine bereits früher verwendete Methode.^[100] Ein 500 ml Rundkolben aus Teflon mit 40 g (343,4 mmol) Natriumchloracetat (Merck, 99% Reinheit) wurde an einen Rotationsverdampfer angeschlossen. Der Kolben wurde bei ständigem Rotieren ohne Vakuum und Kühlung in einem Siliconölbad erhitzt. Der Kolbeninhalt wurde ständig mit einem Magnetrührfisch gerührt. Die Temperaturerhöhung erfolgte mit folgender Geschwindigkeit: etwa ½ Stunde von Raumtemperatur bis 140° C und dann jede ½ Stunde 5° C. Sehr langsames Erhitzen, Durchrührung mit einem Magnetrührfisch und Rotieren sollten die lokalen Überhitzungen des Stoffes verhindern. Da die Festkörperpolymerisation des Natriumchloracetats stark exotherm ist, kann eine lokale Überhitzung zu unerwünschten Nebenreaktionen wie Verbrennen des Stoffes durch Luftsauerstoff und Verkohlen führen. Die ungefähre Temperatur des Reaktionsbeginns wurde durch die Ergebnisse der DSC-Untersuchung des Natriumchloracetats ermittelt. Der Reaktionsverlauf wurde durch Messung der IR-Spektren der direkt aus der Reaktionsmischung entnommenen Proben kontrolliert. Im Verlauf der Reaktion wird der Carboxylgruppenpeak bei ca. 1620 cm⁻¹ kleiner, während ein intensiver Peak der Esterbindungen bei ca. 1745 cm⁻¹ erscheint (Abbildung B.3). Die Polymerisationsreaktion des Natriumchloracetats war bei 185° C abgeschlossen. Um das als Nebenprodukt entstandene Natriumchlorid zu entfernen, wurde die Reaktionmischung nach Abkühlung auf Raumtemperatur gemörsert, mit demineralisiertem Wasser (ca. 500 ml) aufgegossen und in einem Kühlschrank bei +3° C für 3 Tage gelassen. Die Kühlung war nötig, um die hydrolytische Zersetzung des Polymers auf ein Mindestmaß einzuschränken. Das Polymer wurde dann mit einem Büchnertrichter abfiltriert und im Ölpumpenvakuum vollständig getrocknet. Die Vollständigkeit der Extraktion des Natriumchlorids wurde mittels Röntgenpulverdiffraktometrie

(XRD) geprüft. Ausbeute PGA: 93 % (18,54 g, 159,1 mmol). Außerdem wurde das erhaltene Polymer mit Viskosimetrie in 1,1,1,3,3,3-Hexafluorisopropanol (HFIP), DSC und IR-Spektroskopie charakterisiert.

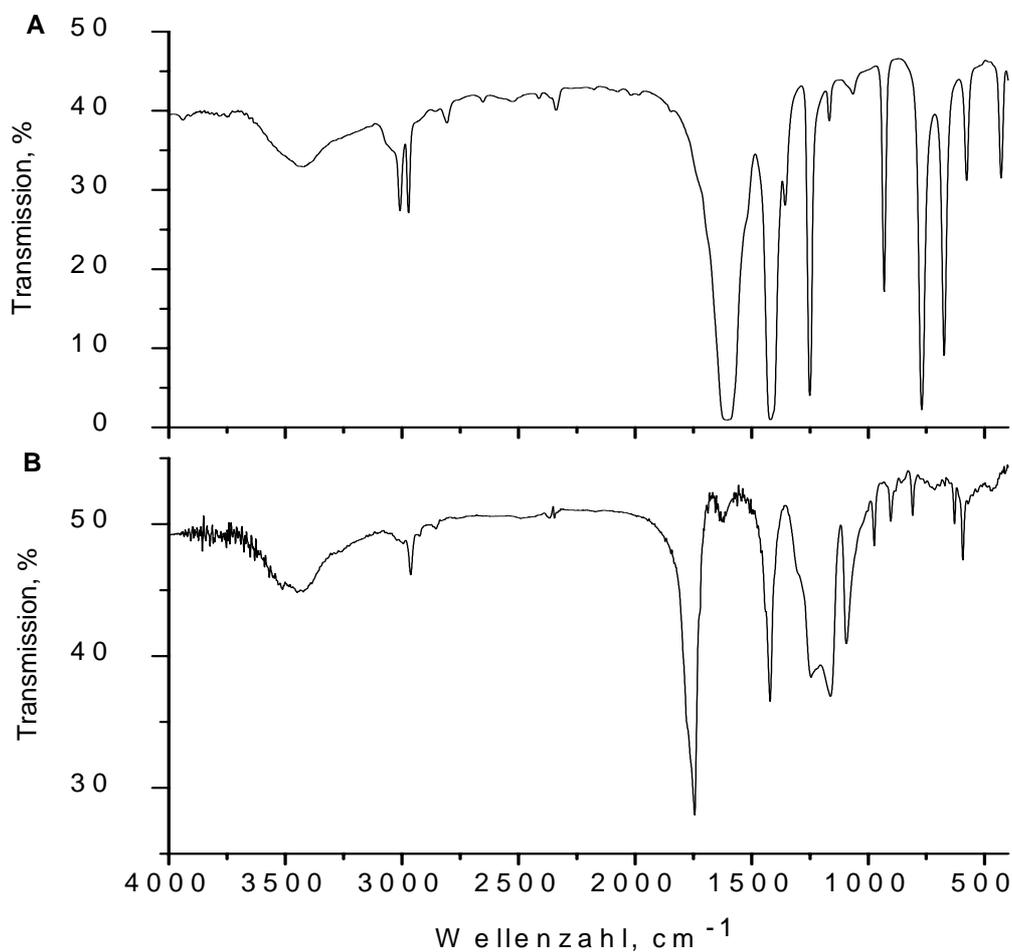


Abbildung B.3. IR-Absorptionsspektrum von Natriumchloracetat (A) und Polyglycolid aus der Festkörperreaktion (B) (nach dem Auswaschen von NaCl).

Natrium-(R,S)-2-chlorpropionat

Natrium-(R,S)-2-chlorpropionat wurde durch eine leicht modifizierte Methode aus der Literaturvorschrift^[101] erhalten. 11,66 g (291,6 mmol) NaOH (Merck, Reinheit >99 %) wurden in 200 ml Methanol gelöst und die Lösung wurde auf 0° C mit Eis gekühlt. Dementsprechend wurden 25 ml (31,65 g, 291,6 mmol) (R,S)-2-Chlorpropionsäure (Merck, Reinheit >95 %, 4 % 2,2-Dichlorpropionsäure) in 200 ml Methanol gelöst und mit Eis abgekühlt. Die NaOH-Lösung

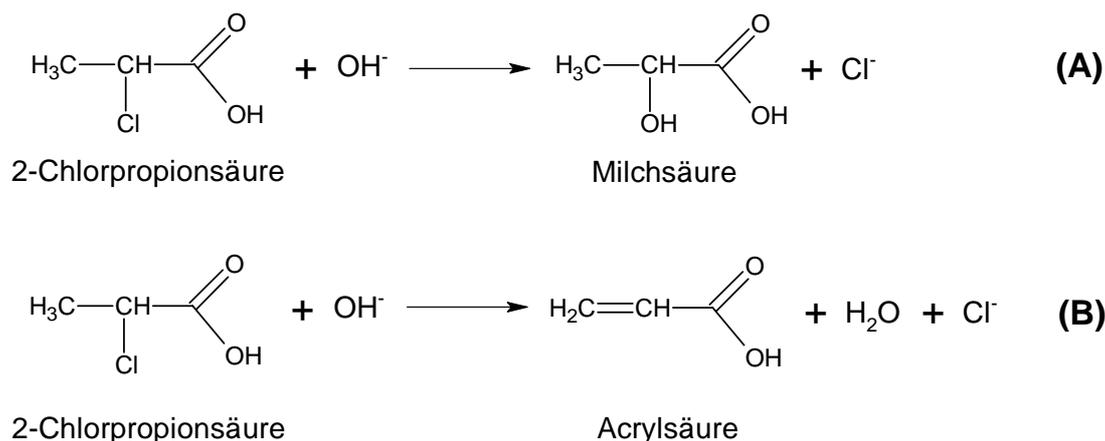


Abbildung B.4. Eine mögliche Nebenreaktion bei der Darstellung von Natrium-2-chlorpropionat aus 2-Chlorpropionsäure und Natriumhydroxid: (A) – S_N2 -Substitution von Chlor durch Hydroxydionen; (B) – Eliminierung von Chlorwasserstoff unter Bildung einer Doppelbindung.

wurde langsam bei ständigem Rühren und unter Kühlung zur Säure-Lösung getropft. Die Kühlung und die Vermeidung eines Überschusses an Natriumhydroxid in der Säure-Lösung sollte die nukleophile Substitution durch Hydroxylgruppen und Elimination des Chlors beim α -Kohlenstoffatom der 2-Chlorpropionsäure verhindern (Abbildung B.4). Nach der Zugabe der ganzen NaOH-Lösung wurde das Methanol an einem Rotationsverdampfer entfernt. Die nach der Synthese von Natrium-2-chlorpropionat verbleibende kleine Menge an 2-Chlorpropionsäure stört bei der Festkörperpolymerisation. Diese ist aber sehr schwer zu entfernen, da sie mit Natrium-2-chlorpropionat feste und klebrige Klumpen bildet. Die Säure kann mit Aceton nicht vollständig ausgewaschen werden. Beim Mörsern kleben die Klumpen dabei zusammen. Wenn man aber das synthetisierte Natrium-2-chlorpropionat direkt nach der Synthese in möglichst wenig Wasser löst und das Wasser eindampft, so bekommt man eine ölartige Flüssigkeit, die aus einem Gemisch von Natrium-2-chlorpropionat, 2-Chlorpropionsäure und wenig Wasser besteht. Mischt man dieses Gemisch mit Aceton und dampft das Aceton ab, so kann man die Wasserreste beseitigen. Man bekommt eine feste Masse, in der die 2-Chlorpropionsäure gleichmäßig verteilt ist. Diese kann man leicht mit einem Spatel zerkleinern; man wäscht dann in einem Büchnertrichter jeweils dreimal mit zwei Portionen Aceton, um die 2-Chlorpropionsäure zu entfernen. Anschließend wird das Pulver im Vakuum getrocknet. Die Substanz wurde mittels IR-

Spektroskopie, $^1\text{H-NMR}$ in D_2O and DSC charakterisiert. Ausbeute: 84% (31,96 g, 244,9 mmol).

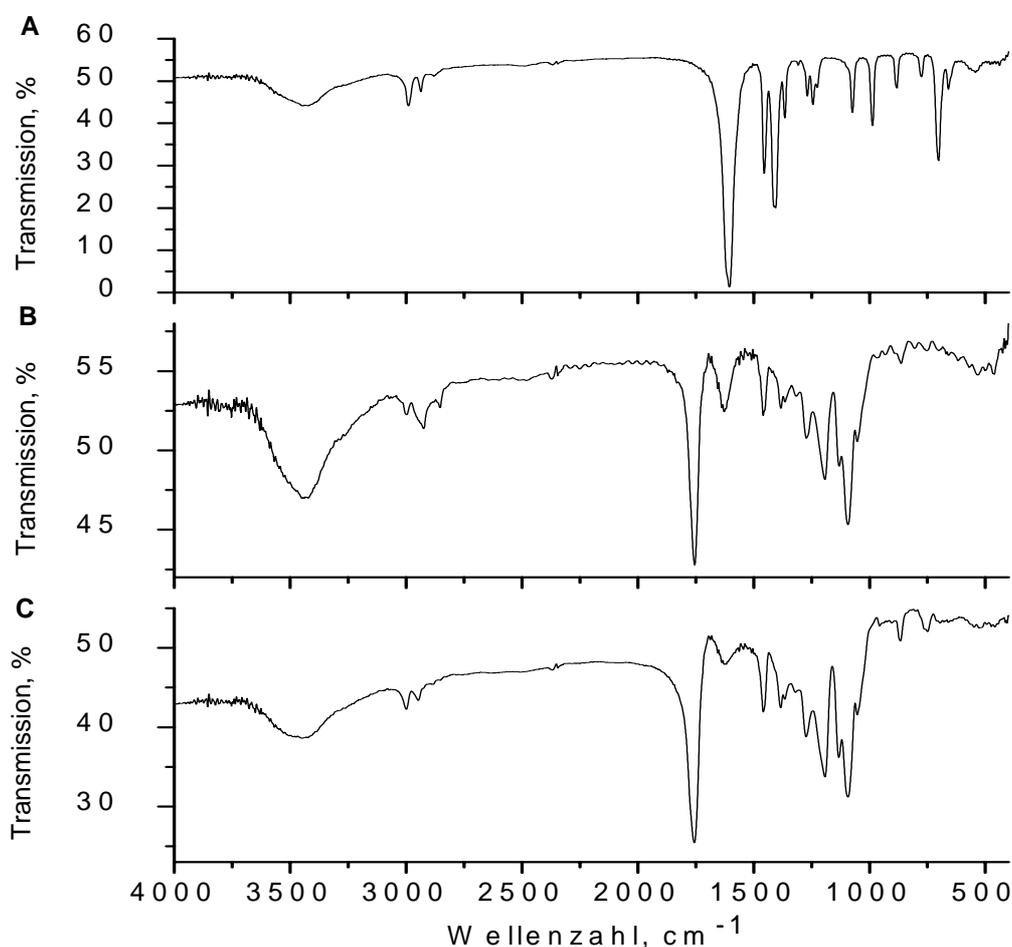


Abbildung B.5. IR-Absorptionsspektrum von Natrium-2-chlorpropionat (A), PDLLA aus Natrium-2-chlorpropionat (Polymerisation bei 148°C) (B) und PDLLA aus Natrium-2-chlorpropionat (Polymerisation bei 170°C) (C).

Poröses Poly-D,L-lactid (PDLLA)

Poröses PDLLA wurde durch dieselbe Methode erhalten, die oben zur Darstellung des mikroporösen Polyglycolids beschrieben wurde.^[101] 30 g (229,9 mmol) Natrium-(R,S)-2-chlorpropionat wurden zur festkörperchemischen Polymerisation gebracht. Die Polymerisationsreaktion war bei 170°C abgeschlossen. Der Reaktionsverlauf wurde durch IR-Spektroskopie der direkt aus der Reaktionsmischung entnommenen Proben kontrolliert (Abbildung B.5). Nach dem Auswaschen des Polymerisationsprodukts mit demineralisiertem Wasser bei $+3^\circ\text{C}$ wurde der erhaltene Feststoff filtriert. Die Vollständigkeit der Extraktion des

Natriumchlorids wurde mittels Röntgenpulverdiffraktometrie (XRD) geprüft. Außerdem wurde das erhaltene Polymer mittels Viskosimetrie in Chloroform, DSC, IR-Spektroskopie und $^1\text{H-NMR}$ in CDCl_3 charakterisiert. Ausbeute: 88 % (14,57 g, 202,3 mmol).

B.III Ergebnisse

DSC-Untersuchungen des Natriumchloracetats und Natrium-(R,S)-2-chlorpropionats zeigen große exotherme Peaks der Festkörperpolymerisation (Abbildungen B.6, B.7). Für den Polymerisationsbeginn des Natriumchloracetats beträgt die Onsettemperatur 205°C , $\Delta_r H_m$ $-23,6\text{ kJ mol}^{-1}$, für Natrium-(R,S)-2-chlorpropionat beträgt die Onsettemperatur 178°C , $\Delta_r H_m$ $-34,80\text{ kJ mol}^{-1}$. Wie aus den DSC-Messungen ersichtlich ist, verläuft die Polymerisationsreaktion von Natrium-(R,S)-2-chlorpropionat viel spontaner als von Natriumchloracetat. Davon zeugen viel schmalere und höhere exotherme Peaks auf den DSC-Diagrammen und fast 50 % größere Reaktionsenthalpien der Polymerisationen (in J mol^{-1}) für Natrium-(R,S)-2-chlorpropionat im Vergleich zu Natriumchloracetat.

Damit kann man auch die Tatsache erklären, dass es nicht gelang, das PDLLA aus Festkörperpolymerisation in reinster Form herzustellen. Das Polymer wird während der Reaktion durch partielle Verkohlung oder Verbrennung braun bis dunkelbraun. Das PDLLA selbst ist in Reinform weiß oder farblos. Eine Durchführung der Reaktion in Argon-Schutzatmosphäre bringt in diesem Sinn keine erkennbare Veränderung. Das durch Festkörperpolymerisation hergestellte PGA ist dagegen weiß, eventuell leicht grau.

Die hergestellten Polymere unterscheiden sich sehr in ihren physikalischen Eigenschaften. Das PGA ist partiell kristallin, während das PDLLA völlig röntgenamorph ist. Durch seine Struktur hat das PGA einen relativ hohen Schmelzpunkt. In seiner DSC-Messung (Abbildung B.8) sieht man zwei deutliche endotherme Signale bei etwa 200° und 220°C , die dem Schmelzen

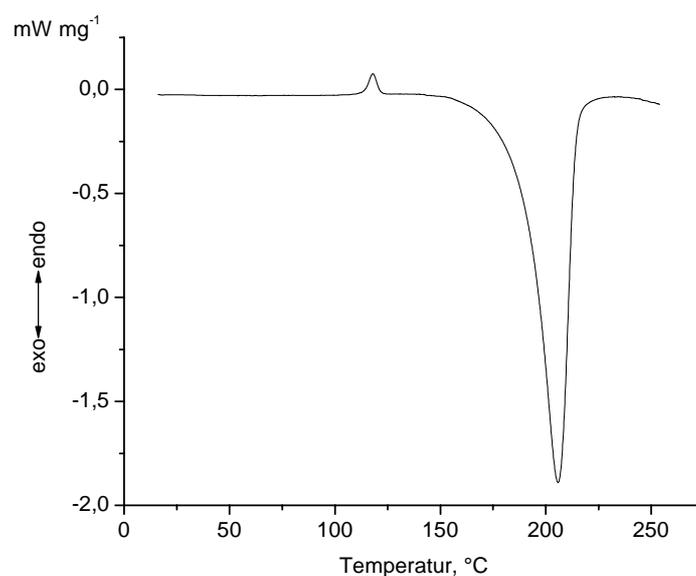


Abbildung B.6. DSC-Untersuchung von Natriumchloracetat. Der kleine Peak bei ca. 120° C entspricht vermutlich der Verdampfung von Kristallwasser, der große exotherme Peak bei ca. 205° C entspricht der Festkörperpolymerisation.

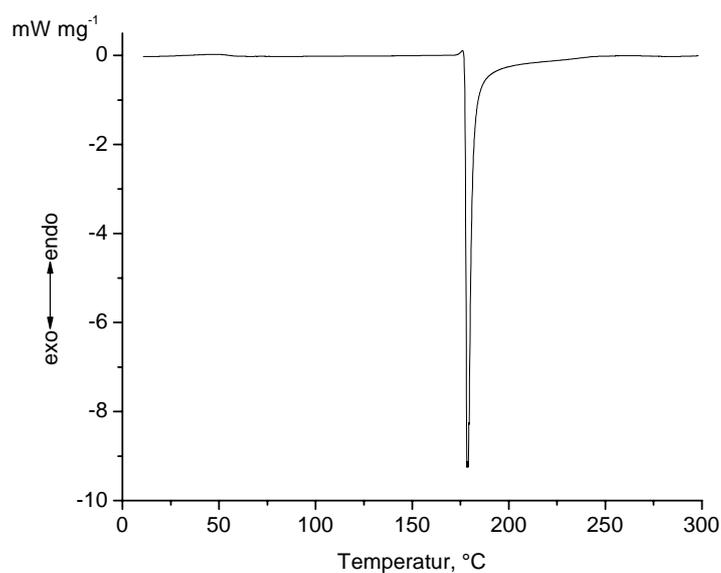


Abbildung B.7. DSC-Untersuchung von Natrium-2-chlorpropionat. Der große exotherme Peak bei ca. 180° C entspricht der Festkörperpolymerisation.

zuzuordnen sind ($\Delta H \sim 6,35 \text{ kJ mol}^{-1}$). Die XRD-Messung zeigt schwache Signale bei $2\theta = 22,5$ und $29,0^\circ$. In der DSC-Messung vom durch Festkörperpolymerisation hergestellten PDLLA (Abbildung B.9) sieht man nur einen extrem kleinen endothermen Peak bei ca. 40° C , der dem

Glasübergang entspricht. Zum Unterschied von PGA ist PDLA gut in vielen organischen Lösungsmitteln wie Aceton, Dichlormethan, Chloroform, Ethylacetat löslich.

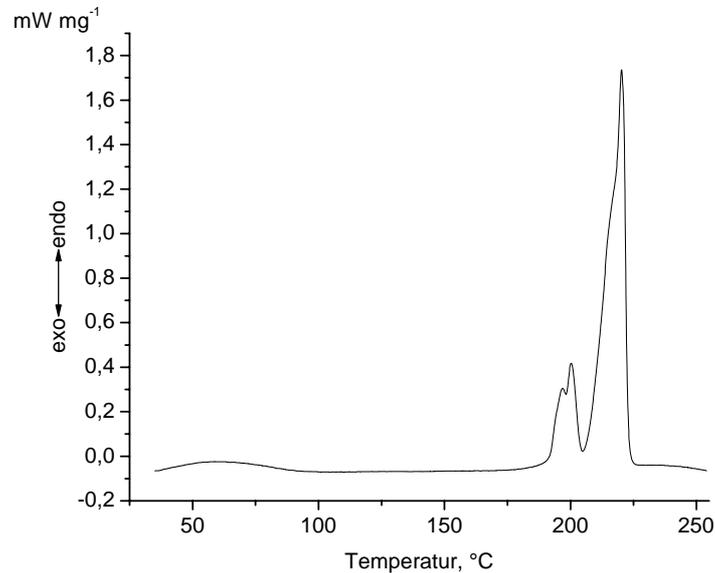


Abbildung B.8. DSC-Untersuchung von Polyglycolid aus der Festkörperreaktion (nach dem Auswaschen von Natriumchlorid).

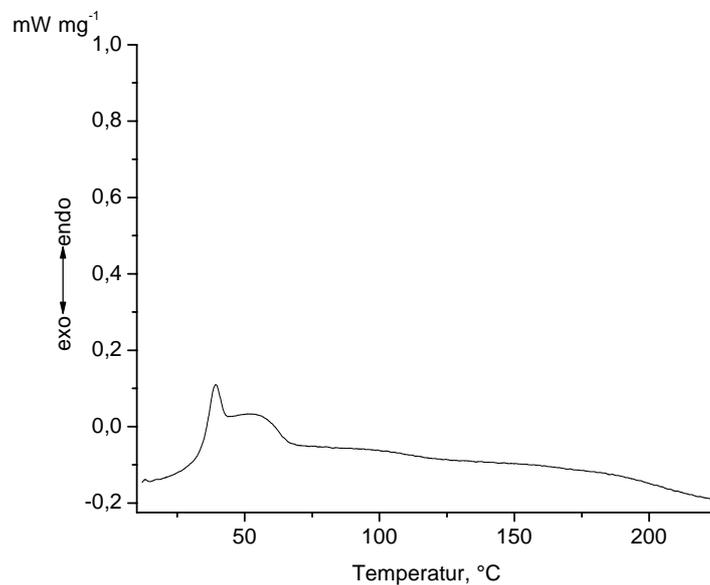


Abbildung B.9. DSC-Untersuchung von PDLA aus Natrium-2-chlorpropionat (nach dem Auswaschen von Natriumchlorid).

Die Struktur dieser Polymere geht aus der Struktur ihrer Monomere hervor (Abbildung B.1). Das PDLA hat eine verteilte unregelmäßige Anordnung der Methylgruppen an den asymmetrischen

α -Kohlenstoffatomen der Lactidfragmente in den Polymerketten, und kann somit keine Kristallstruktur bilden. Solche Polymere werden als ataktisch bezeichnet. Das PGA hat dagegen keine Substituenten an den α -Kohlenstoffatomen, d. h. es liegen definiert angeordnete Ketten vor. Solche Polymere werden isotaktisch genannt. Ein weiteres Beispiel eines isotaktischen Polymers ist Poly-L-lactid (PLLA). Es hat eine regelmäßige, periodische Anordnung der Methylgruppen am α -Kohlenstoffatom der Lactidfragmente. Aus isotaktischen Molekülen bilden sich leichter Kristalle, weil sie sich besser aneinander lagern können. So sind PGA und PLLA partiell kristalline Polymere, PDLLA hingegen nicht. Der Grad der Kristallinität wiederum bestimmt wichtige Eigenschaften eines Polymers: Kristallinere Kunststoffe sind härter, haben eine höhere Formbeständigkeit und ihr Schmelzpunkt bzw. Erweichungspunkt erhöht sich. Denn bei gleichmäßiger Anordnung der Moleküle können zwischenmolekulare Kräfte besser wirken. Eine DSC-Messung von PLLA (Abbildung B.10) bestätigt diese Vermutung: PLLA hat eine hohe Schmelztemperatur von etwa 175° C und eine hohe Schmelzenthalpie (63,85 J g⁻¹ oder 4,6 kJ mol⁻¹ Monomereinheit).

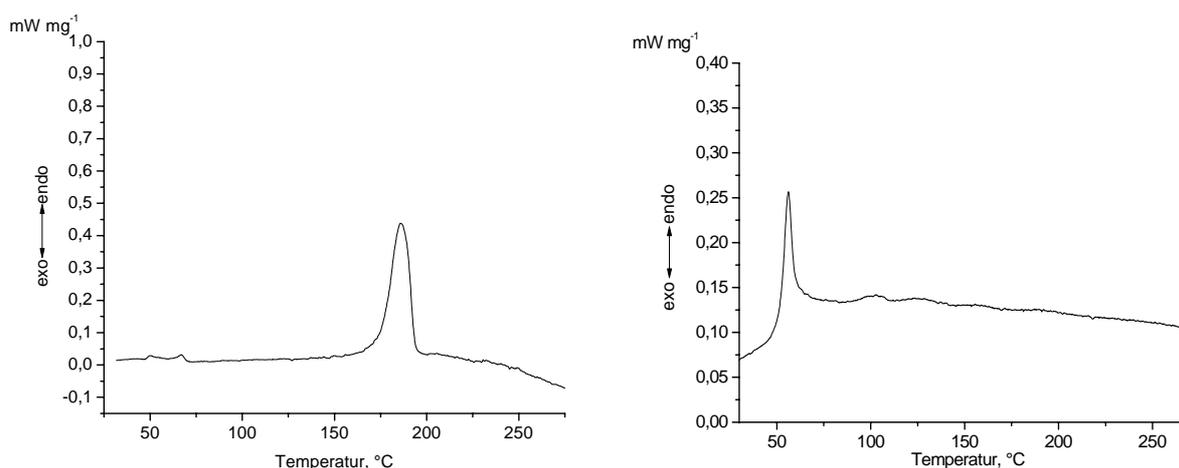


Abbildung B.10. DSC-Untersuchung von Resomer[®] L210, Boehringer (Poly-L-lactid, PLLA) (links) und Resomer[®] R207 (Poly-D,L-lactid, PDLLA) (rechts). Die endothermen Peaks entsprechen dem Schmelzen (ca. 175° C für PLLA) bzw. dem Glasübergang (ca. 50° C für PDLLA).

Die Viskosimetrie der hergestellten Polymere wurde in Chloroform (für PDLLA) und 1,1,1,3,3,3-Hexafluorisopropanol (HFIP) (für PGA) bei 20° C durchgeführt. Die Viskosimetrie ist eine Methode zur Bestimmung des Molekulargewichts eines Polymers anhand der Veränderung der Viskosität von Polymerlösungen mit verschiedenen Konzentrationen. Sie wurde nach dem in der Literaturvorschrift^[102] beschriebenen Verfahren durchgeführt. Leider löst sich das PGA in fast keinem Lösungsmittel außer HFIP, welches sehr flüchtig, toxisch und zudem noch teuer ist.

Das Verhältnis zwischen dem mittleren Molekulargewicht \bar{M}_w und der charakteristischen Viskosität $[\eta]$ (Staudinger-Index) wird mit der Mark-Houwink'schen Gleichung beschrieben:

$$[\eta] = K_\eta \bar{M}_w^a \quad (\text{B.1})$$

wobei a und K_η von Polymer, Lösungsmittel und Experimentalbedingungen abhängige Konstanten sind.^[103] Die charakteristische Viskosität wird aus der Reihe der relativen Viskositäten von Lösungen mit verschiedenen Polymerkonzentrationen durch Extrapolation berechnet:

$$[\eta] = \lim_{c \rightarrow 0} \frac{\eta_{rel}}{c} \quad (\text{B.2})$$

In der Literatur findet man keine Angaben für a und K_η für PGA in HFIP. Die erhaltenen Werte für $[\eta]$ können aber durch die empirische Gleichung von Kenley et al^[104] in die Werte für Tetrahydrofuran (THF) konvertiert werden:

$$[\eta]_{\text{THF}} = 0,405[\eta]_{\text{HFIP}} + 3,2 \quad (\text{B.3})$$

Für $[\eta]_{\text{THF}}$ sind die Konstanten a und K_η bekannt (20° C): $K_\eta = 0,73$ und $a = 4,8 \cdot 10^{-2}$.

Für die Berechnung der Viskosität von PDLLA in Chloroform wurden die folgenden Konstanten verwendet:^[105] $K_\eta = 0,87$ und $a = 7,4 \cdot 10^{-3}$.

Die erhaltenen Werte der mittleren Molekulargewichte für die festkörperchemisch hergestellten Polymere betragen: 1330 g mol^{-1} für PGA (Polymerisationsgrad 23), 4170 g mol^{-1} für PDLLA (Polymerisationsgrad 58).

In der Abbildung B.11 sind die rasterelektronenmikroskopischen (REM) Aufnahmen von PGA und PDLLA direkt nach der Polymerisation (mit Natriumchlorid) und nach dem Auswaschen mit Wasser dargestellt. Man kann die Poren mit einer Größe von unter einem Mikrometer gut erkennen.

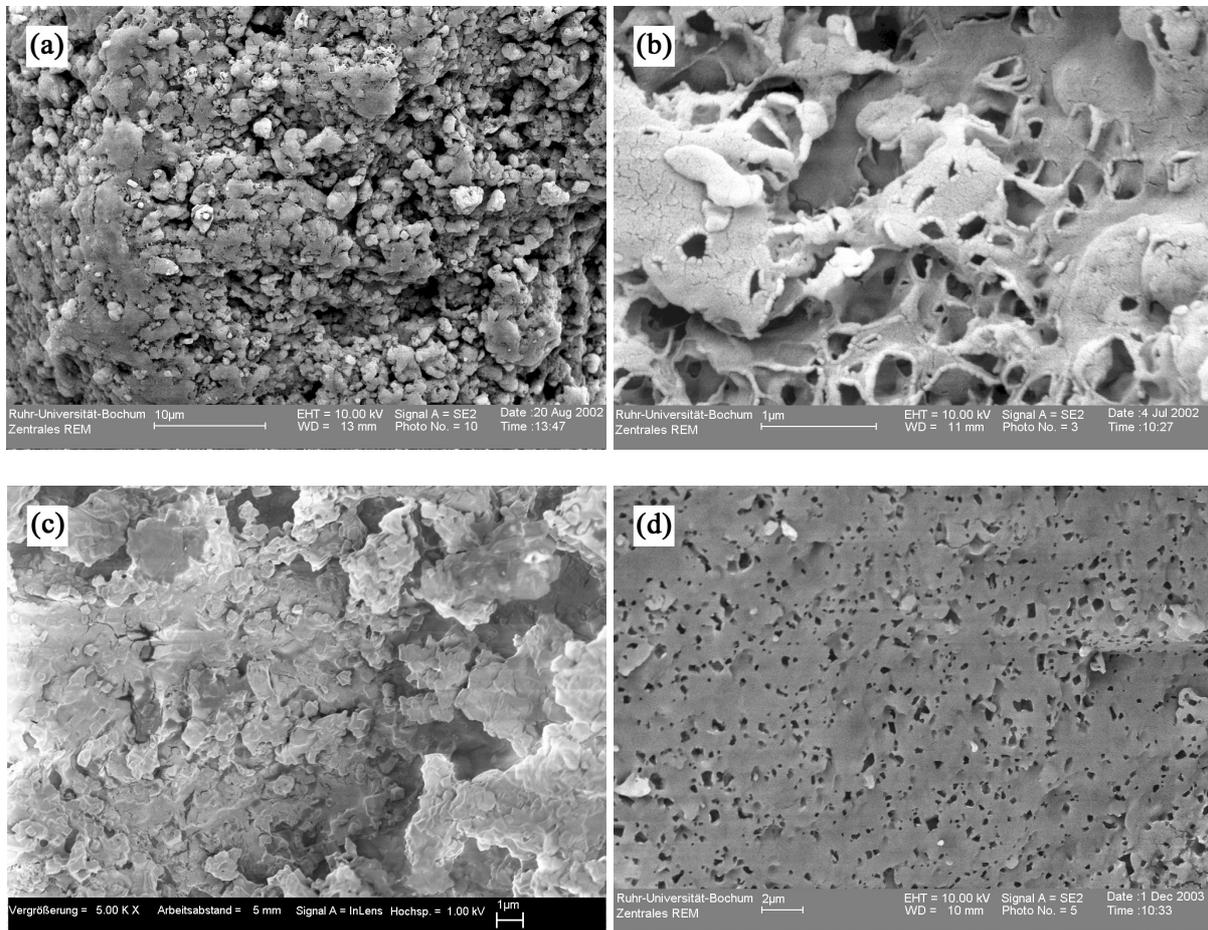
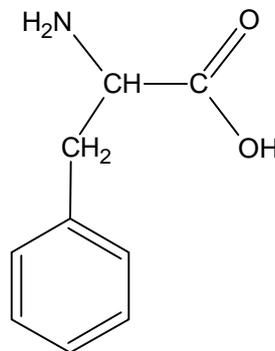


Abbildung B.11. REM-Aufnahmen von PGA direkt nach der Polymerisation (a), nach dem Auswaschen mit Wasser (b); von PDLLA direkt nach der Polymerisation (c), nach dem Auswaschen mit Wasser (d).

C Freisetzung aus uniaxial gepressten Formkörpern

C.I Grundlagen

Der erste Teil der Untersuchungen der Wirkstofffreisetzung aus porösen Polyestern wurde mit uniaxial gepressten PGA-Formkörpern durchgeführt. Als ein Modellwirkstoff für die Freisetzungsexperimente wurde zuerst die Aminosäure L-Phenylalanin (Phe) gewählt (Abbildung C.1). Die Zusammensetzung aller aus PGA und Phe hergestellten Formkörper, ihre Herstellungsmethode und kurze Angaben zur Freisetzungsdauer sind in Tabelle C.1 zusammengefasst. Detaillierte Herstellungsmethoden aller Formkörper sind nachstehend aufgeführt.



Phenylalanin

Abbildung C.1. Strukturformel des Phenylalanins.

Uniaxiales Pressen wird üblicherweise für die Herstellung von Formkörpern mit relativ großen Abmessungen verwendet. Die Oberfläche des Querschnitts bei uniaxialem Verpressen beträgt normalerweise mindestens 20 mm².^[106,107] Zur Herstellung von Formkörpern mit kleineren Querschnitten sind viel kompliziertere Pressformen notwendig und die aufgelegten Stempelkräfte dürfen nicht vergleichbar hohe Werte wie bei größeren Querschnitten erreichen, da der Druck durch den kleineren Querschnitt viel größer ist.^[108] Geringe Stempelkräfte für

Formkörper mit kleinen Querschnitten führen zu mangelhafter Kompaktierung und relativ schneller Wirkstofffreisetzung. Zur Herstellung von Formkörpern durch uniaxiales Verpressen werden die mechanisch mit einem Wirkstoff vermischten Polymere^[107,109] und auch die vor dem Pressen hergestellten mit einem Wirkstoff beladenen Polymer-Mikrokugeln^[106,108,110,111] verwendet. Das Verpressen von Mikrokugeln hat den Vorteil, dass die Verteilung des Wirkstoffes innerhalb des Endformkörpers relativ gleichmäßig ist. Die Dauer der Wirkstofffreisetzung in wässrigen Medien aus uniaxial gepressten Formkörpern ist jedoch in den meisten Fällen relativ kurz (je nach der Natur des Wirkstoffes und seiner Hydrophilität bis zu ca. 10 Tagen) und wird von einem „burst effect“ begleitet. Um die Freisetzung zu verlangsamen werden die fertigen Formkörper oft mit einer äußeren hydrophoben Polymerschicht, die keinen Wirkstoff enthält, versehen.^[15,109,110,112,113] In den meisten Fällen erfolgt die Beschichtung eines Formkörpers durch Eintauchen in eine Lösung eines Polylactid- oder Poly(lactid-co-glycolid)-Polymers von einer hohen Konzentration in Dichlormethan, Chloroform, Aceton, Ethylacetat und anderen Lösungsmitteln. Die Formkörper werden anschließend getrocknet. Solche Polymerbeschichtungen, je nach dem Typ des verwendeten Polymers und der Natur des Wirkstoffes, können die Freisetzung bedeutend verlangsamen (bis zu drei Monaten und mehr).^[15,113] In einigen Untersuchungen wurden auch Methoden zur Beschichtung der biodegradierbaren Mikrokugeln entwickelt und getestet.^[13,28]

Tabelle C.1. Zusammensetzung der durch uniaxiales Verpressen hergestellten Formkörper (Phe=L-Phenylalanin).

Nr.	Bestandteile	Herstellung und Pressbedingungen	Beschichtung	Freisetzungskinetik
1	PDLLA (porös) + 9 % Phe (w:w)	Phe in wenig Wasser lösen, PDLLA (porös) in der Lösung dispergieren, im Vakuum trocknen, bei 50°C/30 kN 15 min verpressen. Geometrie: Quader, 30·5·2 mm ³ .	keine	100 %, < 2 Tage
2	PGA (porös) + 9 % Phe (w:w)	Phe in wenig Wasser lösen, PGA (porös) in der Lösung dispergieren, im Vakuum trocknen, bei 150°C/30 kN 15 min verpressen. Geometrie: Quader 30·5·2 mm ³ .	keine	100 %, 2 Tage
3	PGA (porös) + 30 % Phe (w:w)	Partiell gelöstes Phe + PGA (porös) in wenig Wasser dispergieren, im Vakuum trocknen, bei 150°C/30 kN 15 min verpressen, in Quader 7·5·5 mm ³ zersägen.	PLLA 8x	100 %, 4 Tage
			PLLA 14x	100 %, 9 Tage
			PDLLA 1x	100 %, 4 Tage
			PDLLA 13x	100 %, 75 Tage
4	PGA (porös) + 30 % Phe (w:w)	Phe + PGA trocken vermischen, bei 50°C/120 kN 15 min verpressen, in Quader 5·5·5 mm ³ zersägen.	PLLA 8x	100 %, 4 Tage
			PLLA 11x	100 %, 4 Tage
			PLLA 14x	100 %, 4 Tage
			PDLLA 5x	100 %, 30 Tage
			PDLLA 9x	100 %, 60 Tage
5	PGA (porös) + 30% Phe + 5 % PDLLA (Boehringer) (w:w)	Phe + PGA + PDLLA trocken vermischen, bei 50°C/120 kN 15 min verpressen, in Quader 5·5·5 mm ³ zersägen.	PDLLA 5x	100 %, 70 Tage
			PDLLA 9x	100 %, 80 Tage
			PDLLA 13x	100 %, 90 Tage
6	PGA (porös) + 30% Phe + 50 % PDLLA (Boehringer) (w:w)	Partiell gelöstes Phe + PGA (porös) in wenig Wasser dispergieren, im Vakuum trocknen, PDLLA (Boehringer) in CHCl ₃ lösen, PGA/Phe in dieser Lösung dispergieren, CHCl ₃ im Vakuum entfernen, bei 50°C/120 kN 15 min verpressen, in Quader 5·5·7 mm ³ zersägen.	PDLLA (einzelne Partikel)	100 %, 10 Tage
			PDLLA (einzelne Partikel)+ PDLLA 5x	~90 %, 45 Tage
			PDLLA (einzelne Partikel)+ PDLLA 9x	~60 %, 45 Tage
			PDLLA (einzelne Partikel)+ PDLLA 13x	~60 %, 45 Tage

C.II Präparative Arbeiten

Alle Freisetzungsexperimente wurden in einer wässrigen Pufferlösung bei 37°C durchgeführt. Bestandteile der Pufferlösung waren: 0,1 M NaH₂PO₄, 0,1 M Na₂HPO₄; der pH-Wert von 7,4 wurde mit Natriumhydroxid eingestellt. Der jeweilige Freisetzungskörper wurde in einem Filterpapierumschlag im wässrigen Medium in einem Rundkolben unter ständigem sehr langsamem Rühren der Lösung angehängt. Das Volumen des Mediums wurde so eingestellt, dass die maximale Konzentration des Phenylalanins den Wert von ca. 300 mg l⁻¹ erreichte. Ein typisches Volumen war 200 ml. Um die Menge des freigesetzten Phenylalanins zu einem Zeitpunkt zu messen, wurde 1 ml der Lösung zur Bestimmung der Konzentration des Phenylalanins entnommen. Diese entnommene Menge wurde dann bei der Berechnung der Menge des freigesetzten Phenylalanins berücksichtigt:

$$m_1 = V_0 c_1, \quad m_n = (V_0 - 10^{-3}(n-1))c_n + 10^{-3} \sum_{i=1}^{n-1} c_i, \quad n \geq 2 \quad (\text{C.1})$$

wobei n die Probennummer, m_n die Masse des freigesetzten Phenylalanins (in mg) am Tag der Entnahme von Probe n , c_n die Konzentration von Phenylalanin (in mg l⁻¹) in der Probe n , V_0 das Anfangsvolumen der Pufferlösung (in l) vor der ersten Probenentnahme waren.

Die Konzentrationen des Phenylalanins in den Proben wurden mittels UV-Spektroskopie in Quarzküvetten (Quarzglas Suprasil[®], Durchlässigkeitsbereich 200-2500 nm, optischer Weg 1 cm, Vergleich-Luft) bestimmt. In der Abbildung C.2 ist das UV-Spektrum des Phenylalanins und die Kalibrationskurve für die Phenylalanin-Lösungen im Phosphatpuffer bei Konzentrationen von 60-300 mg l⁻¹ dargestellt. Die Absorptionswerte wurden bei der Wellenlänge $\lambda_{\text{max}} \sim 257,5$ nm bestimmt.

Herstellungsmethoden der Formkörper für die Freisetzungsexperimente

Alle Formkörper wurden durch uniaxiales Verpressen in einer Pressform aus Edelstahl in einer hydraulischen Presse (Paul-Otto Weber Maschinen-Apparatebau GmbH PW 10 H) hergestellt. Die Pressplatten und somit die Pressform aus Stahl wurden während des gesamten Pressvorgangs temperiert. Die Basis der Pressform hatte die Geometrie eines Rechtecks von $30 \cdot 5 \text{ mm}^2$. Somit ergab sich nach dem Pressen eine quaderförmige Geometrie der Formkörper ($30 \cdot 5 \cdot \text{Höhe} \text{ mm}^3$). Die Formkörperhöhe war von der Menge des eingesetzten Stoffes und dem Betrag der angewandten Stempelkraft abhängig.

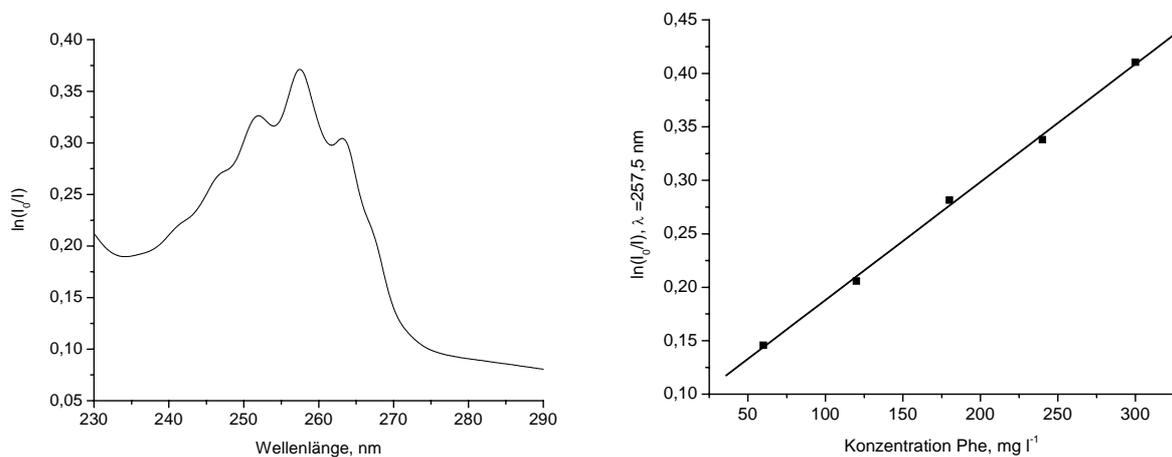


Abbildung C.2. UV-Absorptionspektrum des Phenylalanins und Abhängigkeit der Lichtabsorption bei 257,5 nm von der Konzentration des Phenylalanins im Phosphatpuffer.

Stäbchen 1 und 2. Um die Polymere mit dem Wirkstoff zu beladen, wurde eine gesättigte Lösung des Wirkstoffs in Wasser zubereitet (die Löslichkeit von Phe in Wasser bei 25°C beträgt 27 mg ml^{-1}). Das poröse PDLLA des Stäbchens 1 und das poröse PGA des Stäbchens 2 wurden in der Menge von je 270 mg in 1 ml von der Lösung dispergiert. Die Dispersion wurde an einer Ölpumpe vollständig getrocknet. Der Beladungsgrad betrug in diesem Fall 9 % ($27 \text{ mg}/297 \text{ mg}$). Die Pressbedingungen für die Mischung mit PDLLA waren 50° C, 30 kN, 15 min und für die Mischung mit PGA 150° C, 30 kN, 15 min. Abmessungen der Stäbchen: $30 \cdot 5 \cdot 2 \text{ mm}^3$.

Stäbchen 3. Die Komponenten PGA + Phe (70 % + 30 %) wurden vermischt, in einem kleinen Volumen Wasser dispergiert, zwei Stunden gerührt, dann im Vakuum getrocknet und bei 150°C / 30 kN 15 Minuten gepresst. Wegen der relativ geringen Löslichkeit konnte das Phe in Wasser nicht vollständig gelöst werden. Die Größe des Stäbchens betrug 30·5·7 mm³. Es wurde in sechs nahezu gleiche Würfel zersägt (mit der Größe 5·5·7 mm³). Die rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der Oberfläche eines Würfels ist in Abbildung C.3 dargestellt.

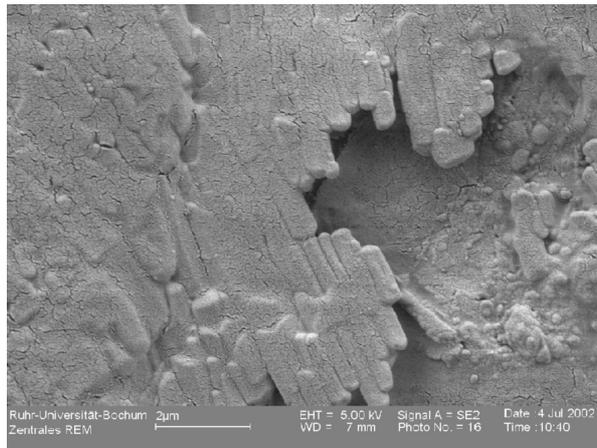


Abbildung C.3. Die rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der Oberfläche des Stäbchens 3 (PGA + 30% Phenylalanin), unbehandelt nach dem Pressen.

Beschichtung aller Freisetzungskörper. Die von den Stäbchen abgesägten Würfel wurden zur Beschichtung in eine Lösung von Hochmolekulargewicht-PLLA (Resomer[®] L210, Boehringer, Durchschnittsmolekulargewicht \bar{M}_w ca. $2 \cdot 10^5$ g mol⁻¹) oder PDLA (Resomer[®] R207, Boehringer, Durchschnittsmolekulargewicht \bar{M}_w ca. 10^5 g mol⁻¹) in Chloroform eingetaucht. Um die Viskosität und somit die Haftfähigkeit der Polymerlösungen auf der Oberfläche der Würfel zu erhöhen, wurden sehr hohe Konzentrationen verwendet (ca. 140 mg ml⁻¹). Nach jedem Eintauchen wurde der jeweilige Würfel für ca. 10 Minuten aus der Lösung genommen, damit das Lösungsmittel partiell verdunstete und die auf der Oberfläche des Würfels entstandene Schicht sich verhärtete. Nach dem letzten Eintauchen wurde der Formkörper drei Tage in einem Trockenschrank bei 37° C gehalten, um das Lösungsmittel vollständig zu entfernen.

Die entsprechenden Beschichtungen werden in der Tabelle C.1 und im Folgenden nach der Abkürzung „<Polymertyp><Zahl>x“ bezeichnet, wobei <Polymertyp> entweder PLLA für Resomer[®] L210 oder PDLLA für Resomer[®] R207 und <Zahl> Anzahl der Beschichtungsvorgänge ist. Die Bezeichnung „PLLA 8x“ bedeutet z. B. „beschichtet durch 8maliges Eintauchen in PLLA (Resomer[®] L210) in Chloroform“, „PDLLA 13x“ bedeutet „beschichtet durch 13maliges Eintauchen in PDLLA (Resomer[®] R207) in Chloroform“. Um die Polymere PLLA (Resomer[®] L210) und PDLLA (Resomer[®] R207) von den festkörperchemisch hergestellten Polymeren weiterhin zu unterscheiden, werden sie PLLA (Boehringer) und PDLLA (Boehringer) genannt. Die festkörperchemisch hergestellten Polymere werden PGA (porös) und PDLLA (porös) genannt.

Stäbchen 4 und 5. PGA und Phe (jeweils 30 %) wurden trocken vermischt. Stäbchen 5 wurde außerdem unter Zusatz von 5% PDLLA (Boehringer) hergestellt. Somit besteht das Stäbchen 4 aus 30 % Phe und 70 % porösem PGA, und das Stäbchen 5 aus 30 % Phe, 65% porösem PGA und 5 % PDLLA (Boehringer). Diese Stäbchen wurden bei einer wesentlich höheren Stempelkraft (120 kN) und einer niedrigeren Temperatur (50° C) als Stäbchen 2 und 3 gepresst. Die Pressdauer betrug 15 Minuten. Die beiden Stäbchen wurden in sechs nahezu gleiche Würfel zersägt (mit der Größe 5·5·5 mm³). Sechs Würfel aus Stäbchen 4 wurden folgendermaßen beschichtet: 8x, 11x, und 14x mit PLLA (Boehringer); und 5x, 9x, und 13x mit PDLLA (Boehringer), drei von sechs Würfeln aus Stäbchen 5 wurden 5x, 9x, und 13x mit PDLLA (Boehringer) beschichtet.

Stäbchen 6. Dieses Stäbchen besteht aus 30 % Phe, 20% PGA und 50 % PDLLA (Boehringer). Es wurde folgendermaßen hergestellt: Poröses PGA wurde mit Phenylalanin in möglichst wenig Wasser vermischt und zwei Stunden intensiv gerührt, die Mischung wurde dann im Vakuum getrocknet. Das erhaltene Pulver wurde mit der entsprechenden Menge PDLLA (Boehringer)-Chloroform-Lösung (ca. 140 mg ml⁻¹) versetzt und das Lösungsmittel wurde in Vakuum

vollständig entfernt. Die erhaltene Masse wurde bei 50° C, 120 kN, 15 Minuten gepresst. Mit dieser Methode wurde versucht, jedes einzelne mit Phe beladene PGA Partikel mit einer eigenen PDLLA-Schicht zu versehen. Nach dem Pressen wurde das Stäbchen in sechs Würfel mit den Maßen 5·5·7 mm³ zersägt, von denen drei Würfel in PDLLA (Boehringer) 5x, 9x und 13x beschichtet wurden.

C.III Ergebnisse

Die erste Freisetzung wurde mit 9 %ig beladenem Stäbchen aus porösem PDLLA durchgeführt (Stäbchen 1). Wegen einer sehr geringen Glasübergangstemperatur des porösen PDLLA (40-45° C) wurde das Stäbchen nur bei 50° C gepresst. Die ganze Menge an Phenylalanin war schon nach ca. 40 Stunden freigesetzt. Innerhalb dieser Zeit wurde nur eine Probe entnommen, somit ist keine Freisetzungskurve vorhanden. Außerdem verlor das Stäbchen nach drei Tagen im Phosphatpuffer bei 37° C seine ursprüngliche Geometrie und war teilweise zerstört und aufgelöst. D. h. die Freisetzungskörper aus dem erhaltenen porösen PDLLA sind zu instabil in der Phosphatpufferlösung und sind somit für eine Freisetzung über einen längeren Zeitraum zumindest ohne äußere Beschichtung ungeeignet. Das wässrige Medium dringt leicht durch die unbeständige Polymermatrix ein und löst die Aminosäure auf.

PGA ist dagegen partiell kristallin und hat deshalb eine viel größere Schmelztemperatur (ca. 220° C) als die Glasübergangstemperatur des porösen PDLLA. Das Stäbchen 2 wurde aus dem porösen PGA hergestellt. Da die Schmelztemperatur des porösen PGA relativ hoch ist, wurde das Stäbchen durch Pressen bei 150°C hergestellt. Der Beladungsgrad war in diesem Fall auch 9 %. Die Darstellung der Freisetzungskinetik ist in der Abbildung C.4 ersichtlich. Da die Freisetzung aus dem Stäbchen 1 so schnell verlief, wurden hier die Proben am Anfang alle 15 Minuten aus der Lösung entnommen. In diesem Fall erfolgte die Freisetzung sehr schnell (ca.

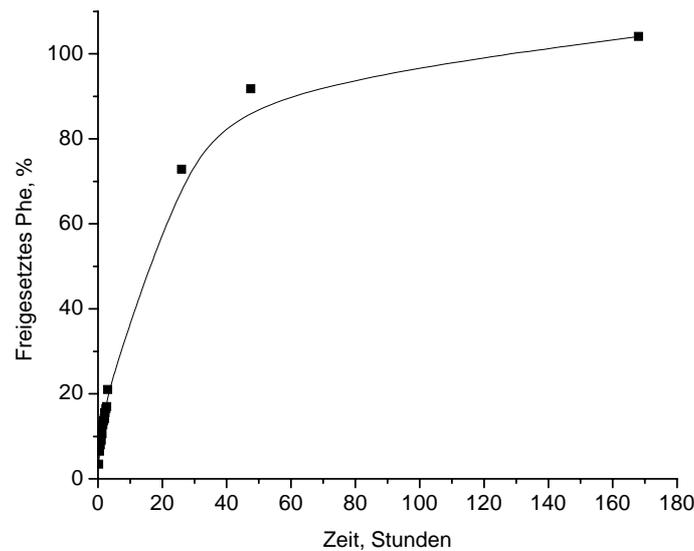


Abbildung C.4. Darstellung der Freisetzungskinetik von Phenylalanin aus dem Stäbchen 2 (PGA, 30 % Phe). 100 % Phe = 30 mg.

zwei Tage), obwohl das Stäbchen nach dem Ende der Freisetzung seine ursprüngliche Geometrie behielt. Das zeugt davon, dass die Freisetzung selbst bei einem nicht so hohen Beladungsgrad (9 %) eher diffusions- als degradationskontrolliert ist. Die Diffusion des wässrigen Mediums durch die Polymermatrix verläuft demzufolge viel schneller als die Degradation dieser Matrix. Daher kann die Freisetzung von Phe aus porösem PGA nur durch zusätzliche Aufbringung einer äußeren Polymerbeschichtung verlangsamt werden, was mit der nächsten Experimentreihe mit Stäbchen 3 getestet wurde.

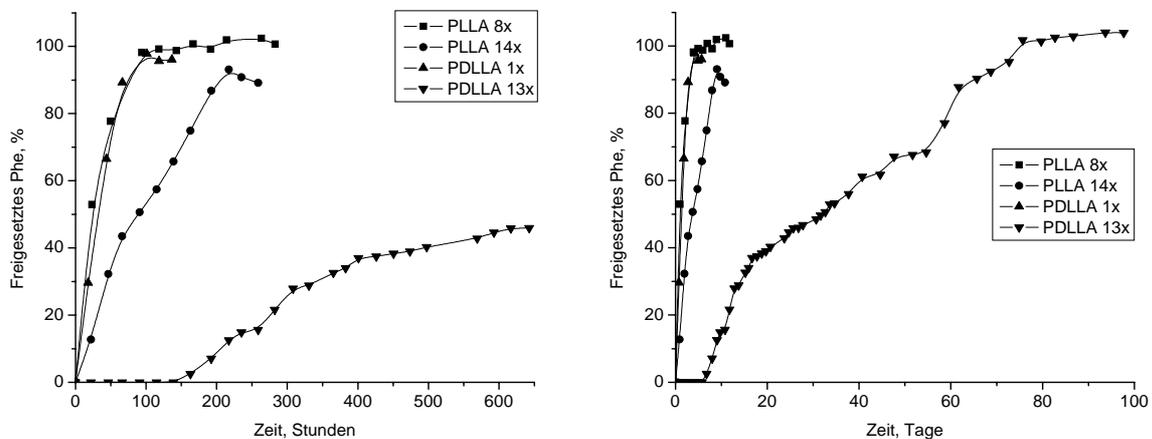


Abbildung C.5. Darstellung der Freisetzungskinetik von Phenylalanin aus dem Stäbchen 3 (PGA, 30 % Phe) mit Beschichtungen. 100 % Phe = 80 mg.

Stäbchen 3 wurde genauso wie das Stäbchen 2 hergestellt mit dem Unterschied der Größe der Substanzmengen und einem 30 %igen Beladungsgrad von Phe. Das Stäbchen wurde in sechs gleiche Würfel zersägt. Vier von den Würfeln wurden mit PLLA (Boehringer) (8x und 14x) und PDLLA (Boehringer) (1x und 13x) beschichtet. Die Freisetzungskinetik ist in Abbildung C.5 dargestellt. Bei der PLLA 8x-Beschichtung wurde die Freisetzung auf vier Tage verlangsamt, man sieht dennoch einen sehr starken "burst effect". Bei der PLLA 14x-Freisetzung ist der „burst effect“ nicht so groß, die Freisetzungsdauer beträgt ca. 9 Tage. Daraus ist ersichtlich, dass die PDLLA-Beschichtungen viel wirksamer sind als die PLLA-Beschichtungen. Die PDLLA 1x-Beschichtung ist vergleichbar mit der PLLA 8x-Beschichtung. Bei der PDLLA 13x-Beschichtung verlief die Freisetzung innerhalb von 75 Tagen fast linear. Daraus ergibt sich die Frage, warum sich die beiden Beschichtungen so unterschiedlich auf die Freisetzungskinetiken auswirken. Die Morphologie der Oberflächen dieser Schichten ähneln sich sehr (Abbildung C.6). Die auftretenden Poren sind vermutlich durch Verdunstung des Lösungsmittels entstanden. Der Unterschied zwischen PLLA- und PDLLA-Beschichtungen liegt offenbar an der Struktur der festen Polymere. Wie schon im Kapitel B erwähnt wurde, ist das PDLLA ataktisch und kann daher keine kristalline Struktur bilden. Das PLLA ist dagegen ein isotaktisches Polymer und ist partiell kristallin. Es ist härter und sein Schmelzpunkt ist viel höher als der des PDLLA. Bei der Beschichtung mit PLLA-Chloroform-Lösungen bilden sich einzelne PLLA-Kristallite während das Lösungsmittel verdunstet und nicht so eine kompakte Struktur wie aus amorphem PDLLA. Durch die Risse zwischen den einzelnen Kristalliten kann das wässrige Medium leicht dort durchdringen, deshalb ist eine PLLA-Beschichtung nicht in der Lage, die Freisetzung von Phenylalanin wesentlich zu verlangsamen. PDLLA ist dagegen völlig amorph und bei Verdunstung des Chloroforms bildet es einen massiven Film, der für das wässrige Medium nur wenig durchlässig ist. Die Schichten aus PDLLA besitzen vermutlich keine durchgehend poröse Struktur auf ihrer Oberfläche, sonst könnte diese Schicht die Freisetzung nicht so überaus

effektiv verlangsamen. Offensichtlich erfolgt die Freisetzung von Phenylalanin meistens durch Diffusion des wässrigen Mediums durch die Polymermatrix. Die Polymerschicht behält selbst nach 100 Tagen nach dem Beginn der Freisetzung ihre ursprüngliche Form und zersetzte sich nur unwesentlich (Abbildung C.7).

Alle Stäbchen aus Polyglycolid wurden bisher beim Verpressen auf 150° C erhitzt, weil das Polyglycolid eine vergleichsweise hohe Schmelztemperatur hat. Diese Temperatur ist für temperaturempfindliche Wirkstoffe wie z. B. Proteine nicht anwendbar. Deshalb musste eine geringere Temperatur gewählt werden, um die thermische Belastung für den Wirkstoff zu vermeiden. Mit einem einfachen Experiment kann demonstriert werden, welchen Vorteil das Verpressen bei geringen Temperaturen und hohen Drücken bieten kann.

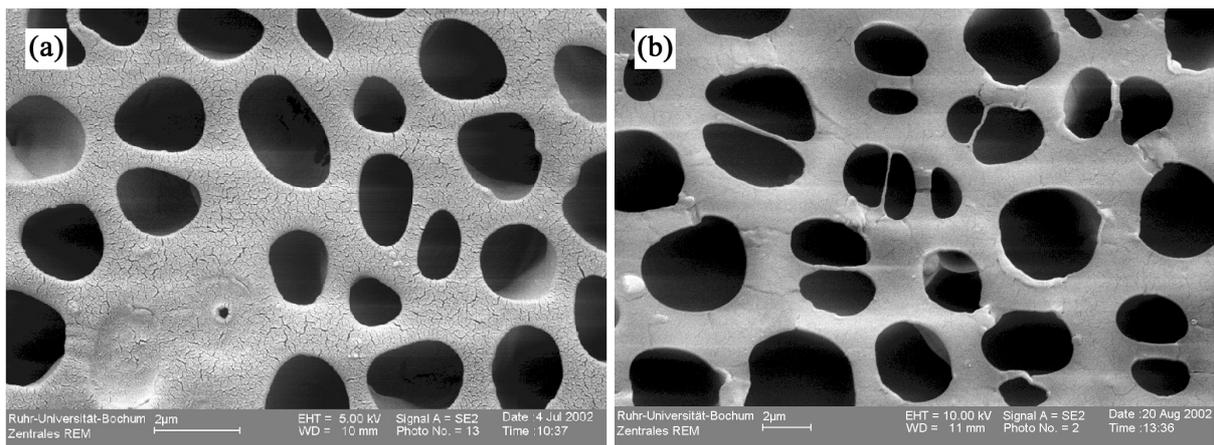


Abbildung C.6. REM-Aufnahmen der PLLA 8x- (a) und PDLLA 13x- (b) Schichten auf dem Stäbchen 3 (beschichtet durch Eintauchen in Polymer/ CHCl_3 Lösungen).

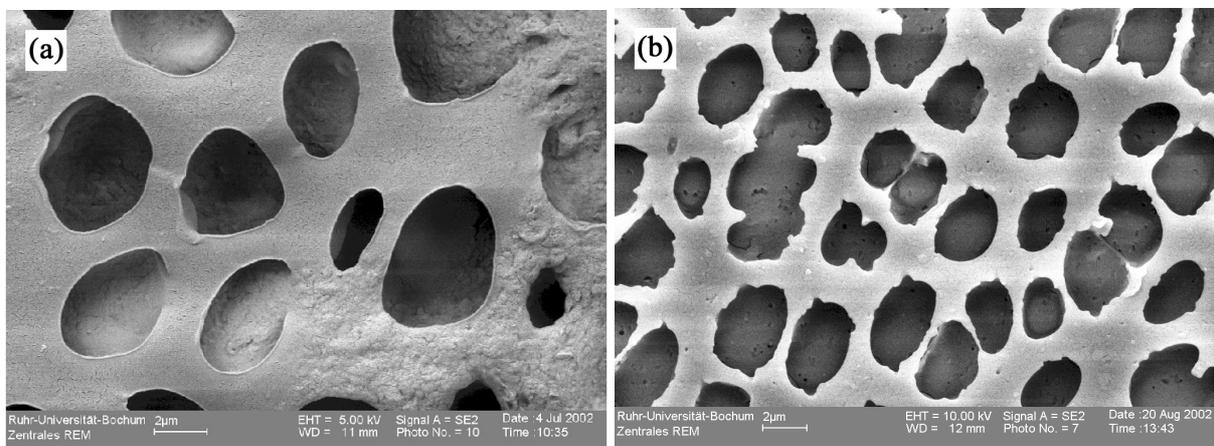


Abbildung C.7. REM-Aufnahmen der teilweise zersetzten PLLA 8x-Schicht auf dem Stäbchen 3 nach 14 Tagen Freisetzung (a) und PDLLA 13x-Schicht auf dem Stäbchen 3 nach 100 Tagen Freisetzung (b).

Acetylsalicylsäure ist ein bekanntes Beispiel für einen temperaturempfindlichen Wirkstoff, weil sie in Gegenwart von Wasser bei erhöhten Temperaturen in Salicylsäure und Essigsäure gespalten wird. Außerdem kann eine Polymerisation der Acetylsalicylsäure zur Polysalicylsäure mit Bildung von Essigsäure auftreten^[79] (Abbildung C.8). Das mikroporöse PGA wurde mit 30 % Acetylsalicylsäure beladen, indem die Komponenten in wenig Wasser gerührt und dann getrocknet wurden. Das erhaltene Pulver wurde in zwei Stäbchen bei verschiedenen Bedingungen gepresst (50°C / 120 kN / 15 min und 150°C / 50 kN / 15 min). Die Stäbchen wurden dann gemörsert und mit CDCl₃ extrahiert, um ¹H-NMR-Spektren aufzunehmen.

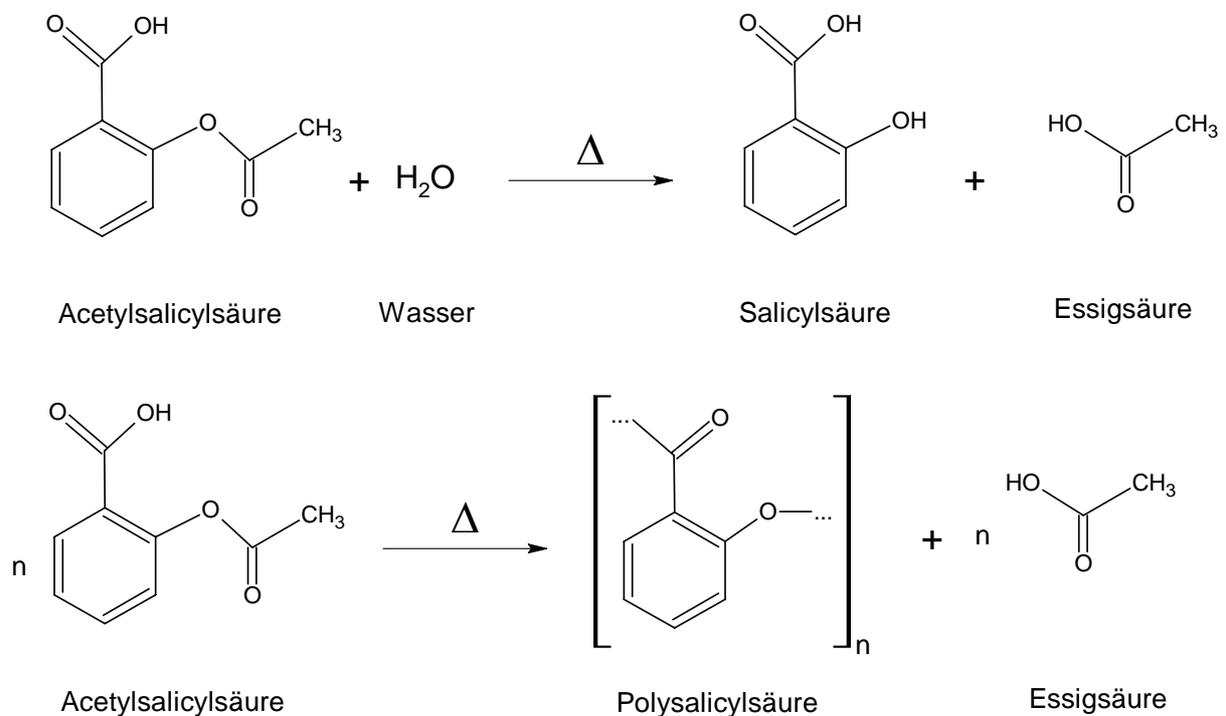


Abbildung C.8. Mögliche Zersetzungsreaktionen von Acetylsalicylsäure durch Erhitzen an Luft.

In den ¹H-NMR Spektren ist ersichtlich, dass keine Zersetzung der Acetylsalicylsäure bei 50° C stattgefunden hat (Abbildung C.9). Bei 150° war ein großer Anteil der Acetylsalicylsäure zu Salicylsäure umgesetzt. In Abbildung C.9 ist der Vergleich der aromatischen Protonen im ¹H-NMR Spektrum abgebildet. Das Singulett bei 7,27 ppm entspricht dem Rest-Chloroform-Anteil in CDCl₃.

Deshalb wurde eine neue Methode zur Präparation von Formkörpern getestet: einfaches Vermischen von Phenylalanin mit PGA mit oder ohne Zusatz von PDLA (Boehringer) und Verpressen unter sehr hoher Stempelkraft (120 kN) bei 50° C (Stäbchen 4 ohne Zusatz von PDLA (Boehringer), Stäbchen 5 mit 5 % PDLA (Boehringer)). Ein Zusatz von PDLA vor dem Verpressen kann als Fließhilfsmittel dienen. Die Freisetzungskurven aus den Würfeln, die aus dem Stäbchen 4 hergestellt wurden (ohne PDLA Zusatz, mit Beschichtung), sind in Abbildung C.10 dargestellt. Die PLLA-Beschichtungen hatten auch hier keinen bedeutenden Einfluss auf die Freisetzungskinetik. Bei der PDLA 13x-Beschichtung läuft die Freisetzung

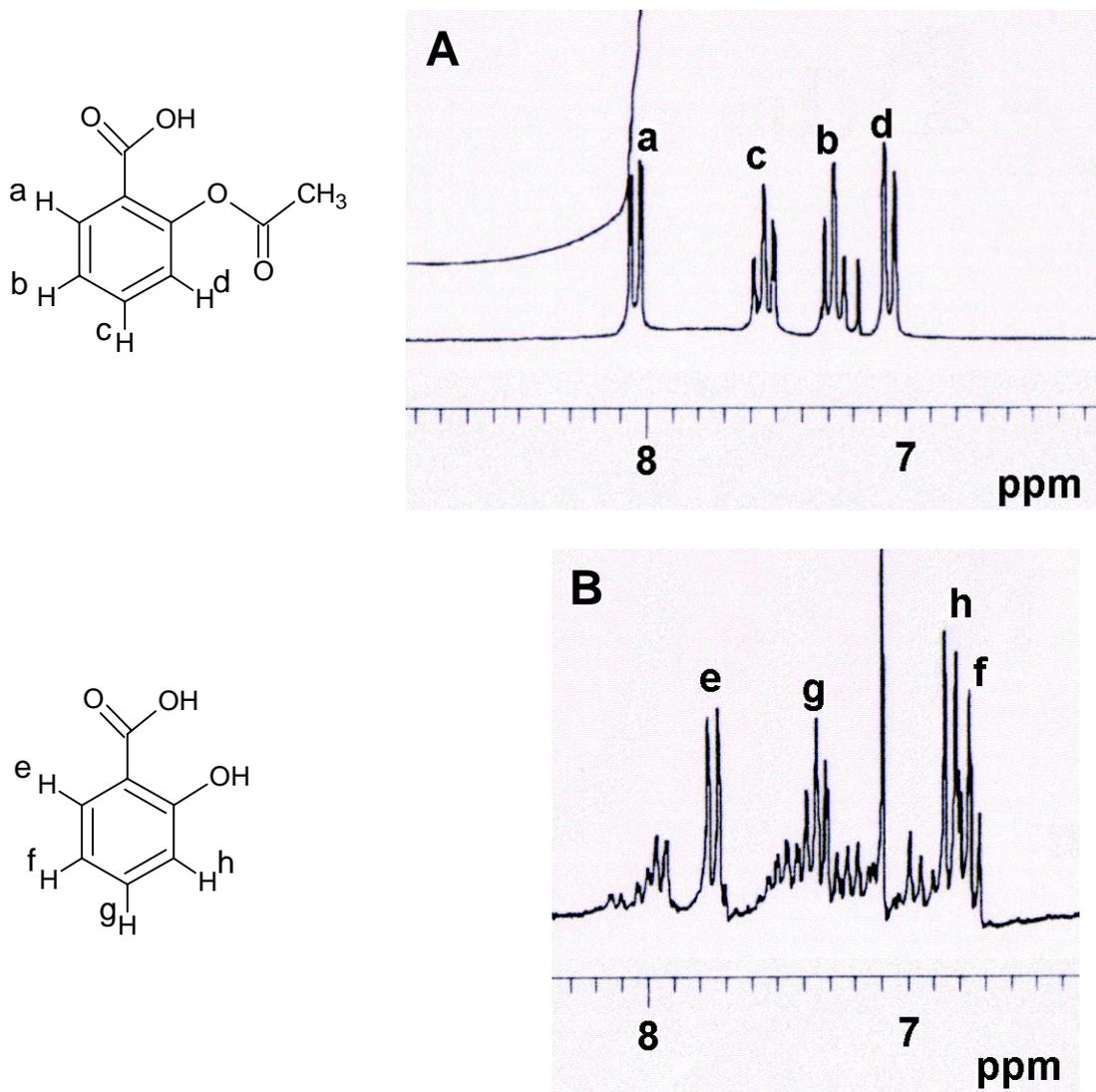


Abbildung C.9. ¹H-NMR Spektren der Acetylsalicylsäure in CDCl₃ (reextrahiert aus einem bei 50° C / 120 kN / 15 min gepressten Stäbchen (A) und einem bei 150° C / 30 kN / 15 min gepressten Stäbchen). Dargestellt ist der Bereich der aromatischen Protonen.

aber langsamer als im Fall von Stäbchen 3, das unter kleineren Druck hergestellt wurde (Abbildung C.5). Anstatt 75 Tage für Stäbchen 3 läuft hier die Freisetzung ca. 90 Tage lang fast linear. Offensichtlich haben die neuen Herstellungsbedingungen keinen negativen Einfluss auf die Freisetzungskinetik. Im Gegenteil, die viermal größere Stempelkraft machte den Formkörper kompakter, was letztlich die Freisetzungskinetik verlangsamt hat. In Abbildung C.10 ist eine Korrelation zwischen der Anzahl der Beschichtungsvorgänge und der Freisetzungsdauer zu erkennen.

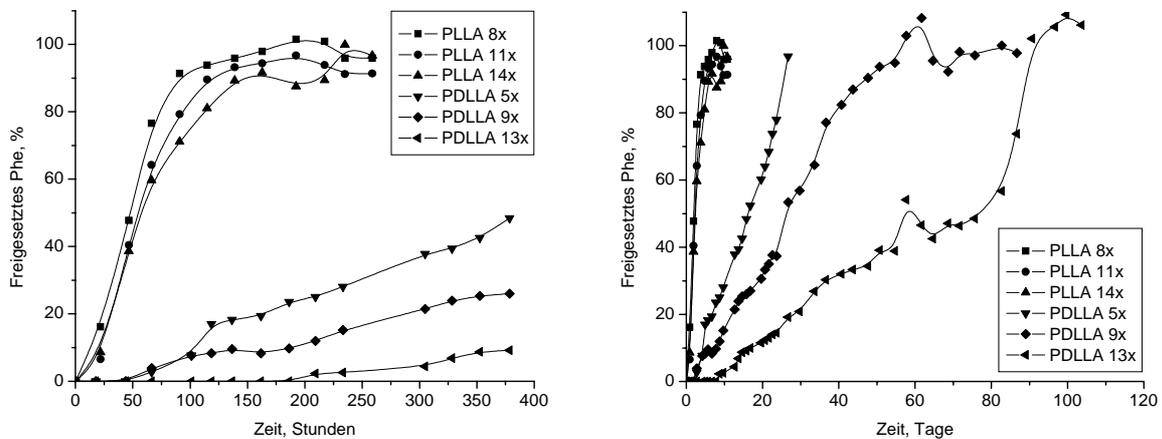


Abbildung C.10. Darstellung der Freisetzungskinetik von Phenylalanin aus dem Stäbchen 4 (PGA, 30 % Phe) mit Beschichtungen. 100 % Phe = 60 mg.

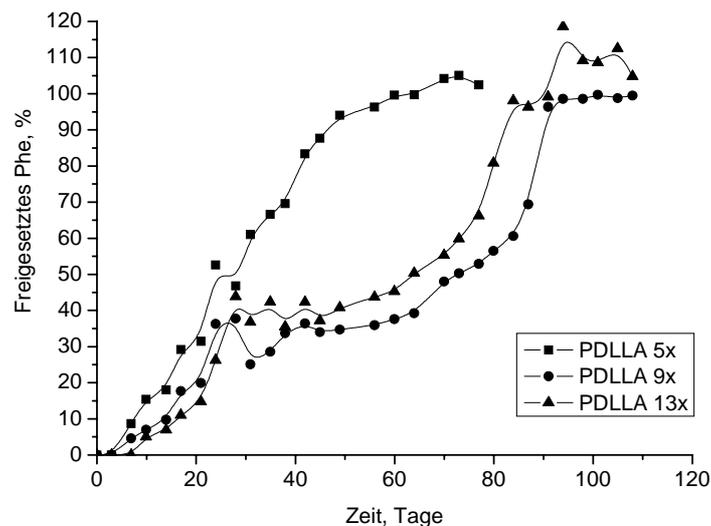


Abbildung C.11. Darstellung der Freisetzungskinetik von Phe aus dem Stäbchen 5 (PGA, 30% Phe, 5% PDLLA) mit Beschichtungen. 100 % Phe = 70 mg.

Abbildung C.11 zeigt die Darstellung der Freisetzungskinetik aus den Würfeln, die aus dem Stäbchen 5 hergestellt wurden. Wird ein Vergleich mit Stäbchen 4 vorgenommen (Abbildung C.10), ist ersichtlich, dass die Freisetzungen für die Würfel mit PDLLA 5x- und PDLLA 9x-Beschichtungen langsamer verliefen. Die Freisetzung für den Würfel mit PDLLA 13x-Beschichtung dauert genauso lang, wie die analoge Freisetzung für Stäbchen 4. In diesem Fall ist sehr interessant, dass die Freisetzungen nicht signifikant von den Beschichtungen abhängen. Beispielsweise laufen die Freisetzungen fast gleich für die PDLLA 9x- und PDLLA 13x-beschichteten Würfel. Vermutlich bildet das PDLLA (Boehringer) innerhalb des Stäbchens eine Art Polymernetz, das für das wässrige Medium schwer durchlässig ist. Deshalb dringt das wässrige Medium in das Innere eines Formkörpers mit PDLLA (Boehringer)-Zusatz nur langsam durch. Für die Proben mit dicken Beschichtungen ist es unerheblich, weil die Freisetzungsgeschwindigkeit durch die Durchdringungsgeschwindigkeit des wässrigen Mediums durch die äußere Polymerschicht limitiert wird.

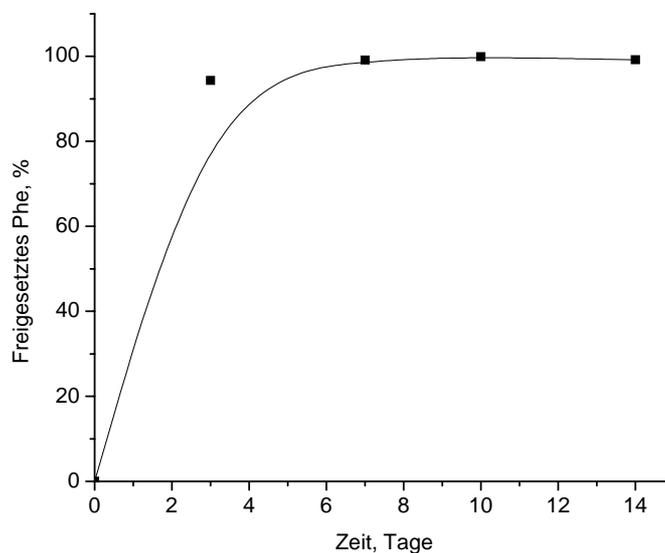


Abbildung C.12. Darstellung der Freisetzungskinetik von Phe aus dem Stäbchen 6 (PGA, 30% Phe, 50% PDLLA) mit einzelnen beschichteten Partikeln. 100 % Phe = 70 mg.

Für kleinere Polymerschichten beeinflusst die Durchdringungsgeschwindigkeit des wässrigen Mediums ins Innere des Formkörpers die Freisetzungskinetik in immer höherem Maße. Die Diffusion durch die äußere Polymerschicht erfolgt für kleine Schichten relativ schnell.

Da ohne äußere Polymerschicht jede der oben angeführten Freisetzungen eine viel geringere Dauer hätte, bestand das Problem, die Freisetzungskinetik zu verlangsamen, auch wenn ein beschichteter Freisetzungskörper zufällig abbricht. Denn wenn ein Implantat zufällig im Körper abbricht, würde man auf diese Weise kurzfristig eine Dosis erhalten, die sonst erst innerhalb von drei Monaten freigesetzt würde. Dafür wurde das Stäbchen 6 hergestellt, in dem alle beladenen PGA-Partikel vor dem Pressen mit PDLLA (Boehringer) aus einer Lösung in Chloroform beschichtet wurden. Wie man auf der Darstellung der Freisetzung erkennt (Abbildung C.12), kann ein solches Verfahren die Freisetzungsdauer bis auf fünf Tagen verlangsamen. Im Vergleich zu den Formkörpern mit einer äußeren PDLLA-Beschichtung kann dieses Verfahren hinsichtlich Effektivität nur mit der PDLLA 1x-Beschichtung verglichen werden.

C.IV Untersuchung der Abhängigkeit der Freisetzungskinetik vom Herstellungsdruck

Betrachtet man die unterschiedlichen zeitlichen Verläufe der Freisetzung von Phenylalanin aus den bei verschiedenen Stempelkräften hergestellten PGA-Formkörpern (vgl. der Stäbchen 4 und 5), so liegt der Schluss nahe, dass es ebenfalls eine analoge Korrelation der Freisetzungskinetik für Formkörper aus porösem PDLLA mit Goserelin als Wirkstoff gibt. Für diese Untersuchungen wurde mikroporöses PDLLA mit 30 % Goserelin durch das oben beschriebene Verfahren beladen. Je 500 mg der PDLLA-Goserelin-Mischung wurden mit verschiedenen Stempelkräften in einer Pressform verpresst. Die Stempelkräfte betragen 20, 40, 60 und 80 kN. Durch die bekannte Pressoberfläche $30 \cdot 5 = 150 \text{ mm}^2$ kann man folgende Drücke berechnen: 133, 266, 400 und 533 MPa. Von diesen Stäbchen wurden Würfel mit einer Länge von ca. 5 mm abgesägt und

mit der oben beschriebenen Methode mit einer PDLLA (Boehringer)-Aceton Lösung durch Eintauchen 3x mit PDLLA beschichtet. In der Tabelle C.2 sind die Massen dieser Stäbchen vor und nach der Beschichtung und die Gehalte des Goserelins in den Stäbchen angegeben.

Tabelle C.2. Würfel (ca. $5 \cdot 5 \cdot 3 \text{ mm}^3$; s.u.) aus einer PDLLA-Goserelin-Mischung mit Beschichtung für die Untersuchung der Abhängigkeit der Freisetzungskinetik vom Herstellungsdruck.

Stempelkraft bei der Herstellung [kN]	Masse vor der Beschichtung [mg]	Masse nach der Beschichtung [mg]	Massenzunahme [mg (%)]	Gehalt des Goserelins [mg]
20	69,0	82,7	13,7 (19,9)	20,7
40	64,1	77,9	13,8 (21,5)	19,2
60	79,3	95,0	15,7 (19,8)	23,8
80	68,1	79,5	11,4 (16,7)	20,4

Bei Kenntnis der Dichte des PDLLA ($1,218 \text{ mg} \cdot \text{mm}^{-3}$) kann man die theoretische Dicke der PDLLA-Schichten auf den Würfeln berechnen. Das Volumen des PDLLA in der Oberflächenschicht eines Würfels mit der Geometrie $5 \cdot 5 \cdot h \text{ mm}^3$, wobei h die Höhe des Würfels ist, kann man annähernd mit der folgenden Formel bestimmen:

$$V = (h + 2d)(5 + 2d)^2 - 25h = 8d^3 + (4h + 40)d^2 + (20h + 50)d \quad (\text{C.2})$$

wobei d die Dicke der Schicht ist. Da $d \ll h$, $8d^3 \ll (20h + 50)d + (4h + 40)d^2$, kann man das erste Glied im rechten Teil der Gleichung vernachlässigen:

$$V \approx (20h + 50)d + (4h + 40)d^2 \quad (\text{C.3})$$

Daraus kann die Schichtdicke d berechnet werden:

$$d = \frac{-h' + \sqrt{(h')^2 + 4h''V}}{2h''} \quad (\text{C.4})$$

wobei $h' = 20h + 50$, $h'' = 4h + 40$.

Bei Kenntnis der Dichte der hergestellten Würfel (ohne Beschichtung) ρ kann man auch die Porosität P in % bestimmen:

$$P = \frac{\rho_0 - \rho}{\rho_0} \cdot 100\% \quad (\text{C.5})$$

wobei ρ_0 die theoretische Dichte der PDLLA-Goserelin-Mischung ist. Da die genaue Dichte der Goserelin-Kristalle unbekannt ist, wurde die theoretische Dichte der PDLLA-Goserelin-Mischung wie die Dichte von einer Mischung aus 30 % Zucker und 70 % PDLLA berechnet. In der Tabelle C.3 sind die h , V , d , ρ , P – Werte für die bei unterschiedlichen Drücken hergestellten Würfel angegeben.

Tabelle C.3. Die Werte für die bei unterschiedlichen Drücken hergestellten Würfel: gemessene Höhen vor der Beschichtung h , berechnete Dichten der Würfel nach dem Pressen ρ , berechnete Volumina des PDLLA auf der Oberfläche der Würfel nach der Beschichtung V , die berechnete Dicke der PDLLA-Schichten d und die Porosität P .

Stempelkraft bei der Herstellung [kN]	h [mm]	ρ [mg·mm ⁻³]	V [mm ³]	d [mm]	P [%]
20	3,15	0,88	11,25	0,10	34,1
40	2,85	0,90	11,33	0,10	32,4
60	2,65	1,20	12,89	0,12	10,0
80	2,35	1,16	9,36	0,09	12,8

In der Abbildung C.13 ist die Freisetzungskinetik von Goserelin aus diesen Würfeln dargestellt. Die Freisetzungskurven wurden in Hinblick auf die hydrolytische Zersetzung von Goserelin korrigiert (s. Erklärung im Kapitel D). Anscheinend ist die Freisetzungskinetik in diesem Fall vom Herstellungsdruck unabhängig. Den Unterschied zu den PGA-Formkörpern kann man erklären, wenn man die Schmelztemperatur (bzw. die Glasübergangstemperatur) beider Polyester betrachtet. Die Freisetzung sollte langsamer für kompaktere Formkörper, d. h. für Formkörper mit geringerer Porosität erfolgen. Die Glasübergangstemperatur von PDLLA ist ca. 45° C, und durch Pressen bei 50° C erzielt man eine sehr gute Kompaktierung selbst bei nicht sehr hohen Stempelkräften. Die Schmelztemperatur von PGA ist aber verhältnismäßig hoch (mehr als 200° C), deshalb kann man bei 50° C eine gute Kompaktierung nur durch eine sehr hohe Stempelkraft erzielen.

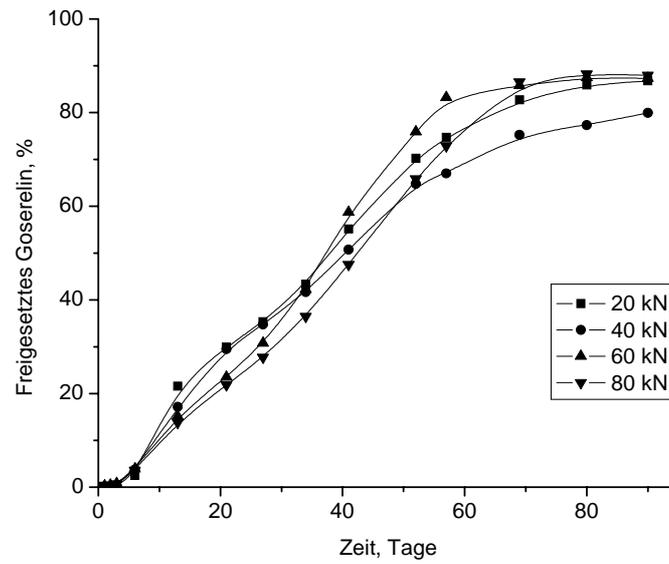


Abbildung C.13. Darstellung der Freisetzungskinetik von Goserelin aus bei verschiedenen Drücken hergestellten Würfeln (poröses PDLLA, 30 % Goserelin), mit PDLLA 3x-Beschichtung. 100 % Goserelin = ca. 20 mg.

D. Freisetzung aus extrudierten Formkörpern

D.I Grundlagen

Die Extrusion ist eine gängige Methode zur Herstellung zylindrischer Formkörper mit einer relativ kleinen Querschnittsfläche (4 mm^2 und weniger). Extrusion ist ein Vorgang, bei dem eine gegebene Substanz durch eine kleine Öffnung im Boden eines Behälters mit einem Stempel bei einer konstanten Temperatur herausgepresst wird (Abbildung D.1).

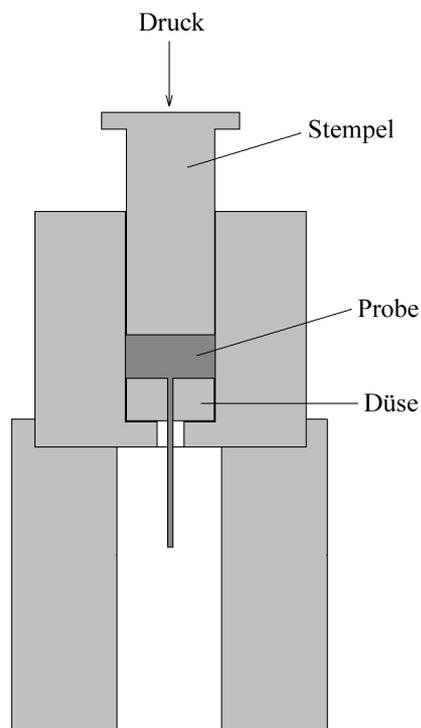


Abbildung D.1. Der in der Werkstatt der Universität Duisburg-Essen angefertigte Extruder.

Die Extrusion eines Polymers erfolgt üblicherweise bei seiner Schmelz- bzw. Glasübergangstemperatur oder bei etwas höherer Temperatur. Das führt oft zu hohen Extrusionstemperaturen, die für temperaturempfindliche Wirkstoffe wie Proteine und Polypeptide ungeeignet sind. Deshalb werden für die Extrusion oft Polymere auf der Basis von Poly(D,L-lactid) verwendet.^[14,16] Diese Polymere haben eine sehr niedrige

Glasübergangstemperatur von etwa 45° C. Zur Reduzierung der Extrusionstemperatur können auch Polymermischungen mit nicht vollständig entferntem Lösungsmittel verwendet werden.^[114,115] Durch Lösungsmittelreste werden die Polymere viel weicher, sogar wenn es sich nur um geringe Mengen Lösungsmittel handelt. Wie auch im Fall mit uniaxial gepressten Formkörpern erfolgt die Wirkstofffreisetzung aus extrudierten Formkörpern in wässrigen Medien relativ schnell. Um die Freisetzung zu verlangsamen, werden oft äußere Polymerbeschichtungen verwendet, die aus Lösungen von reinen Polymeren in organischen Lösungsmitteln gewonnen werden.^[14,16,114,115] Äußere Polymerbeschichtungen können die Freisetzung wesentlich verlangsamen (manchmal bis zu drei Monaten und mehr). Aus einigen Untersuchungen wurde geschlossen, dass die äußere PDLLA-Schicht für wässrige Lösungen undurchlässig ist und keine Freisetzung durch eine zusätzliche Polymerschicht erfolgen kann.^[114] Die Untersuchungen im Kapitel C ergaben, dass diese Vermutung nicht der Wahrheit entspricht. Die Formkörper können völlig mit einer äußeren Polymerschicht bedeckt sein und trotzdem eine Freisetzung aufweisen. Ein weiteres Verfahren zur Verlangsamung der Freisetzung ist die Verwendung von Copolymeren auf der Basis von ϵ -Caprolacton.^[14,16,116] Poly(ϵ -Caprolacton)-Ketten sind sehr hydrophob und viel widerstandsfähiger gegenüber Hydrolyse als Polylactid. Ein hoher Anteil an Poly(ϵ -Caprolacton) in einem Polymer kann jedoch eine wesentliche Erhöhung der Extrusionstemperatur ergeben.

D.II Präparative Arbeiten.

In Tabelle D.1 ist die Zusammensetzung der extrudierten Stäbchen mit kurzen Angaben zur Wirkstofffreisetzung aufgeführt.

Die Extrusionsversuche der Stäbchen 7-8 wurden mit Hilfe des Extruders Rheoflixxer[®] bei der Firma Novosis (Miesbach) durchgeführt. Vor der Extrusion wurde jede Mischung in der

Pressform für ca. 10 min mit der Hand vorgepresst. Nach dem Einbau der Pressform in den Extruder musste ca. 20 Minuten gewartet werden, bis sich die Temperatur im ganzen System konstant eingestellt hatte.

Stäbchen 10 wurde mit Hilfe eines Extruders hergestellt, der in der Werkstatt der Universität Duisburg-Essen angefertigt wurde (Abbildung D.1). Die Substanz wurde in einen runden Behälter aus Edelstahl gegeben, in dessen Boden eine Düse aus Silberstahl mit einem kleinen Loch in der Mitte (1 mm im Durchmesser) vorhanden war. Die ganze Pressform wurde bis zu einer bestimmten Temperatur erhitzt und dann konstant gehalten. Der Stoff wurde mit einem Stempel aus Silberstahl mit Hilfe einer hydraulischen Presse durch das Loch in der Düse herausgepresst. Dabei ist zu beachten, dass die Düse, der Stempel und der Behälter aus verschiedenen Materialien hergestellt wurden. Bei einem Extrusionsversuch mit einem Extruder, in dem alle Teile aus Edelstahl hergestellt wurden, haftete der Stempel an der Behälterwand und konnte nicht mehr entfernt werden. Vor jeder Extrusion wurde der zu extrudierende Stoff in der hydraulischen Presse ca. 30 Minuten bei ca. 5 kN vorgepresst und dabei temperiert.

Zur Beladung der porösen Polymere mit einem Wirkstoff wurden die entsprechenden Mengen in möglichst wenig Wasser dispergiert, ca. 2 Stunden intensiv gerührt und in Vakuum vollständig getrocknet.

Stäbchen 7 und 8 wurden durch eine ähnliche Herstellungsmethode wie Stäbchen 6 angefertigt, indem jede einzelne mit einem Wirkstoff beladene PGA-Partikel mit einer Schicht aus PDLLA (Boehringer) versehen wurde. Dafür wurde das mit dem jeweiligen Wirkstoff beladene PGA-Pulver mit PDLLA (Boehringer) in Aceton (Konzentration $\sim 140 \text{ mg ml}^{-1}$) vermischt und das Lösungsmittel im Vakuum vollständig entfernt. Anstelle des Chloroforms wurde Aceton als biokompatibleres Lösungsmittel gewählt. Die Freisetzungskörper bestanden aus 1 cm langen Zylindern, die aus den extrudierten Stäbchen abgesägt wurden.

Tabelle D.1. Zusammenfassung der Freisetzungsexperimente aus extrudierten Stäbchen. (Phe=L-Phenylalanin)

Nr.	Bestandteile	Herstellung und Pressbedingungen	Beschichtung	Freisetzungskinetik
7	PGA (porös) +30 % Phe +50 % PDLLA (Boehringer) (w:w)	Partiell gelöstes Phe + PGA (porös) in wenig Wasser dispergieren, im Vakuum trocknen, PDLLA (Boehringer) in Aceton lösen, PGA/Phe in dieser Lösung dispergieren, Aceton im Vakuum entfernen. Extrusion bei 110°C.	keine	100 %, 1 Tag
			PDLLA 3x	100 %, 25 Tage
			PDLLA 5x	80 %, 35 Tage
			PDLLA 7x	40 %, 35 Tage
			PDLLA 9x	100 %, 35 Tage
8	PGA (porös) +30 % Goserelin +50 % PDLLA (Boehringer) (w:w)	Partiell gelöstes Goserelin + PGA (porös) in wenig Wasser dispergieren, im Vakuum trocknen, PDLLA (Boehringer) in Aceton lösen, PGA/Goserelin in dieser Lösung dispergieren, Aceton im Vakuum entfernen. Extrusion bei 110-125°C.	keine	91..96 %, 3 Tage
9	PDLLA (porös) + 30 % Goserelin (w:w)	Partiell gelöstes Goserelin + PDLLA (porös) in wenig Wasser dispergieren, im Vakuum trocknen. Extrusion bei 70°C.	PDLLA 1x	45 %, 80 Tage
			PDLLA 3x	43 %, 80 Tage
			PDLLA 5x	59 %, 80 Tage
			PDLLA 7x	50 %, 80 Tage
			PDLLA 9x	50 %, 80 Tage
10	PDLLA (porös) + 30 % Goserelin (w:w)	Partiell gelöstes Goserelin + PDLLA (porös) in wenig Wasser dispergieren, im Vakuum trocknen. Extrusion bei 70°C.	PDLLA 2x	77 %, 60 Tage
			PDLLA 2x	65 %, 60 Tage
			PDLLA 2x	76 %, 60 Tage

Die Beschichtung der abgesägten Zylinder wurde genauso wie die Beschichtung der gepressten Formkörper durchgeführt mit dem Unterschied, dass das PDLLA (Boehringer) nicht in Chloroform, sondern in Aceton gelöst wurde. Die Konzentration von dieser Lösung betrug ca. 140 mg l⁻¹. Ein extrudierter Zylinder wurde in die Lösung eingetaucht, anschließend herausgenommen und an der Luft für 10 Minuten getrocknet. Danach erfolgte ein weiterer Tauchvorgang. Nach dem letzten Eintauchen wurde das Lösungsmittel in einem Trockenschrank bei 37° C vollständig entfernt.

Für die Freisetzungsexperimente wurde der jeweilige Formkörper in einem Umschlag aus Filterpapier in einem Kolben angehängt. Der Kolben war mit einer Phosphatpufferlösung gefüllt

und wurde dicht verschlossen. Die Lösung wurde ständig sehr langsam bei 37° C (Trockenschrank) gerührt. Die Pufferlösung bestand für Experimente mit Phenylalanin aus 0,1 M Na₂HPO₄, 0,1 M NaH₂PO₄, mit NaOH auf pH 7,4 eingestellt, für Experimente mit Goserelin wurde derselben Lösung zusätzlich 5 % (v:v) Ethanol zugefügt, um eine Adsorption des Wirkstoffes an den Wänden des Gefäßes zu verhindern.

Vom extrudierten Stäbchen 7 wurden zwei 1 cm lange Zylinder mit den Massen von 23,3 und 23,5 mg abgesägt. Die Freisetzungsexperimente wurden in 3 ml Pufferlösung durchgeführt. Für die Bestimmung der Menge des freigesetzten Phenylalanins wurde je 1 ml der Lösung entnommen; einmal einen Tag und einmal zwei Tage nach Beginn der Freisetzung. Nach der Entnahme der Proben wurde das Volumen wieder auf 3 ml aufgefüllt. Die Menge des freigesetzten Phenylalanins wurde nach den folgenden Formeln bestimmt:

$$m_1 = 3c_1, m_2 = 3c_2 + c_1 \quad (\text{D.1})$$

wobei m_n die Menge des freigesetzten Phenylalanins (in mg) und c_n dessen Konzentration (in mg l⁻¹) am Tag n sind.

Die Freisetzungen aus den beschichteten Zylindern des Stäbchens 7 wurden in 10 ml Phosphatpuffer durchgeführt. Nach der Entnahme einer Probe (1 ml) wurde das Volumen wieder auf 10 ml aufgefüllt. Die Menge des freigesetzten Phenylalanins wurde nach den folgenden Formeln bestimmt:

$$m_1 = 0,01c_1, m_n = 0,01c_n + 0,001 \sum_{i=1}^{n-1} c_i, n \geq 2 \quad (\text{D.2})$$

wobei m_n die Menge des freigesetzten Phenylalanins (in mg), c_n dessen Konzentration (in mg l⁻¹) in der Probe Nummer n sind. Die Konzentration des Phenylalanins in den Proben wurde mittels UV-Spektroskopie bestimmt (s. Kapitel C).

Zur Bestimmung der Menge des freigesetzten Goserelins zu einem bestimmten Zeitpunkt wurde 1 ml der Pufferlösung entnommen, um die Konzentration des Wirkstoffes in der Lösung zu

messen. Diese Entnahme der Lösung wurde bei der Berechnung der freigesetzten Goserelin-Menge nach den folgenden Formeln berücksichtigt:

$$m_1 = V_0 c_1, \quad m_n = (V_0 - 10^{-3}(n-1))c_n + 10^{-3} \sum_{i=1}^{n-1} c_i, \quad n \geq 2 \quad (\text{D.3})$$

wobei n die Probennummer, m_n die Menge des freigesetzten Goserelins (in mg), c_n die Konzentration des Goserelins (in mg l⁻¹) in der Probe n und V_0 das Anfangsvolumen der Pufferlösung (in l) sind.

Die Bestimmung der Konzentration des Goserelins in den Proben wurde an einer HPLC-Anlage in der Firma Novosis/Miesbach durchgeführt (Scheidesäule „Jupiter C18 50x2 mm“, Pufferlösung A – 1% (v/v) CF₃COOH in H₂O, Pufferlösung B – 1% (v/v) CF₃COOH, 50% (v/v) CH₃CN in H₂O, Eluent – 50% A, 50% B, ohne Gradient).

D.III Ergebnisse.

Bevor die mit einem Wirkstoff beladenen Stäbchen extrudiert wurden, wurden einige Testversuche am Extruder durchgeführt.

Eine trockene Mischung aus 70 % PDLLA (Boehringer) und 30 % festkörperchemisch hergestelltem PGA wurde durch gemeinsames Zerreiben der Polymere in einem Mörser hergestellt. Die Mischung ließ sich nur bei 160°C extrudieren, das Produkt kam dabei allerdings als Flüssigkeit heraus (vermutlich wegen des vollständigen Schmelzens des PDLLA). Solche hohen Temperaturen sind für die Herstellung der mit einem temperaturempfindlichen Wirkstoff beladenen biodegradierbaren Implantate ungeeignet.

Der zweite Testversuch am Extruder erfolgte mit derselben Mischung aus 70 % PDLLA und 30 % PGA. Diesmal wurde die Mischung mit wenig Aceton versetzt und 1 Stunde intensiv gerührt. Das Aceton wurde im Vakuum entfernt. Diese Mischung konnte schon bei 60°C anstatt

bei 160°C extrudiert werden, dabei entstand ein sehr elastisches Produkt. Dies konnte offensichtlich wegen der Restanteile an Aceton erhalten werden. Demgemäß haben Acetonreste einen entscheidenden Einfluss auf die Extrusionstemperatur der Mischung, da sie die Weichheit von PDLA (Boehringer) beträchtlich erhöhen. Diese Veränderung wird offensichtlich durch Quellen des Polymers mit dem sehr gut mit ihm mischbaren Lösungsmittel Aceton erreicht.

Dann wurde ein mit Phenylalanin beladenes PGA-Pulver, in dem einzelne Phenylalanin/PGA-Partikel mit PDLA (Boehringer) beschichtet wurden, extrudiert. Die Mischung setzte sich aus 30 % Phenylalanin, 20 % PGA und 50 % PDLA (Boehringer) zusammen. In diesem Fall wurde das Aceton aus der Mischung nicht nur unter Vakuum, sondern zusätzlich bei 50° C (Trockenschrank) innerhalb von 16 Stunden entfernt (Stäbchen 7, Tabelle D.1). Die Extrusion begann erst bei 100°C mit der Stempelkraft von etwa 6000 N, verlief jedoch zu langsam. Es musste deshalb auf 110°C erhitzt werden. Das Stäbchen kam dann aufrecht und mit einer glatten Oberfläche heraus. Auf REM-Aufnahmen der Bruchkante des Stäbchens sieht man dennoch eine sehr ungleichmäßige Verteilung des Stoffes (Abbildung D.2). Das lässt den Schluss zu, dass die PGA- und PDLA-Teilchen nicht miteinander verpresst oder verschmolzen wurden.

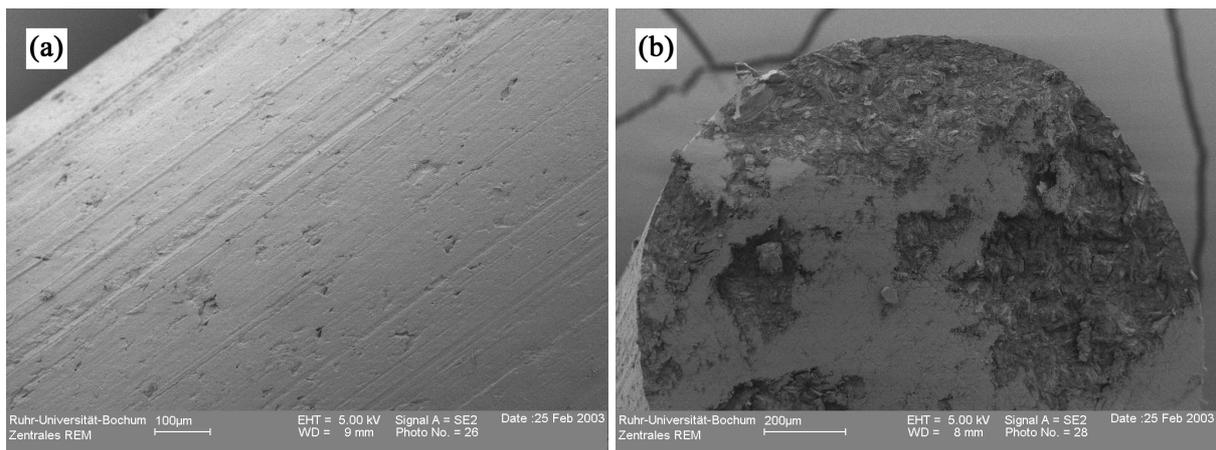


Abbildung D.2. REM-Aufnahmen der Oberfläche (a) und der Bruchkante (b) des Stäbchens 7 (poröses PGA, 30 % Phe, 50 % PDLA, mit einzelnen beschichteten Partikeln).

Die Extrusion des trockenen Poly-D,L-lactids (PDLA, Boehringer) wurde zur Untersuchung der Veränderung des Polymerisationsgrads während der Extrusion durchgeführt. Das Polymer

ließ sich bei 80°C und ca. 6000 N mit einer annehmbaren Geschwindigkeit (ca. 4 cm h⁻¹) extrudieren. Wie man an der REM-Aufnahme der Bruchkante des extrudierten Stäbchens sieht (Abbildung D.3), ist der Stoff innerhalb des Stäbchens gleichmäßig verteilt. Das Ergebnis der Viskosimetrie des extrudierten Polymers in Chloroform zeigte, dass sich das durchschnittliche Molekulargewicht durch die Extrusion fast nicht veränderte und ca. 97250 g mol⁻¹ betrug. Das entspricht einem Polymerisationsgrad von etwa 1350. Die Messwerte für das Boehringer Resomer[®] R207 Polymer (PDLLA) sind: Molekulargewicht ca. 103400 g mol⁻¹, Polymerisationsgrad ca. 1435.

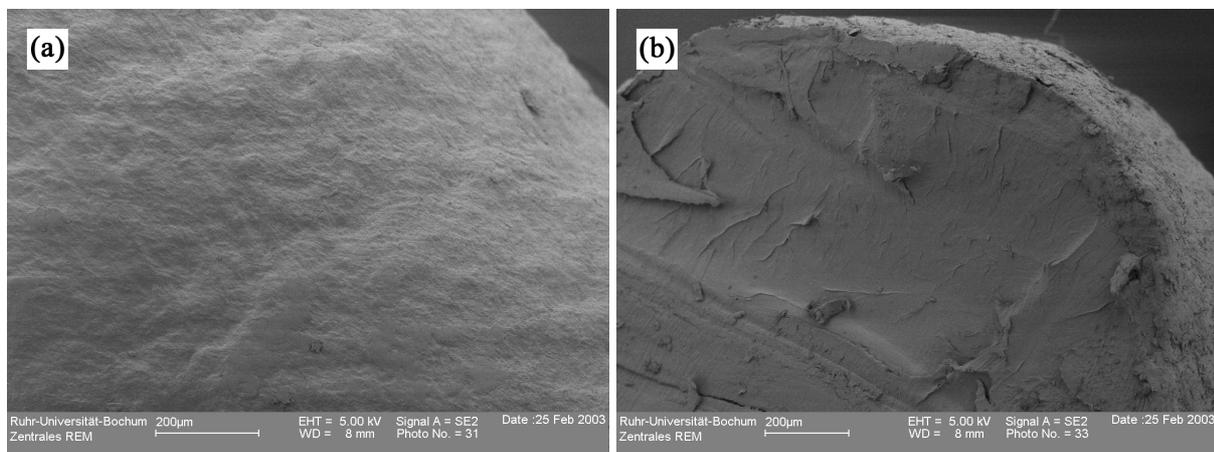


Abbildung D.3. REM-Aufnahmen der Oberfläche (a) und der Bruchkante (b) des bei Novosis extrudierten Resomer[®] R207 (PDLLA, Boehringer).

Eine weitere Mischung bestand aus 30 % Goserelin, 20 % PGA und 50 % PDLLA (Boehringer) (Stäbchen 8, Tabelle D.1). Das Versuchsverhalten unterschied sich in der Weise, dass die Extrusion bei 60°C und etwa 6000 N sehr langsam verlief. Auch bei höheren Temperaturen war das Extrudat zunächst sehr verformt. Erst bei einer Temperatur von etwa 110°C konnte das Stäbchen gerade eben extrudiert werden. Möglicherweise war das Aceton noch nicht restlos entfernt, da bei höherer Temperatur eine vermehrte Blasenbildung auftrat (im Extrudat bei 125°C). Bei 125°C kam das Produkt bei 800-4500 N aus der Düse heraus.

Von der extrudierten Charge mit Phenylalanin (Stäbchen 7) wurden zwei Stäbchen mit je 1 cm Länge und einer Masse von 23,3 bzw. 23,5 mg abgesägt. Wie die Freisetzungsexperimente zeigten, ging die ganze Menge an Phenylalanin schon nach einem Tag in Lösung.

Um die Freisetzungskinetik zu verlangsamen, wurden die Stäbchen mit einer PDLLA-Schicht ummantelt. Dazu wurden noch weitere 4 Stäbchen mit Längen von je 1 cm abgesägt und mit PDLLA (Boehringer) beschichtet. Die Stäbchen wurden vor und nach der Beschichtung gewogen (Tabelle D.2).

Tabelle D.2. Beschichtung der Stäbchen aus PGA(Phenylalanin)/PDLLA in einer PDLLA/Aceton-Lösung.

Anzahl der Eintauch-Vorgänge	Masse vor der Beschichtung [mg]	Wirkstoffgehalt [mg]	Masse nach der Beschichtung [mg]	Massenzunahme [mg/%]
3x	23,0	6,90	33,1	10,1/43,9
5x	21,6	6,48	38,7	17,1/79,2
7x	24,0	7,20	56,5	32,5/135
9x	22,2	6,66	65,2	43,0/194

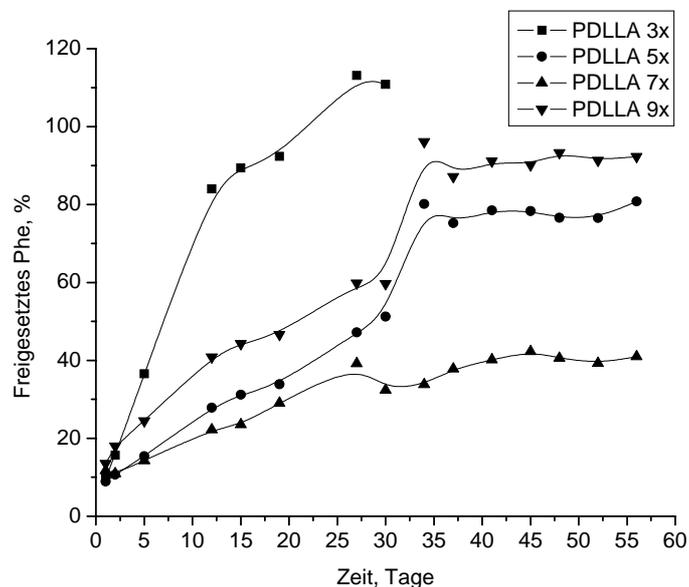


Abbildung D.4. Darstellung der Freisetzungskinetik von Phenylalanin aus Stäbchen 7, mit einzeln beschichteten PGA-Partikeln und mit äußeren PDLLA-Beschichtungen (poröses PGA, 30 % Phenylalanin, 50 % PDLLA (Boehringer)).

Die Massenzunahmen für die 3x/5x/7x/9x-Beschichtungen verhalten sich wie 3:5,08:9,65:12,77. Das ergibt, dass die Abhängigkeit der Massenzunahme von der Anzahl der Eintauchvorgänge für große Beschichtungen nicht linear ist.

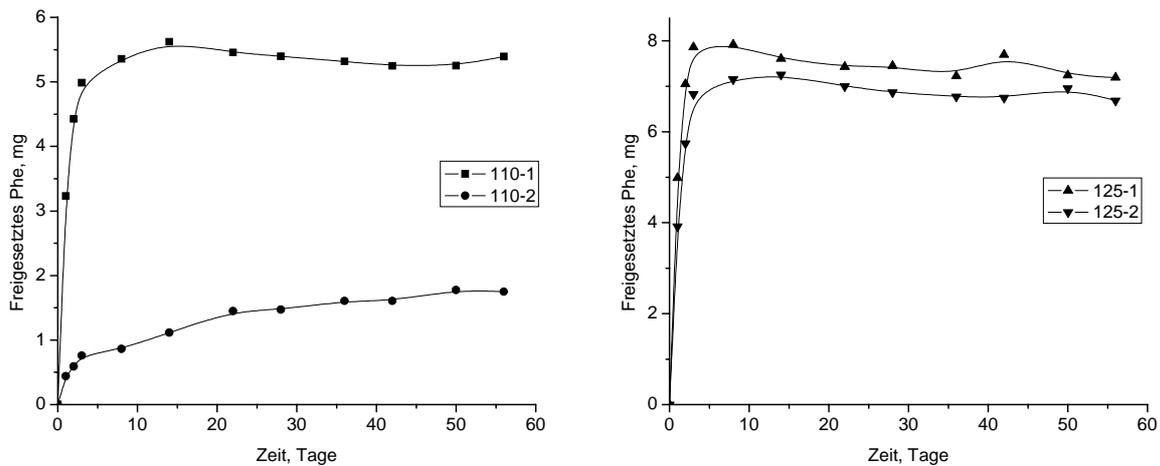
Die Freisetzungskinetik von Phenylalanin aus diesen Zylindern ist in Abbildung D.4 dargestellt. Daraus ist ersichtlich, dass die 3x-Beschichtung die Freisetzung von Phenylalanin wesentlich verlangsamt. Die Freisetzungsdauer betrug ca. 1 Monat. Ungewöhnlich verlief die Freisetzung aus dem 9x-beschichteten Stäbchen. Mit 35 Tagen erfolgte sie schneller als aus den 5x- und 7x-beschichteten Stäbchen. Die Freisetzungen aus den 5x- und 7x-beschichteten Stäbchen verlangsamten sich nach ca. 35 Tagen aus bisher ungeklärten Gründen. Nach ca. 35 Tagen war in den Proben der „7x“-Freisetzung kaum noch eine Phenylalanin-Absorption zu erkennen. Das alles zeugt vermutlich davon, dass ein mikrobieller Abbau der Wirkstoff in der Lösung während der Freisetzung stattgefunden hat und dass das Medium nach jeder Probenentnahme gewechselt werden sollte. Dennoch kann man folgern, dass die Freisetzungsdauer nur wenig von der Beschichtungsanzahl abhängig ist und für die Freisetzung von Goserelin eine 5x-Beschichtung reichen könnte. Im Vergleich mit den anderen Experimenten mit beschichteten Würfeln der Größe $5 \cdot 5 \cdot 5 \text{ mm}^3$ aus PGA/Phenylalanin(30%)/PDLLA(5%) (Stäbchen 5, Kapitel C) wurde die Freisetzungsdauer kürzer. Die Freisetzungsdauer aus 5x-, 9x- und 13x-beschichteten Würfeln betrug ca. je 70, 80 und 90 Tage. Das kann auf die viel größeren Abmessungen und Kompaktheiten (Stempelkraft bei der Herstellung 120 kN) der Würfel zurückzuführen sein.

Für die Freisetzungsexperimente von Goserelin aus dem Stäbchen 8 wurden jeweils zwei Zylinder mit einer ungefähren Länge von 1 cm von den Stäbchen, die bei 110°C und 125°C hergestellt wurden, abgeschnitten (Tabelle D.3).

Die grafischen Darstellungen der Freisetzungskinetiken von Goserelin aus diesen Zylindern sind in der Abbildung D.5 dargestellt. Daraus ist ersichtlich, dass das Produkt bei 110°C eine ungleichmäßigere Verteilung von Goserelin innerhalb des Stäbchens enthielt. Beim

Tabelle D.3. Stäbchen aus extrudierten PGA(Goserelin)/PDLLA-Chargen.

Charge, extrudiert bei	Stäbchenmassen [mg]	Goserelingehalt [mg]	Maximale Konzentration des Wirkstoffes in der Lösung [mg l^{-1}]
110°C	28,6	8,58	42,90
	25,3	7,59	37,95
125°C	27,4	8,22	41,10
	26,2	7,86	39,30

**Abbildung D.5.** Darstellung der Freisetzungskinetik von Goserelin aus Stäbchen 8, mit einzeln beschichteten PGA-Partikeln (poröses PGA, 30 % Goserelin, 50 % PDLLA).

Herstellungsprozess wurde vermutlich anfangs eine größere Menge PDLLA herausgedrückt, im weiteren Verlauf erhöhte sich der Gehalt an Goserelin kontinuierlich. Der tatsächliche Beladungsgrad der Polymer-Goserelin Mischung vor der Extrusion betrug 30 %. Innerhalb der ersten 55 Tage wurden aus dem Stäbchen „110-1“ 19,7 % (5,62 mg), und aus dem Stäbchen „110-2“ 6,9 % (1,75 mg) freigesetzt. Es sind aber deutlich weniger als 30%. Es ist nicht bekannt, ob noch weiteres Goserelin in den Stäbchen enthalten war. Wie man in der Abbildung D.4 sieht, war die Verteilung des Goserelins in den bei 125°C extrudierten Stäbchen relativ gleichmäßig. Innerhalb der ersten 55 Tage wurde aus dem Stäbchen „125-1“ 28,9 % (7,91 mg) freigesetzt, aus dem Stäbchen „125-2“ 27,3 % (7,15 mg). Diese letzten Werte liegen nah beim tatsächlichen Beladungsgrad der Polymer-Goserelin-Mischung vor der Extrusion. Auch nach 2 Monaten der Freisetzung behielten die Stäbchen ihre ursprüngliche Form bei, was bedeutet, dass die

Freisetzung eher mittels Diffusion durch die Polymermatrix als durch Degradation der Matrix stattfindet. In allen Fällen war die Freisetzungsdauer sehr kurz. Der meiste Wirkstoff wurde bereits innerhalb von 2-3 Tagen freigesetzt.

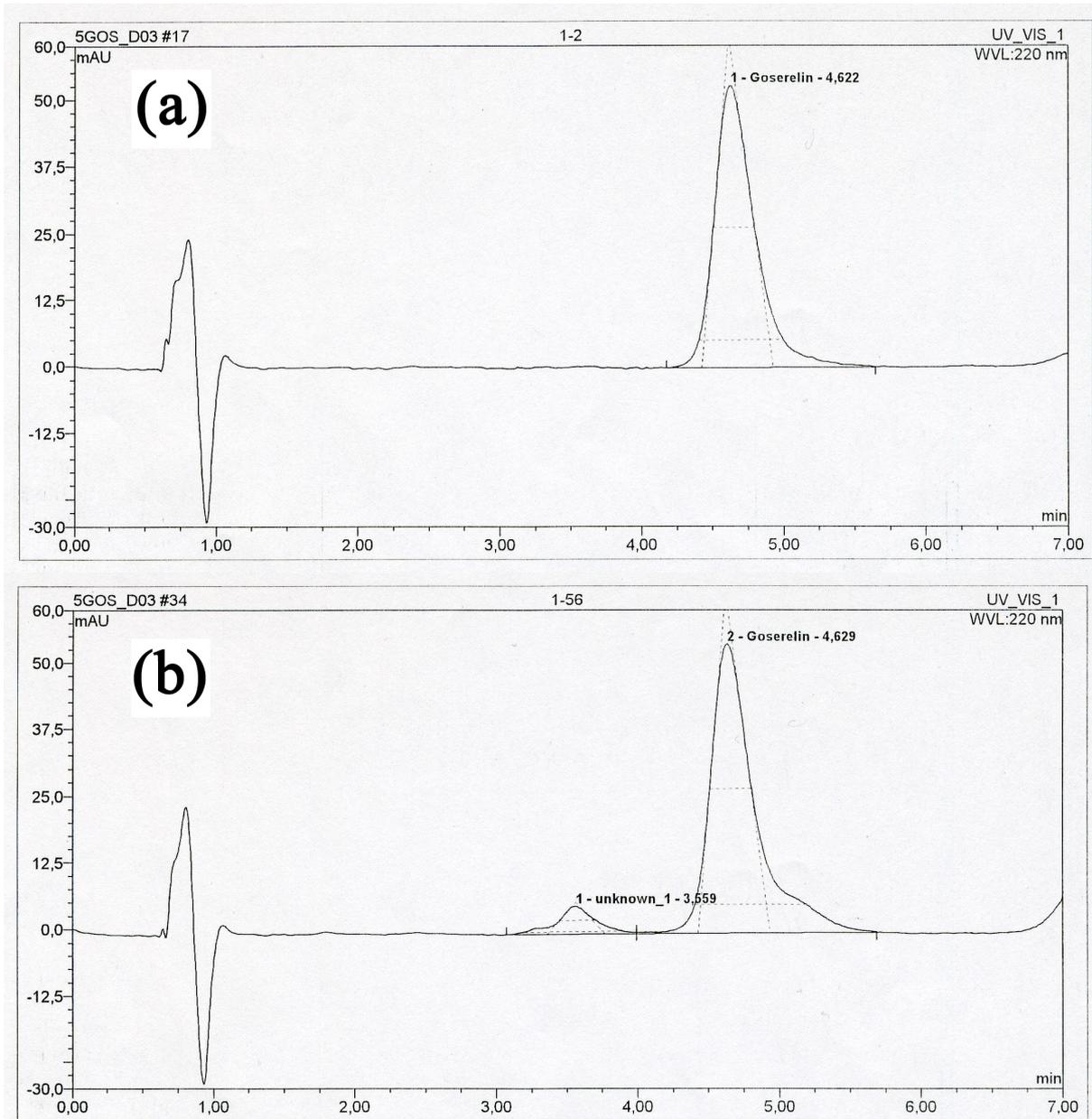


Abbildung D.6. HPLC-Chromatogramme zweier Proben mit Goserelin, die zwei Tage (a) und 56 Tage (b) nach dem Beginn des Freisetzungsexperimentes entnommen wurden.

Auf dem HPLC-Chromatogramm einer Probe mit Goserelin (Abbildung D.6) sieht man einen großen Peak von Goserelin mit der Retentionszeit („*retention time*“) von etwa 4,5-4,6 min. In den Chromatogrammen der Proben, die später als 30 Tage nach Beginn der Freisetzung

entnommen wurden, sieht man einen kleinen Peak von einer unbekanntem Beimischung bei einer kleineren Retentionszeit (ca. 3,5 min) (Abbildung D.6). Vermutlich findet nach dieser langen Einwirkzeit des Wirkstoffes bei 37°C in Lösung Hydrolyse statt, und es entstehen Abbauprodukte mit kleineren Molmassen.

Es wurde ein Experiment zur Untersuchung der Zersetzungskinetik des Goserelins im Phosphatpuffer bei 37° C vorgenommen. 17 mg Goserelin wurden in 100 ml Phosphatpuffer gelöst und in einem Kolben dicht verschlossen in einem Trockenschrank bei 37° C temperiert. Nach einer bestimmten Zeit wurde der Lösung eine Probe (1 ml) entnommen, um die Konzentration des Goserelins zu bestimmen. In der Abbildung D.7 ist die Goserelinmenge in der Lösung in Abhängigkeit von der Zeit dargestellt.

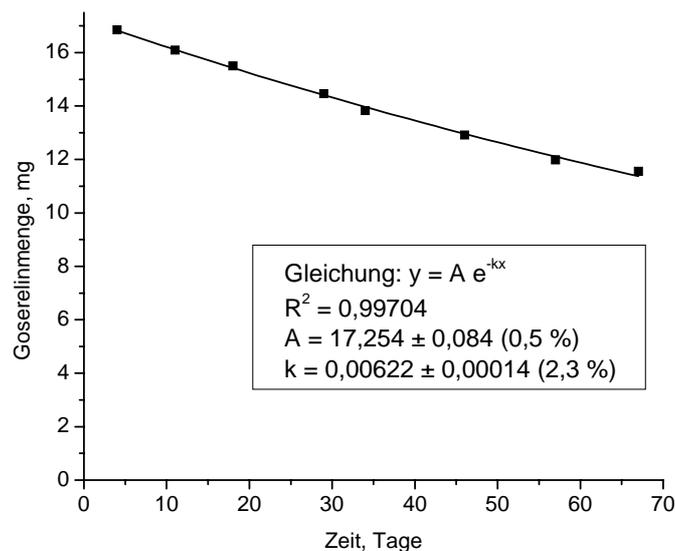


Abbildung D.7. Abhängigkeit der gelösten Goserelinmenge in der Phosphatpufferlösung von der Zeit bei 37° C.

Daraus ist ersichtlich, dass die Abhängigkeit entspricht einer Reaktion erster Ordnung:

$$[A] = [A]_0 e^{-kt} \quad (\text{D.4})$$

wobei $[A]_0$ die Anfangskonzentration des Stoffes A, $[A]$ dessen Konzentration zum Zeitpunkt t und k eine Konstante sind. Da im Experiment zur Untersuchung der Goserelinzerersetzung das

Volumen konstant bleibt, kann man in der Formel (D.4) die Konzentration durch den Wert der Masse ersetzen, weil:

$$c = \frac{n}{V} = \frac{m \cdot M_r}{V} \quad (\text{D.5})$$

wobei m die Masse, n die Stoffmenge, M_r die Molmasse und V das Volumen sind. Durch Ersetzen der Konzentration durch die Masse ergibt sich die Formel:

$$m = m_0 e^{-kt} \quad (\text{D.6})$$

wobei m_0 die Anfangsmasse des Goserelins in der Lösung, m anfallende Masse des Goserelins in der Lösung zum Zeitpunkt t sind. Wenn t die Zeit in Tagen ist, so ist die Konstante $k = 6,22 \cdot 10^{-3}$ (Tag^{-1}). Daraus ergibt sich die Halbwertszeit des Goserelins in der Phosphatpuffer-Lösung: $t_{1/2} = k^{-1} \cdot \ln 2 \approx 111,4$ Tage. Anhand der Formel (D.6) kann eine Zersetzungskorrektur für jede Freisetzungskurve von Goserelin eingeführt werden. Es wurden zwei Methoden zur Korrektur der Freisetzungskurven entwickelt.

Die erste Methode ist eine angenäherte Korrektur. Eine Freisetzungskurve wird wie eine Reihe von Punkten $(t_n; m_n)$ angesehen, wobei t_n die Zeit der Entnahme der Probe Nummer n und m_n die Masse des zum Zeitpunkt t_n freigesetzten Wirkstoffes sind. Für den Punkt $(t_1; m_1)$ wird die Menge des zersetzten Goserelins als unbedeutend angenommen. Für den nächsten Punkt $(t_2; m_2)$ wird die zersetzte Menge anhand der Formel (D.6) für die Zeit zwischen t_1 und t_2 berechnet. Als Anfangsmasse dient m_1 :

$$z_2 = m_1 - m_1 e^{-k(t_2-t_1)} = m_1 (1 - e^{-k(t_2-t_1)}) \quad (\text{D.7})$$

wobei z_2 die berechnete Menge des zersetzten Goserelins für den Zeitraum zwischen t_1 und t_2 ist (z_1 wird gleich Null angenommen). Daraus wird die korrigierte Menge des freigesetzten Goserelins zum Zeitpunkt t_2 berechnet:

$$m'_2 = m_2 + z_2 = m_2 + m_1 (1 - e^{-k(t_2-t_1)}) \quad (\text{D.8})$$

Von dieser korrigierten Masse aus wird die Menge des zersetzten Wirkstoffes für den Zeitraum zwischen t_2 und t_3 berechnet:

$$z_3 = m'_2(1 - e^{-k(t_3-t_2)}) \quad (\text{D.9})$$

Da im Zeitraum zwischen t_1 und t_2 bereits z_2 mg Goserelin zersetzt wurden, muss man für die Bestimmung des zersetzten Goserelins zum Zeitpunkt t_3 die Mengen z_3 und z_2 addieren:

$$s_3 = z_3 + z_2 = m'_2(1 - e^{-k(t_3-t_2)}) + m_1(1 - e^{-k(t_2-t_1)}) \quad (\text{D.10})$$

wobei s_3 die berechnete Gesamtmenge an zersetztem Wirkstoff zum Zeitpunkt t_3 ist ($s_1 = z_1 = 0$, $s_2 = z_2$). Die Gesamtmenge des zersetzten Wirkstoffs zum Zeitpunkt t_n kann somit durch die folgende Formel berechnet werden:

$$s_n = \sum_{i=2}^n m'_{i-1}(1 - e^{-k(t_i-t_{i-1})}), m'_1 = m_1, n \geq 2 \quad (\text{D.11})$$

In der Tabelle D.4 sind die Formeln für die Korrekturberechnung zusammengefasst.

Tabelle D.4. Zusammenfassung der Korrekturberechnungen durch die erste Methode (siehe Text).

Probenr.	t_n	m_n	z_n	s_n	m'_n
1	t_1	m_1	$z_1 = 0$	$s_1 = 0$	$m'_1 = m_1$
2	t_2	m_2	$z_2 = m_1(1 - e^{-k(t_2-t_1)})$	$s_2 = z_2$	$m'_2 = m_2 + z_2$
3	t_3	m_3	$z_3 = m'_2(1 - e^{-k(t_3-t_2)})$	$s_3 = z_2 + z_3$	$m'_3 = m_3 + s_3$
n	t_n	m_n	$z_n = m'_{n-1}(1 - e^{-k(t_n-t_{n-1})})$	$s_n = \sum_{i=2}^n z_i$	$m'_n = m_n + s_n$

Die zweite Methode der Korrekturberechnung ist komplizierter, aber auch präziser als die erste. Für diese Methode wird eine Freisetzungskurve als eine Reihe von Geraden zwischen den Punkten $(t_{n-1}; m_{n-1})$ (Entnahme Probe $n-1$) und $(t_n; m_n)$ (Entnahme Probe n) angesehen. Der Punkt $(t_0; m_0)$ (Beginn des Freisetzungsexperiments) wird dem Punkt $(0; 0)$ gleichgestellt. Eine dieser hypothetischen Geraden ist in Abbildung D.8 dargestellt. Diese Gerade kann als eine Funktion der Zeit beschrieben werden:

$$f_n(t) = \frac{m_n - m_{n-1}}{t_n - t_{n-1}} t + m_{n-1} = a_n t + m_{n-1} \quad (\text{D.12})$$

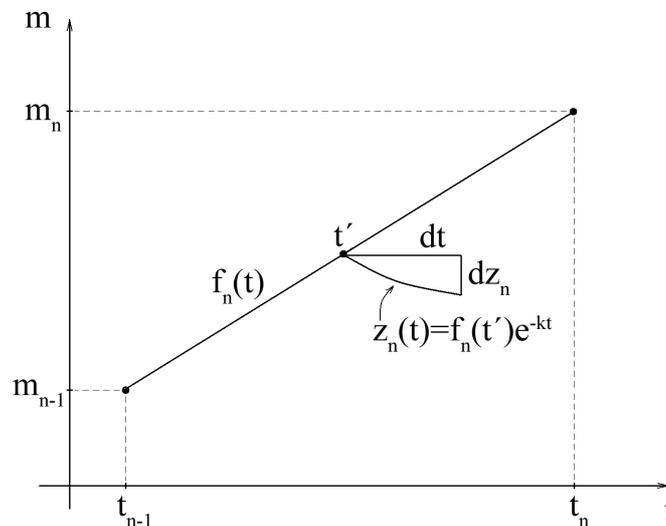


Abbildung D.8. Hilfsgrafik für die Berechnung der Korrekturen zur Zersetzung des Goserelins durch die 2. Methode (siehe Text).

Definiert wird ein Punkt in den Geraden $f_n(t)$ zu einem willkürlichen Zeitpunkt t' (Abbildung D.8). Einem infinitesimalen Zeitraum dt ab dem Zeitpunkt t' entspricht eine infinitesimale Veränderung der Goserelinmenge durch Zersetzung, die in der Abbildung als dz_n bezeichnet ist. Wie man in der Abbildung sieht, ist dz_n gleich dem Differential der Funktion $z_n(t) = f_n(t')e^{-kt}$ im Punkt t' . Der Wert $f_n(t')$ ist in diesem Fall eine Konstante, da er die Anfangsmasse für die infinitesimale Zersetzung des Wirkstoffes dz_n darstellt. dz_n ist somit gleich:

$$dz_n = f_n(t')d(-e^{-kt}) = -k f_n(t')e^{-kt} dt \quad (\text{D.13})$$

Um die Menge des im Zeitraum zwischen t_{n-1} und t_n zersetzten Wirkstoffes (z_n) zu berechnen, muss man alle Differentiale dz_n nicht nur im Punkt t' , sondern auch in allen anderen Punkten des Intervalls $[t_{n-1}; t_n]$ summieren, d.h. integrieren. Da alle Differentiale $dz_n < 0$ sind, ist ihre Summe (d. h. Integral) auch weniger als Null, und für die Berechnung der Menge der zersetzten Wirkstoffes muss man das Vorzeichen des Integrals invertieren:

$$\begin{aligned}
z_n &= - \int_{t_{n-1}}^{t_n} dz_n = k \int_{t_{n-1}}^{t_n} f_n(t) e^{-kt} dt = k \int_{t_{n-1}}^{t_n} (a_n t + m_{n-1}) e^{-kt} dt = \\
&= e^{-kt_{n-1}} \left[\frac{a_n}{k} + m_{n-1} + a_n t_{n-1} \right] - e^{-kt_n} \left[\frac{a_n}{k} + m_{n-1} + a_n t_n \right] \quad (D.14)
\end{aligned}$$

Die Korrekturberechnung mit dieser Formel erfolgt ähnlich zur ersten Methode, jedoch mit einigen Unterschieden (Tabelle D.5). Mit den Werten von m_1 und t_1 wird die Funktion $f_1(t)$ und dann der Wert von z_1 gefunden:

$$f_1(t) = \frac{m_1}{t_1} t, \quad z_1 = k \int_0^{t_1} f_1(t) e^{-kt} dt \quad (D.15)$$

Die Korrektur z_1 wird nicht nur zu m_1 addiert, sondern auch zu m_2 , um den Fehler bei weiteren Berechnungen zu reduzieren. So bekommt man m_1'' und m_2' . Durch die zwei Striche oben werden die Werte für endgültig korrigierte Mengen des freigesetzten Wirkstoffes bezeichnet, während die Werte mit einem Strich intermediär sind und zur Erhöhung der Berechnungspräzision dienen. Mit m_1'' und m_2' findet man die Funktion $f_2(t)$ und dann z_2 :

$$f_2(t) = \frac{m_2' - m_1''}{t_2 - t_1} t + m_1'', \quad z_2 = k \int_{t_1}^{t_2} f_2(t) e^{-kt} dt \quad (D.16)$$

Mit dem gefundenen z_2 wird die summarische Menge des zum Zeitpunkt t_2 zersetzten Goserelins (s_2) berechnet, die zu m_2 und m_3 addiert wird, so bekommt man m_2'' und m_3' . Die Prozedur wird bis zum letzten Punkt der Freisetzungskurve wiederholt (Tabelle D.5).

In der Abbildung D.9 ist ein Beispiel einer Freisetzungskurve mit und ohne Korrekturen durch die erste und die zweite Methode dargestellt. Wie man daraus sieht, ergibt sich in den meisten Fällen für die zweite Methode eine größere Korrektur. Die Korrekturen durch die erste Methode steigen dagegen signifikant für diejenigen Abschnitte der Freisetzungskurve, die eine sehr langsame oder fehlende Freisetzung aufweisen (s. den Abschnitt am Ende der Freisetzungskurve). Diese Eigenschaften folgten aus den Besonderheiten beider Berechnungsmethoden. Im Weiteren werden die Zersetzungskorrekturen der Freisetzungskurven

Tabelle D.5. Zusammenfassung der Korrekturberechnungen durch die zweite Methode (siehe Text).

Nr.	$f_n(t)$	s_n	m'_n	m''_n
1	$f_1(t) = \frac{m_1}{t_1} t$	$s_1 = z_1$	$m'_1 = m_1$	$m''_1 = m_1 + z_1$
2	$f_2(t) = \frac{m'_2 - m''_1}{t_2 - t_1} t + m''_1$	$s_2 = z_1 + z_2$	$m'_2 = m_2 + z_1$	$m''_2 = m_2 + s_2$
3	$f_3(t) = \frac{m'_3 - m''_2}{t_3 - t_2} t + m''_2$	$s_3 = z_1 + z_2 + z_3$	$m'_3 = m_3 + s_2$	$m''_3 = m_3 + s_3$
n	$f_n(t) = \frac{m'_n - m''_{n-1}}{t_n - t_{n-1}} t + m''_{n-1}$	$s_n = \sum_{i=1}^n z_i$	$m'_n = m_n + s_{n-1}$	$m''_n = m_n + s_n$

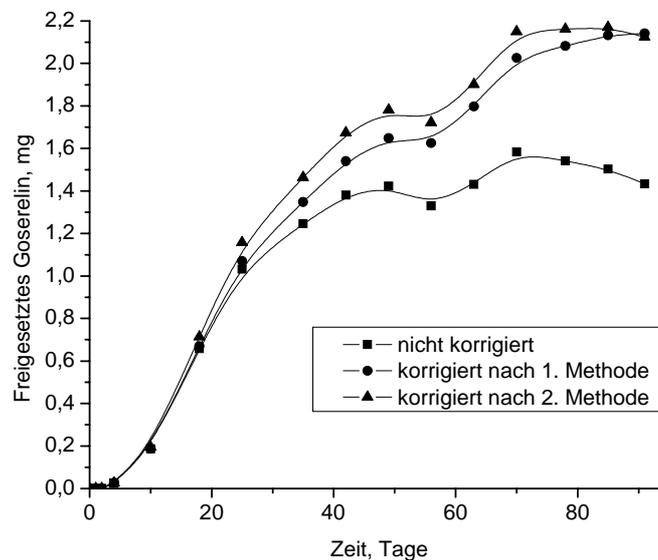


Abbildung D.9. Beispiel der Zersetzungskorrektur einer Freisetzungskurve durch die erste und die zweite Methode (s. im Text).

von Goserelin nach der zweiten Methode durchgeführt (ebenso wie für die Freisetzungskurven von Goserelin im Kapitel C).

Zur Herstellung des Stäbchens 9 wurde das poröse mit 30 % Goserelin beladene PDLLA extrudiert. Bei der Anfangstemperatur (60° C) kam das erste Produkt bei ca. 3500 N mit der Stempel-Geschwindigkeit von 0,01 mm·s⁻¹ aus der Düse heraus. Da sich die Stempelkraft sehr schnell auf 7000-8000 N erhöhte, wurde die Geschwindigkeit bis 0,002 mm·s⁻¹ verringert. Das Stäbchen kam aber zu langsam heraus und sah stark verformt aus. Deshalb wurde die

Temperatur in einem ersten Schritt bis 65°C weiter erhöht. Nach einer kurzfristig verbesserten Extrusion bei ca. 4000 N und 0,002 mm·s⁻¹, jedoch starker Deformation erhöhte sich die Stempelkraft wieder bis ca. 7000 N. Deshalb wurde die Temperatur bis 70° C erhöht. Bei 0,002 mm·s⁻¹ konnte das Stäbchen in gerader Form extrudiert werden und die Stempelkraft blieb fast konstant (ca. 3500 N).

Von dem bei 70°C extrudierten Produkt wurden 5 Zylinder mit einer ungefähren Länge von 1 cm abgesägt und mit PDLLA (Boehringer) 1x, 3x, 5x, 7x und 9x beschichtet (s. Tabelle D.6).

Bei Kenntnis der Dichte von PDLLA (1,218 mg·mm⁻³) kann man die theoretische Dicke von PDLLA-Schichten auf den Zylindern berechnen. Das Volumen einer PDLLA-Schicht mit der Schichtdicke d auf der Oberfläche eines Zylinders mit dem Radius r und der Länge 10 mm kann man annähernd mit der folgenden Formel bestimmen:

$$V \approx 4\pi r d^2 + 20\pi r d \quad (\text{D.17})$$

Diese Gleichung folgt aus der Annahme, dass die Oberfläche des Zylinders durch die Beschichtung nur unwesentlich verändert wird, da die Schichtdicke relativ klein ist. Deshalb wird diese Oberfläche durch Multiplikation der Zylinderlänge nach der Beschichtung (10 mm + 2d) mit der Kreislänge seiner Basis vor der Beschichtung ($2\pi r$) berechnet. Die Multiplikation dieser Fläche mit der Schichtdicke d ergibt annähernd das Volumen des PDLLA in der durch die Beschichtung entstandenen Oberflächenschicht:

$$V \approx (10 + 2d) \cdot 2\pi r d = 4\pi r d^2 + 20\pi r d \quad (\text{D.18})$$

Daraus kann man die Schichtdicke berechnen:

$$d = \frac{1}{2} \left(\sqrt{25 + \frac{V}{\pi r}} - 5 \right) \quad (\text{D.19})$$

Die Werte von V wurden durch die Massendifferenzen der Zylinder vor und nach der Beschichtung geteilt durch die Dichte des PDLLA berechnet. Die Werte V und d sind zusammen mit den experimentell gefundenen Schichtdicken in Tabelle D.6 angegeben. In Abbildung D.10

ist die Abhängigkeit der theoretischen und praktisch gefundenen Schichtdicken von der Anzahl der Beschichtungsvorgänge dargestellt.

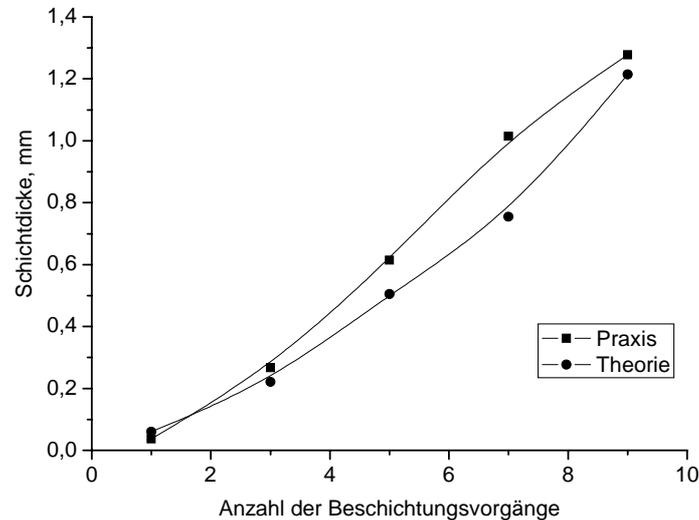


Abbildung D.10. Abhängigkeit der theoretischen und praktisch gefundenen PDLLA-Schichtdicken auf den von Stäbchen 9 abgesägten PDLLA/Goserelin-Zylindern von der Anzahl der Beschichtungsvorgänge.

Die theoretische Dichte der PDLLA-Goserelin(7:3)-Mischung beträgt ca. $1,33 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$ (s. Abschnitt C.IV). Bei Kenntnis der Dichten der hergestellten Stäbchen (Massen durch Volumen, ohne Beschichtung) kann man ihre Porositäten P in % berechnen:

$$P = \frac{\rho_0 - \rho}{\rho_0} \cdot 100\% \quad (\text{D.20})$$

wobei ρ_0 die theoretische und ρ die tatsächliche Dichte der PDLLA-Goserelin-Mischung sind.

Die berechneten Werte von Dichten ρ und Porositäten P sind in Tabelle D.6 angegeben.

Die Beschichtung von einzelnen mit Goserelin beladenen PDLLA-Partikeln, wie sie für den Fall von beladenem PGA beschrieben wurde (s. o.), ist nicht möglich. Diese gehen beim Vermischen von beladenen PDLLA-Partikeln mit einer PDLLA-Lösung in Aceton in die Lösung über.

Die Freisetzungskinetiken von Goserelin aus den beschichteten Zylindern sind in der Abbildung D.11 dargestellt. Wie man sieht, haben die Beschichtungsanzahlen kaum Einfluss auf die Kinetiken. Das heißt, dass sogar die 1x-Beschichtung für das Verlangsamen der Freisetzung

Tabelle D.6. Beschichtung der Goserelin/PDLLA-Stäbchen durch Eintauchen in eine Lösung von PDLLA (Resomer[®] R207, Boehringer) in Aceton.

Nr.	1	2	3	4	5
Anzahl der Tauchvorgänge	1	3	5	7	9
Anfangsmasse [mg]	13,2	12,2	12,5	13,2	12,7
Anfangsdurchmesser* [mm]	1,15-1,16	1,15-1,16	1,16-1,17	1,15-1,16	1,16-1,17
Masse nach der Beschichtung [mg]	15,9	22,4	37,3	51,6	80,0
Massenzunahme [%]	20,5	83,6	198	291	530
Durchmesser nach der Beschichtung* [mm]	1,18-1,28	1,65-1,73	2,18-2,61	2,98-3,39	3,49-3,95
Durchmesserrzunahme [%]	2,6-11,3	43,5-50,4	87,9-125,0	159-195	201-241
Durchschnittliche Schichtdicke [mm]	0,04	0,27	0,62	1,02	1,28
Berechnete Schichtdicke [mm]	0,06	0,22	0,50	0,75	1,21
Berechnetes Volumen PDLLA auf der Oberfläche [mm ³]	2,22	8,37	20,36	31,53	55,25
Dichte vor der Beschichtung [g·cm ⁻³]	1,26	1,16	1,17	1,26	1,19
Porosität [%]	5,3	12,5	11,8	5,3	10,4

* Die Durchmesser wurden an beiden Enden und in der Mitte der Stäbchen mit einer Schieblehre gemessen. Angegeben sind jeweils der maximale und der minimale Wert.

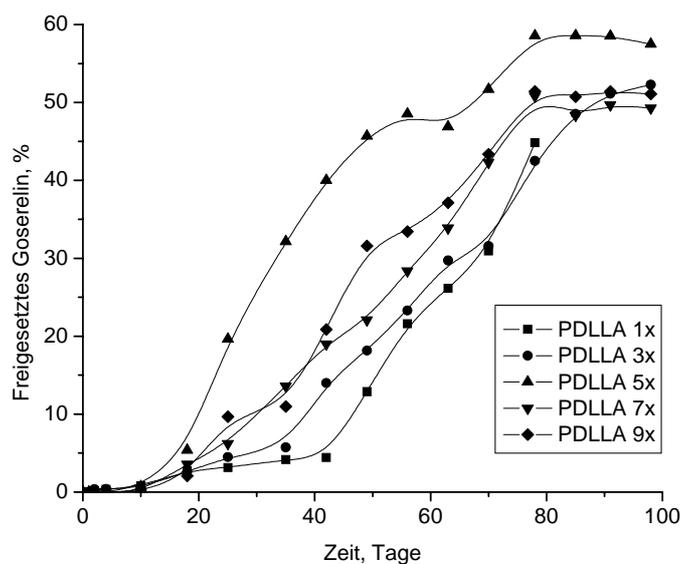


Abbildung D.11. Darstellung der Freisetzungskinetik von Goserelin aus den vom Stäbchen 9 abgeschnittenen PDLLA/Goserelin-Zylindern, mit PDLLA-Beschichtung. 100 % Goserelin = ca. 4 mg.

ausreicht. Die PDLLA-Schicht ist somit für die umgebende Pufferlösung nur wenig durchlässig. In der Abbildung D.12 sind REM-Aufnahmen von unbeschichteten und beschichteten Stäbchen sowohl vor als auch nach der Freisetzung dargestellt. Daraus ist ersichtlich, dass die PDLLA-Schicht die Stäbchen lückenlos umschließt. Außerdem sind die Poren, die nach den Beschichtungen aus Chloroform-Lösungen entstanden, hier nicht zu sehen (Abbildung D.12). Auch nach der Freisetzung war die Schicht nicht zersetzt. Die Freisetzung von Goserelin erfolgt somit durch Diffusion der Pufferlösung durch die dichte PDLLA-Schicht auf den Stäbchen. Der ungewöhnliche Verlauf der Freisetzung für das Stäbchen mit 5x-Beschichtung kann auf einen kleinen Riss in der PDLLA-Schicht auf dem Stäbchen zurückzuführen sein. Wie man sieht, verliefen die Freisetzungen fast linear innerhalb von ca. 3 Monaten. Dennoch wurde das Goserelin innerhalb von 100 Tagen nicht vollständig freigesetzt. Die Beladung jedes Stäbchens betrug ca. 4 mg, freigesetzt wurden aber nicht mehr als 2,4 mg (60 %). Die Freisetzung wurde also entweder noch nicht beendet oder ein Teil des Goserelins bildet einen stabilen Komplex mit der PDLLA-Matrix. Zur Überprüfung der Beladung der Zylinder mit 30 % Goserelin wurden einige von ihnen direkt nach der Extrusion gewogen und gemörsert. Das Goserelin wurde mit einem bestimmten Volumen Phosphatpuffer extrahiert und die Konzentration des Goserelins in diesen Lösungen wurde mittels HPLC bestimmt. Der Beladungsgrad eines Zylinders wurde durch die folgende Formel berechnet:

$$BG = \frac{c_G V_P}{m_Z} \cdot 100 \% \quad (\text{D.21})$$

wobei m_Z die Masse des Zylinders, V_P das Volumen der zur Extraktion des Goserelins verwendeten Phosphatpuffer-Lösung und c_G die mittels HPLC bestimmte Konzentration des Goserelins in dieser Lösung sind. Die auf diese Weise bestimmten Beladungsgrade wichen vom theoretischen Wert (30 %) nicht mehr als 0,6 % ab ($30 \pm 0,6 \%$).

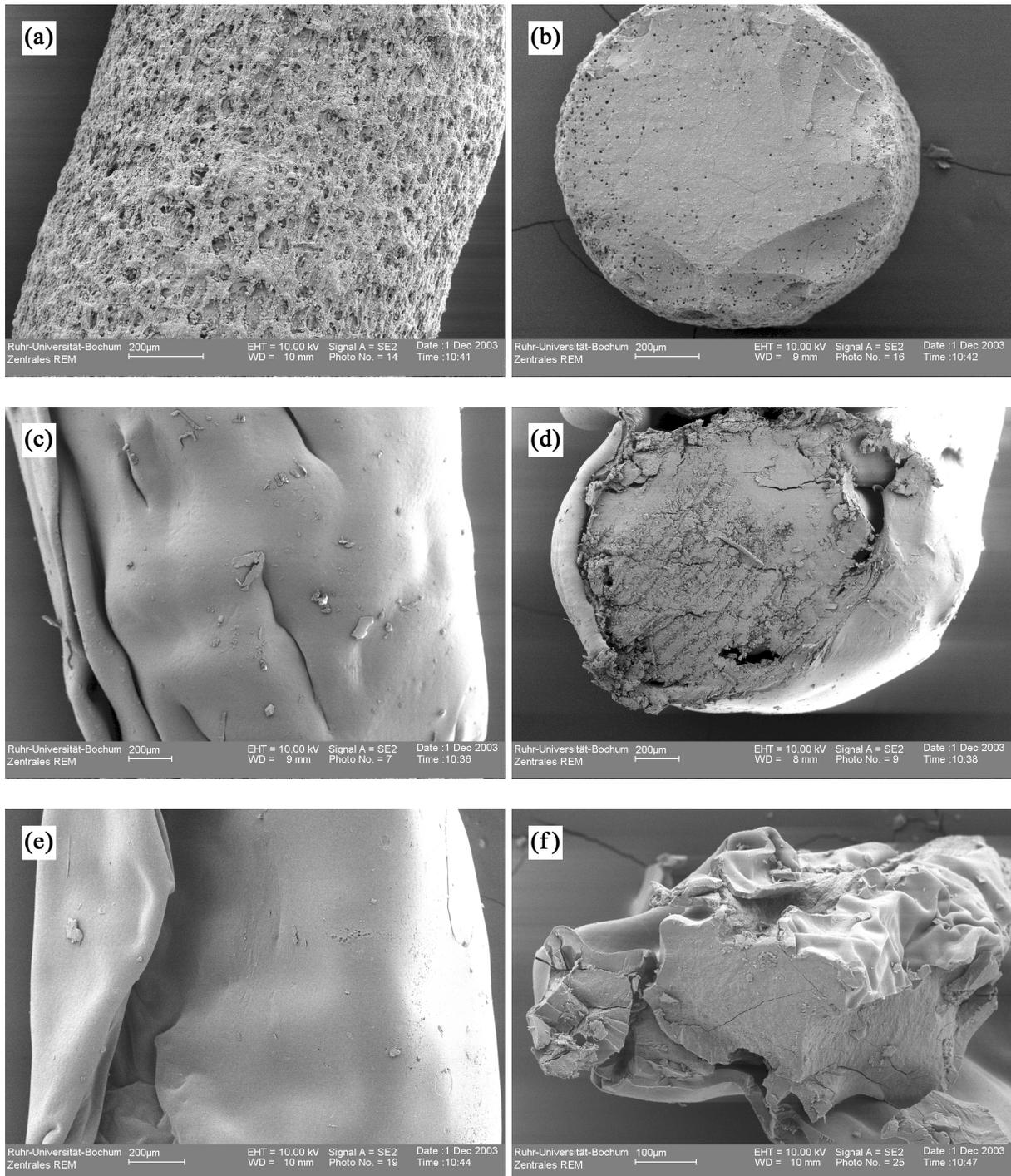


Abbildung D.12. REM-Aufnahmen der extrudierten Goserelin-PDLLA (3:7)-Stäbchen: nach der Extrusion ((a)-Oberfläche, (b)-Querschnitt), nach der 3x-Beschichtung vor der Freisetzung ((c)-Oberfläche, (d)-Querschnitt), nach der 1x-Beschichtung nach 80 Tagen Freisetzung ((e)-Oberfläche, (f)-Querschnitt, durch Schneiden deformiert).

D.IV Versuche zur Herstellung eigener Implantate

Wie schon im präparativen Teil (D.II) erwähnt wurde, wurde für Extrusionsversuche in der Universität Duisburg-Essen eine Pressform angefertigt, die schematisch in der Abbildung D.1 dargestellt ist. Diese Pressform entspricht einem einfachen Extruder. Dieser Extruder mit einer hydraulischen Heißpresse, in der die Temperatur beider Pressplatten konstant eingehalten wurde, hat einige Vorteile gegenüber dem „professionellen“ computergesteuerten Extruder bei der Firma Novosis:

- er ist sehr leicht zu bedienen;
- hat wesentlich geringere Kosten;
- es können viel höhere Stempelkräfte erreicht werden (30 kN und mehr, anstatt 8 kN);
- die Extrusion ist in einem viel größeren Temperaturbereich möglich (von Raumtemperatur bis 200° C).

Von den Nachteilen ist besonders die Tatsache zu erwähnen, dass die Stempelgeschwindigkeit unregulierbar ist. Der unvermeidliche Abfall der Stempelkraft, der von der Extrusion, d. h. von Fortkommen des Stempels, hervorgerufen wird, muss manuell ausgeglichen werden. Das kann zur Inhomogenität und Ungleichmäßigkeit des Durchmessers im Extrudat führen.

Der erste Versuch zur Herstellung eigener Implantate war erfolgreich – festkörperchemisches PDLLA konnte schon bei 60°C und 20-30 kN in einem Stäbchen extrudiert werden. Das mit 30 % Goserelin beladene festkörperchemische PDLLA lässt sich ebenfalls bei 60° C extrudieren. Das hochmolekulare PDLLA von Boehringer (Resomer[®] R207) konnte erst bei 80° C extrudiert werden. Dieselben Stoffe und Mischungen konnten mit dem Extruder bei der Firma Novosis in denselben Temperaturbereichen extrudiert werden. Dies führt zu dem Schluß, dass die viel höhere Stempelkraft keinen erkennbaren Einfluss auf den Extrusionsvorgang hat. Eine viel wichtigere Bedingung ist die Temperatur der zu extrudierenden Probe. Selbst eine kleine

Veränderung der Temperatur um 5° C nach dem Beginn der Extrusion hat eine bedeutende Beschleunigung des Extrusionsvorgangs zur Folge. Die Morphologie der extrudierten Stäbchen von Novosis und der in der Universität Duisburg-Essen hergestellten Stäbchen sieht ähnlich aus (Abbildung D.13). Die Oberfläche der in der Universität Duisburg-Essen extrudierten Stäbchen sieht nur ein wenig rauher aus.

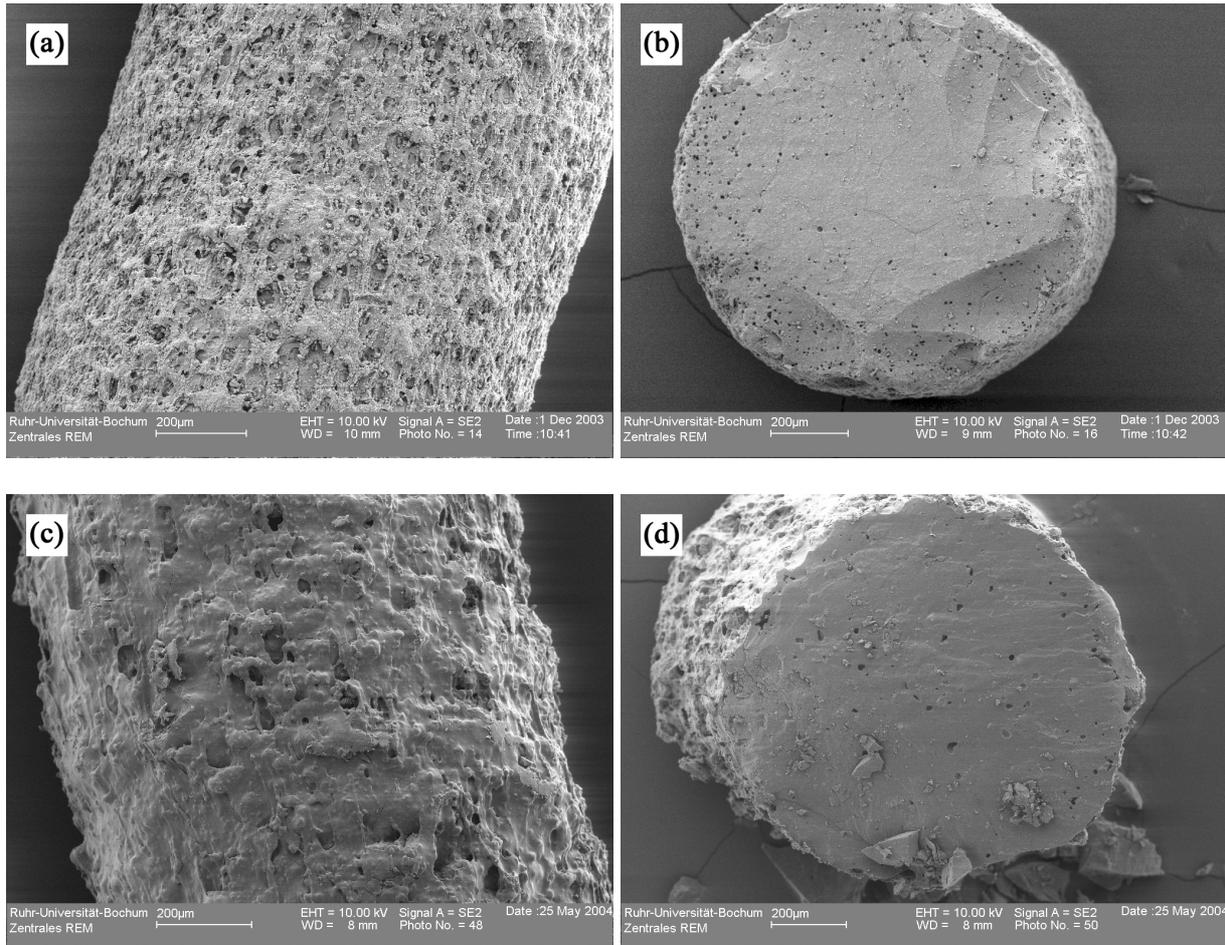


Abbildung D.13. REM-Aufnahmen von Oberflächen und Bruchkanten extrudierter PDLLA/Goserelin Stäbchen (festkörperchemisch hergestelltes poröses PDLLA, 30 % Goserelin): (a) – extrudiert bei Novosis (Oberfläche); (b) – extrudiert bei Novosis (Bruchkante); (c) – extrudiert in der Universität Duisburg-Essen (Oberfläche); (d) – extrudiert in der Universität Duisburg-Essen (Bruchkante).

Von diesem Stäbchen wurden drei Zylinder mit einer ungefähren Länge von 1 cm abgeschnitten und jeder von ihnen 2x mit PDLLA beschichtet. Bei diesem Versuch wurden alle Zylinder gleich beschichtet, um die Reproduzierbarkeit der PDLLA-Beschichtung zu untersuchen. Die Abbildung D.14 zeigt die Darstellung der Freisetzungskinetik von Goserelin aus diesen Zylindern.

Wie man sieht, kann man die Reproduzierbarkeit der PDLLA-Beschichtung als zufriedenstellend bezeichnen. Der Unterschied der Freisetzung zwischen den einzelnen Zylindern kann innerhalb von 60 Tagen bis zu 15 % Goserelin betragen.

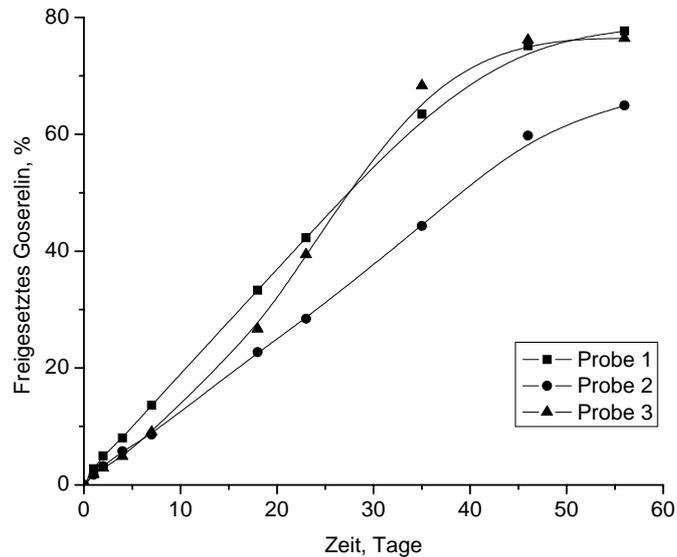


Abbildung D.14. Darstellung der Freisetzungskinetik von Goserelin aus Stäbchen 10 (poröses PDLLA, 30 % Goserelin) mit PDLLA 2x-Beschichtung. 100 % Goserelin entsprechen ca. 3,5 mg.

E Andere Arbeiten auf den Gebieten Wirkstofffreisetzung und biodegradierbare Polyester

E.I Analyse und Aufreinigungsversuche des Polymers Resomer[®] RG95:5H von Boehringer (PLGA 95:5)

Das Polymer Resomer[®] RG95:5H von Boehringer ist ein Poly(D,L-lactid-*co*-glycolid) (PLGA) 95:5, d. h. das Verhältnis zwischen molaren Anteilen von Lactid und Glycolid im Polymer ist 95:5. Dieses Polymer wird aus den zyklischen Dimeren D,L-Dilactid und Diglycolid in flüssiger Phase hergestellt (Abbildung E.1). Deshalb ist zu erwarten, dass die Dimere nicht vollständig zum Polymer reagieren und nach der Synthese in der Matrix verbleiben. Für einen Einsatz dieser Polymere zur kontrollierten Wirkstofffreisetzung ist eine Restmenge von Dimeren unerwünscht. Obwohl die Dimere keine Gefahr für Mensch oder Umwelt darstellen, ist es doch bekannt, dass sie einen merklichen Einfluss auf die Freisetzungskinetik ausüben können. Das Ziel dieser Untersuchung ist es herauszufinden, ob eine Beimischung der Dimere im Polymer vorliegt und das Polymer von der eventuellen Beimischung zu befreien. Die Angaben des Restmonomergehaltes gemäß Boehringer sind: Dilactid: 4,4 % nach Gaschromatographie, 5,5 % nach ¹H-NMR, Diglycolid: nicht nachweisbar.

Das Polymer hat eine glasartige Morphologie, ist hart und sehr schwer zu zerreiben. Es ist sehr gut in Chloroform und Aceton löslich, in Wasser ist es unlöslich. Es ist bekannt, dass kleine Mengen an Diglycolid und Dilactid im Unterschied zu ihren Polymeren in Wasser löslich sind. Deshalb gibt es Verfahren zur Aufreinigung der Polylactide, Polyglycolide und Copolymere, indem man eine Lösung des Polymers in Aceton in ein großes Volumen von Wasser unter sehr intensivem Rühren zutropft. Das Polymer fällt dabei in Form von weißen Flocken aus und die

Dimere bleiben in der Lösung. Um diese Methode auszuprobieren, wurden ca. 0,5 g PLGA in 10 ml Aceton gelöst (PLGA löst sich vollständig, jedoch auch unter intensivem Rühren relativ langsam). Die Lösung wurde in einen Liter Wasser unter sehr intensivem Rühren langsam zugetropft. Dabei wurde die Ausscheidung von weißen Flocken beobachtet. Die Lösung wurde durch einen Büchnertrichter mit Filterpapier filtriert. Das erhaltene Polymer wurde an einer Wasserstrahlpumpe und anschließend an einer Ölpumpe (mit einer Kühlfalle mit flüssigem Stickstoff) vollständig getrocknet.

Mit dem ausgewaschenen sowie mit dem nicht ausgewaschenen Polymer wurden die folgenden Analysen durchgeführt: IR-Spektroskopie, $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie, DSC-Messungen.

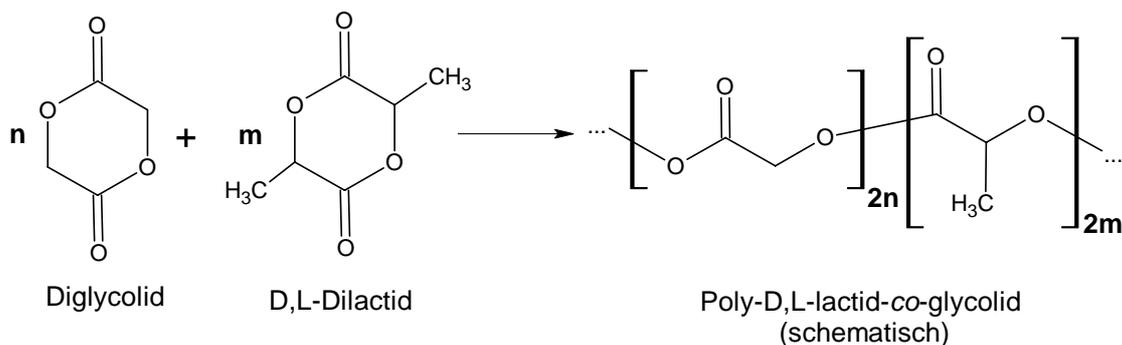


Abbildung E.1. Herstellung von Poly(D,L-lactid-co-glycolid) aus zyklischen Dimeren in flüssiger Phase (schematisch).

DSC-Messungen. In der DSC-Messung vom nicht ausgewaschenen Polymer sieht man nur einen kleinen Peak bei ca. 50°C (Abbildung E.2). Das entspricht offensichtlich dem Glasübergang des Polymers (das Polymer ist amorph). Es gibt keine anderen Signale, die einer weiteren Polymerisation oder dem Schmelzen der Monomere entsprechen könnten (Schmelztemperatur für L-Dilactid ist $92\text{--}94^\circ\text{C}$, für D,L-Dilactid $116\text{--}119^\circ\text{C}$).

Die DSC-Messung des Polymers nach dem Auswaschen sieht ähnlich aus wie vorher (Abbildung E.3). Der Peak, der dem Glasübergang entspricht, hat sich bis ca. 55°C verschoben, und die entsprechende Enthalpie ist um ca. 40 % gesunken (von $5,21\text{ J g}^{-1}$ bis $3,75\text{ J g}^{-1}$). Die Erhöhung der Glasübergangstemperatur kann mit Vergrößerung des mittleren

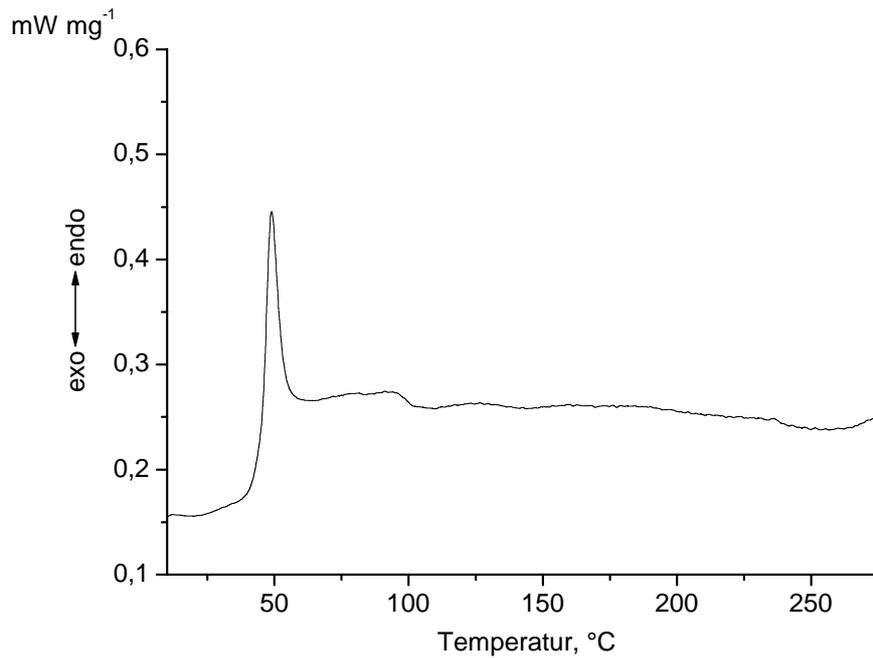


Abbildung E.2. DSC-Untersuchung von nicht ausgewaschenem PLGA 95:5.

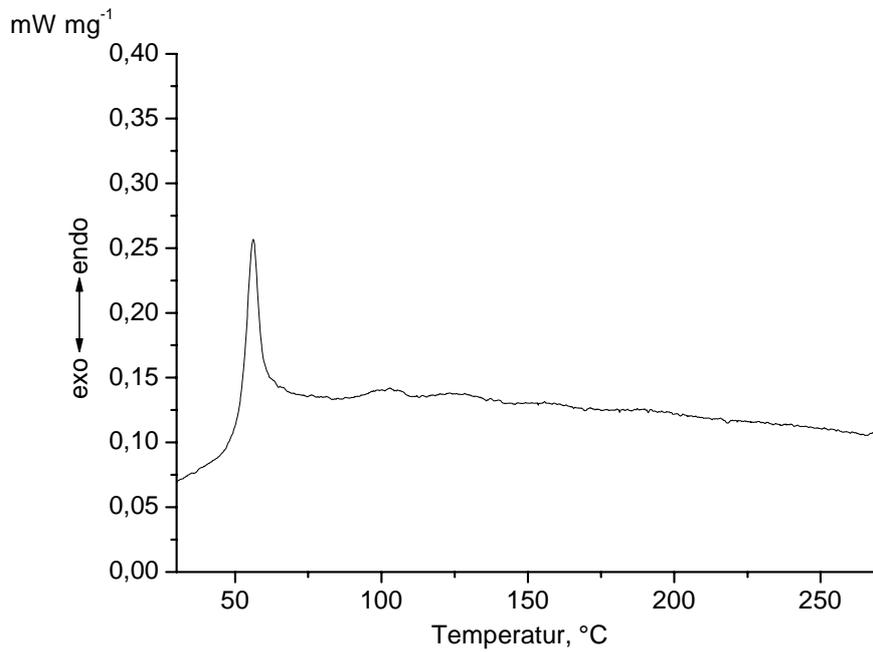


Abbildung E.3. DSC-Untersuchung von PLGA 95:5 nach dem Auswaschen mit Aceton/Wasser und Trocknen.

Molekulargewichts durch Auswaschen der kurzen Polymerketten erklärt werden. Die Verringerung der Enthalpie bei dem Glasübergang ist schwierig zu erklären. Vermutlich braucht

das Polymer in seinem „glasartigen“ Zustand mehr Wärmezufuhr als im „flockigen“, damit die Polymerketten beweglich werden. Außerdem könnte das oben erwähnte Auswaschen der kurzen Polymerketten einen Einfluss auf die Glasübergangstemperatur haben.

$^1\text{H-NMR}$ -Messungen in CDCl_3 . Im Spektrum des nicht ausgewaschenen Polymers (Abbildung E.4) finden sich breite Signale der CH_3 - (Lactid, 1,60 ppm), CH - (Lactid, 5,20 ppm) und CH_2 - (Glycolid, 4,80 ppm) Gruppen. Für Polymere sind derartig breite Signale mit einer unbestimmten Multiplizität in $^1\text{H-NMR}$ -Spektren üblich. Neben den Hauptpeaks bei 1,60 ppm und 5,20 ppm befinden sich deutliche Signale, die partiell mit den Signalen vom Polymer überlagert sind (5,08 ppm, vermutlich Quartett, 1,67 ppm, vermutlich Dublett). Diese Signale entsprechen einer Beimischung von Dilactid im Polymer (Literaturangaben für Dilactid^[117]: 5,087 ppm Quartett, 1,660 ppm Dublett). Ein großes Singulett bei 0,00 ppm entspricht dem Standard Tetramethylsilan (TMS, $(\text{CH}_3)_4\text{Si}$). Das kleine Singulett bei 7,27 ppm entspricht dem Rest-Chloroform-Gehalt (CHCl_3) in CDCl_3 .

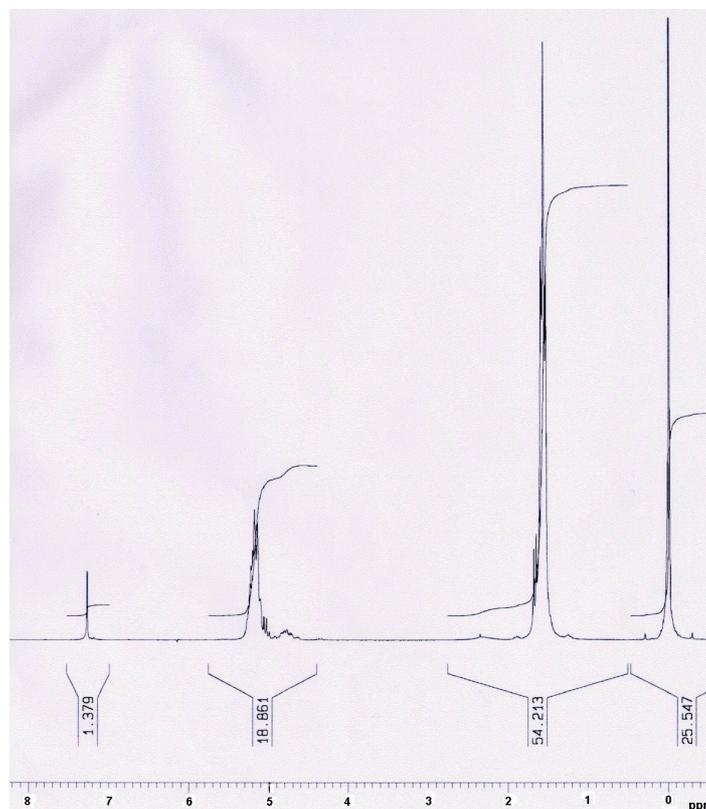


Abbildung E.4. $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum vom nicht ausgewaschenen PLGA in CDCl_3 .

Das Spektrum des Polymers nach dem Auswaschen hat sich nur unwesentlich verändert (Abbildung E.5). Obwohl die Peaks von Dilactid viel kleiner wurden, kann man dennoch ein kleines Dublett bei ca. 1,7 ppm erkennen. Das zeugt davon, dass das Dilactid nicht vollständig ausgewaschen wurde und damit ein weiteres Lösen von Polymer in Aceton und Ausfällen in Wasser für eine Aufreinigung nötig ist. Das Singulett des Diglycolids bei 5,09 ppm^[118] ist nicht sichtbar, da es mit anderen Signalen überlagert wird.

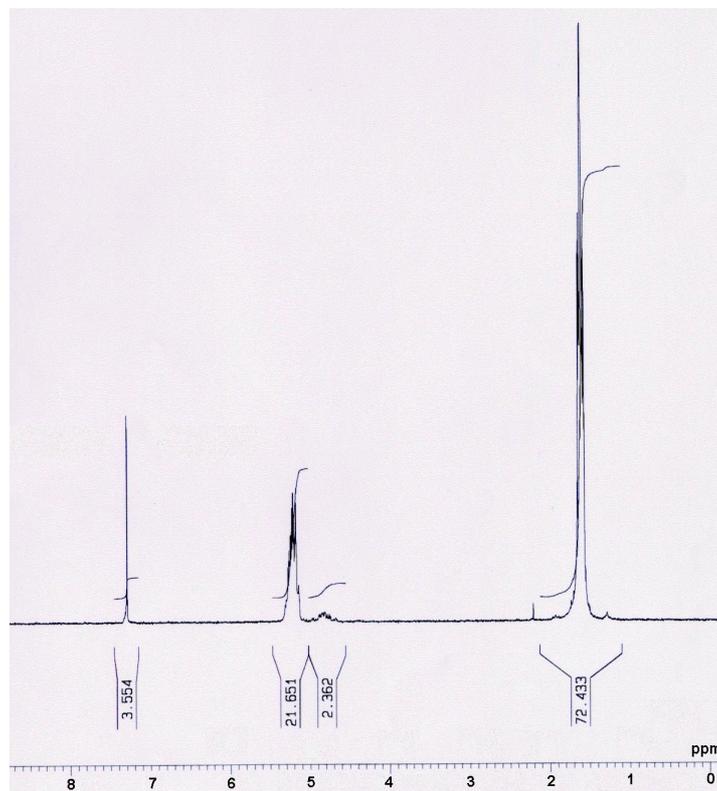


Abbildung E.5. ¹H-NMR-Spektrum des Polymers (PLGA) in CDCl₃ nach dem Auswaschen mit Aceton/Wasser (Versuch mit einer kleinen Menge PLGA)

IR-Messungen. Das IR-Spektrum des Polymers nach dem Auswaschen hat sich nahezu nicht verändert (Abbildungen E.6, E.7). Man sieht ein typisches Polyester-Spektrum – ein großes Signal von den Esterbindungen (C=O) bei $\sim 1753\text{ cm}^{-1}$ und ein kleines Signal von den Carboxylat-Endgruppen (C=O) bei $\sim 1618\text{ cm}^{-1}$.

Die Literaturangabe für die Monomere sind die Folgenden: Diglycolid C=O (Esterbindungen) 1753 cm^{-1} ,^[118] Dilactid C=O (Esterbindungen) 1770 cm^{-1} .^[117] Das heißt, es ist sehr schwierig, mit IR-Spektren die Gegenwart der Monomere im Polymer nachzuweisen.

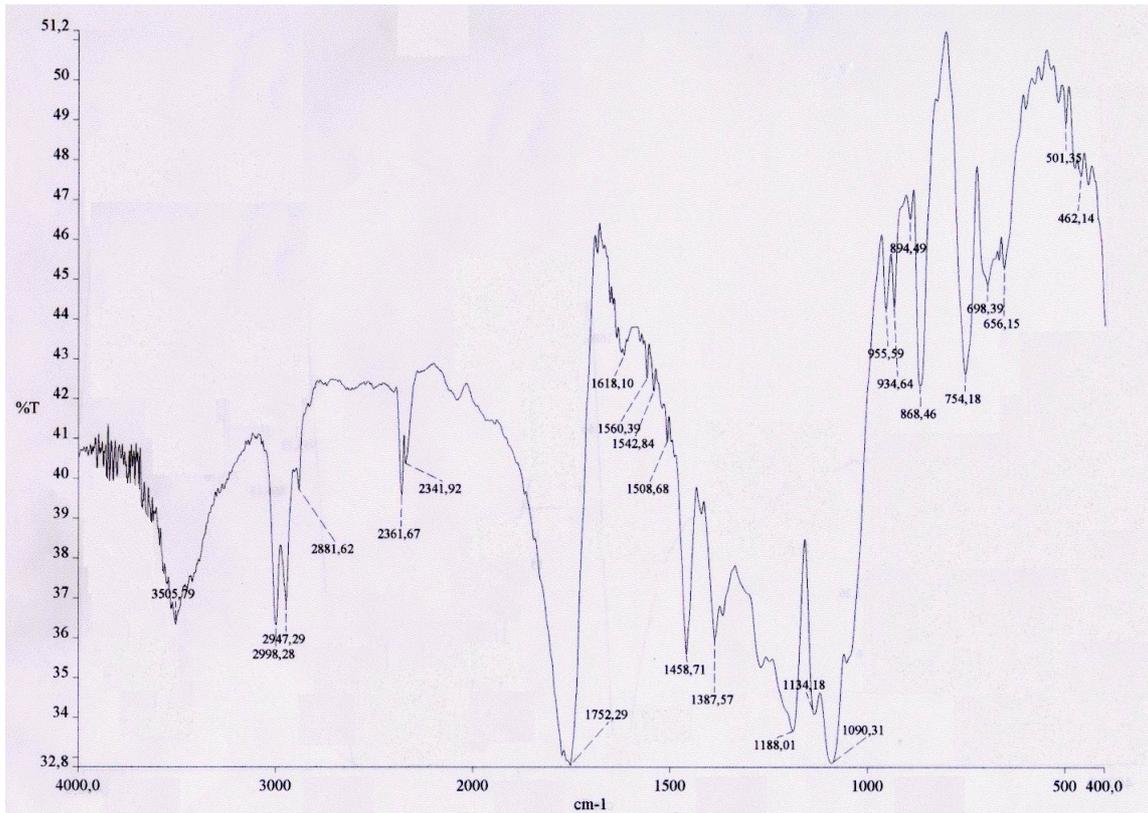


Abbildung E.6. IR-Absorptionsspektrum von nicht ausgewaschenem Polymer (PLGA).

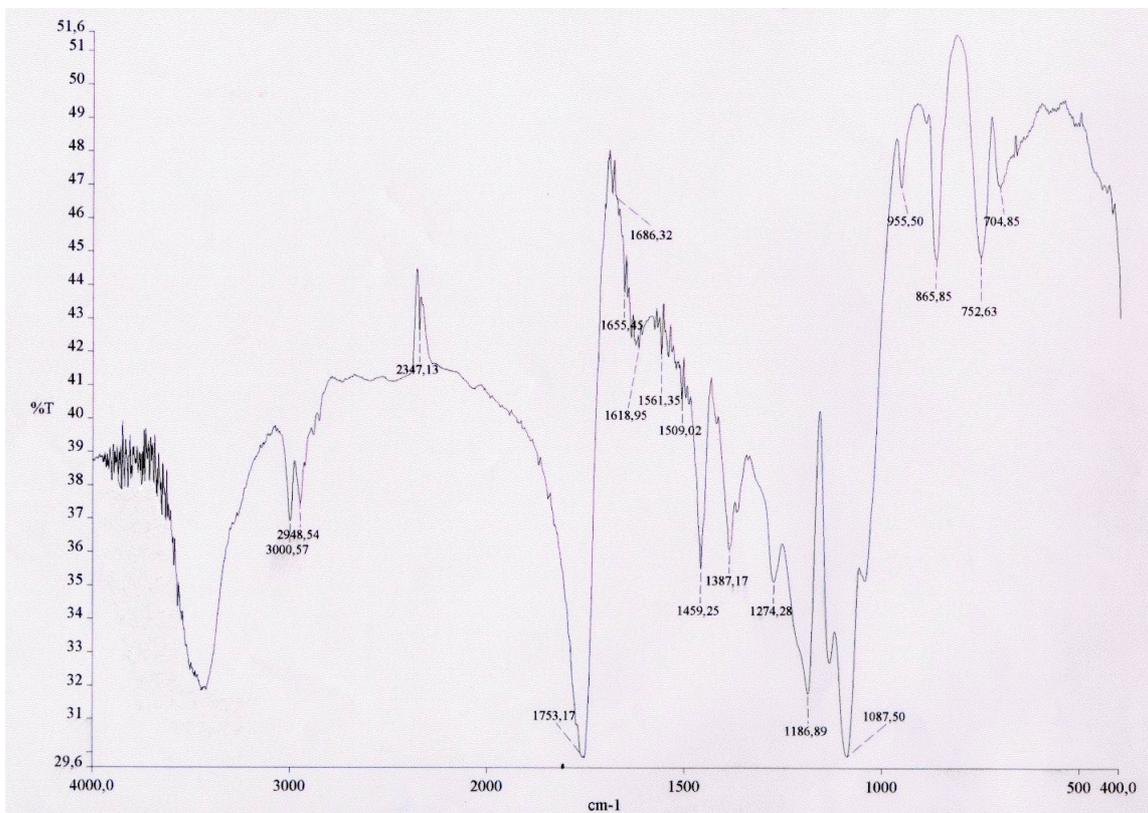


Abbildung E.7. IR-Absorptionsspektrum von mit Aceton/Wasser ausgewaschenem Polymer (PLGA).

Nach dem Auswaschen ist nur eine kleine Bande bei $\sim 934 \text{ cm}^{-1}$ verschwunden. Entsprechend der Literatur,^[117] gibt es im IR-Spektrum des Dilactids eine Bande mit einer mittleren Intensität bei 931 cm^{-1} .

Aufreinigungsversuche von großen Mengen PLGA 95:5. Zur Aufreinigung des Polymers wurden ca. 35 g davon in 200-250 ml Aceton unter intensivem Rühren gelöst. Anschließend wurde das Volumen bis auf 300 ml mit Aceton verdünnt. Je 20 ml der Lösung wurden in 2000 ml demineralisiertes Wasser unter sehr intensivem Rühren langsam eingetropft. Man beobachtete die starke Bildung weißer Flocken. Die Lösung wurde durch einen Papierfilter filtriert. Zum Trocknen der Flocken wurden diese in einer großen Kristallisierschale gesammelt und in einem Umlufttrockenschrank bei 25°C für mindestens eine Woche belassen. Die Vollständigkeit der Wasserentfernung wurde durch Massenverlust der Kristallisierschale mit der Zeit geprüft. blieb die Masse des Polymers konstant, so wurde es noch 2-3 Tage im Trockenschrank belassen. Anschließend wurde eine DSC-Untersuchung durchgeführt (vgl. Abbildungen E.8 und E.9). In der DSC-Messung des noch feuchten Polymers (Abbildung E.8) sieht man eine große Anzahl von intensiven Signalen. Vermutlich entsprechen sie der Verdampfung von Lösungsmitteln sowie verschiedenen Prozessen von Wechselwirkungen der Lösungsmittel mit dem Polymer (z. B. Hydrolyse). In der DSC-Messung des trockenen Polymers (Abbildung E.9) sieht man nur ein kleines Signal vom Glasübergang des Polymers. Die ^1H -NMR-Untersuchung des Polymers nach einmaligem Auswaschen (Abbildung E.10) zeigte hier auch eine geringe Restmenge des Monomers. Die Versuche, die Lösung des Polymers bis 35 g in 600 ml Aceton zu verdünnen oder 10 ml anstatt 20 ml von der Lösung in 2000 ml Wasser zuzutropfen, ergaben keine Erfolge. Da die ^1H -NMR-Untersuchungen zeigten, dass nach einmaligem Auswaschen immer noch eine bestimmte Menge Dilactids im Polymer verblieb, wurden die Aufreinigungsversuche zweimal durchgeführt. D. h. eine Portion Polymer nach dem Lösen in Aceton, Ausfällen in Wasser und Filterung wurde erneut in Aceton gelöst, in Wasser

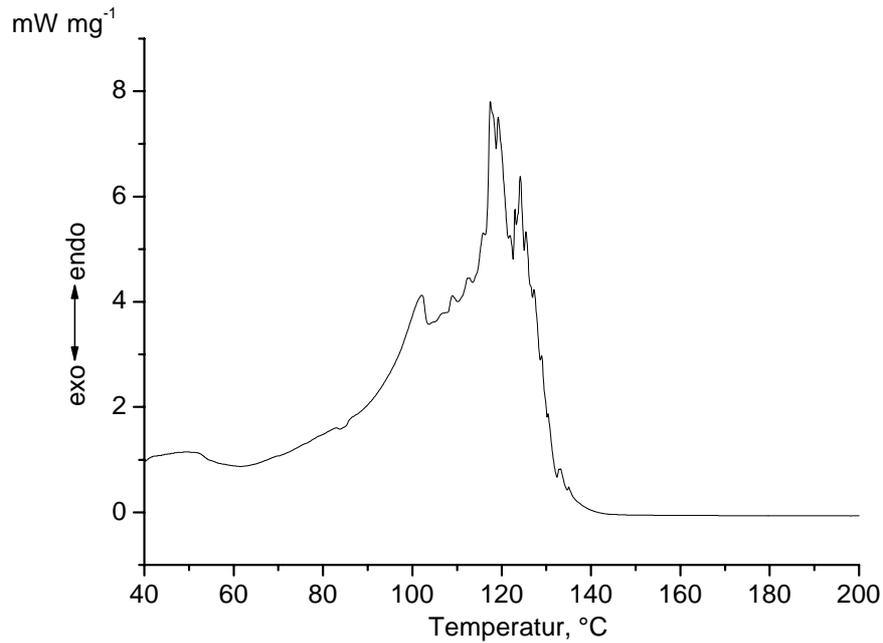


Abbildung E.8. DSC-Untersuchung von PLGA 95:5 direkt nach der Aufreinigung.

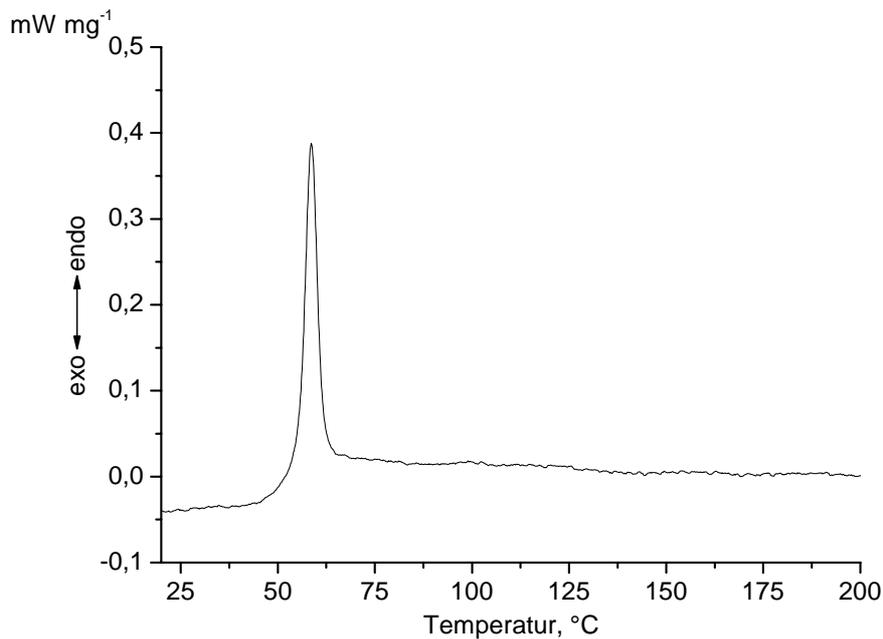


Abbildung E.9. DSC-Untersuchung von PLGA 95:5 nach Aufreinigung und Trocknen.

gefällt, filtriert und getrocknet. Das ¹H-NMR-Spektrum von zweimal aufgereinigtem Polymer zeigt keinen Restmonomergehalt im Polymer (Abbildung E.11). Die gesamte Ausbeute des Polymers beträgt ca. 400 g von 500 g (80 %). Der Verlust kann auf die Entfernung der

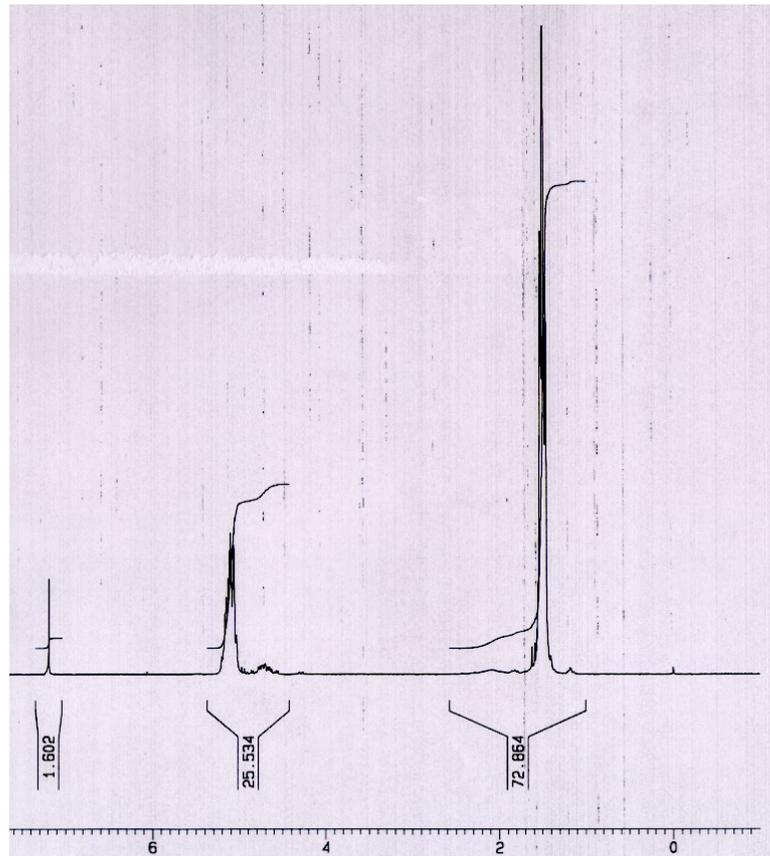


Abbildung E.10. $^1\text{H-NMR}$ -Untersuchung von einmal aufgereinigtem PLGA 95:5 in CDCl_3 .

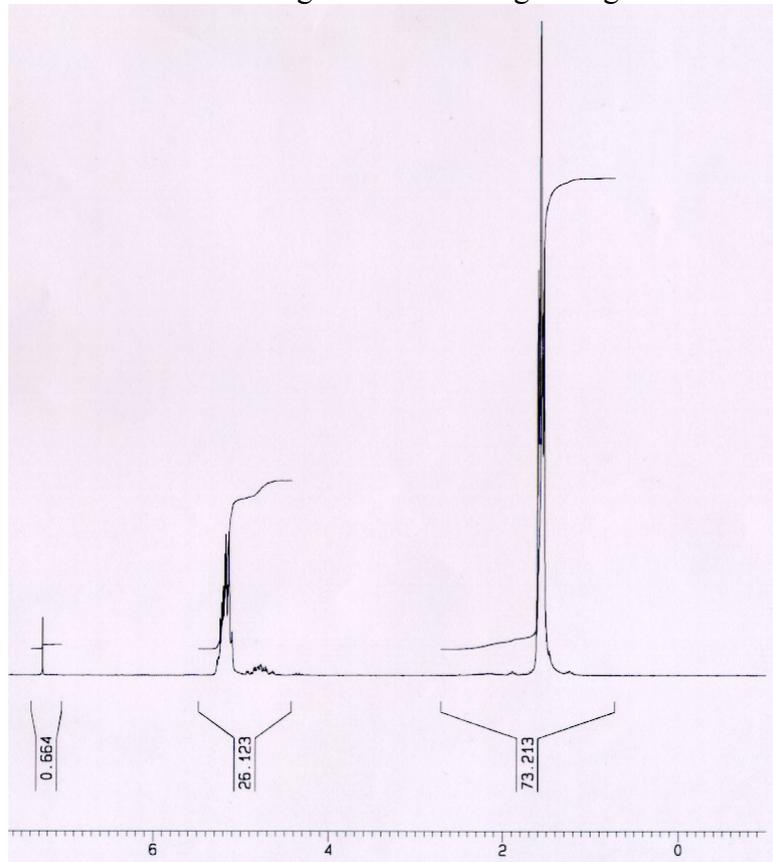


Abbildung E.11. $^1\text{H-NMR}$ -Untersuchung von zweimal aufgereinigtem PLGA 95:5 in CDCl_3 .

Verunreinigungen sowie der Polymerketten mit kleinen Polymerisationsgraden zurückzuführen sein.

E.II Untersuchung der Zoladex[®]-Implantate mittels ¹H-NMR

Wie schon im Abschnitt A.IV erwähnt wurde, ist Zoladex[®] ein auf dem Markt befindliches Präparat mit Goserelin der Firma Zeneca (Abbildung E.12). Es stellt einen Zylinder aus Polymermaterial mit dem Durchmesser von ca. 2 mm und einer Länge von ca. 10 mm dar. Dieser Zylinder wird mit Hilfe einer Spritze mit einer entsprechenden Größe subkutan implantiert. Im Moment der Implantation beginnt bereits die Freisetzung des Goserelins in den Körper. Da das Implantat bioresorbierbar ist, muss es später nicht explantiert werden und löst sich im Körper vollständig auf. Das Implantat „Zoladex 3,6“ enthält eine Monatsdosis Goserelin und wird daher „Monatsimplantat“ genannt. Dementsprechend ist „Zoladex 10,8“ ein „Dreimonatsimplantat“. Für die Herstellung der Implantate werden PLGA-Polymere mit Lactid:Glycolid Verhältnissen 95:5 und 50:50 verwendet. Das Ziel dieser Untersuchung war es herauszufinden, aus welchen PLGA-Polymeren Zoladex 3,6 und Zoladex 10,8 hergestellt wurden.



Abbildung E.12. Das Zoladex-10,8-Implantat mit dem System für die subkutane Einführung.

Die ¹H-NMR-Spektren der Zoladex-Implantate (Abbildungen E.13, E.14) zeigen, dass das Zoladex-3,6-Implantat aus PLGA 50:50 und das Zoladex-10,8-Implantat aus PLGA 95:5 hergestellt wurden. In beiden Fällen sind die breiten Signale von der CH₃-Gruppe des Lactids

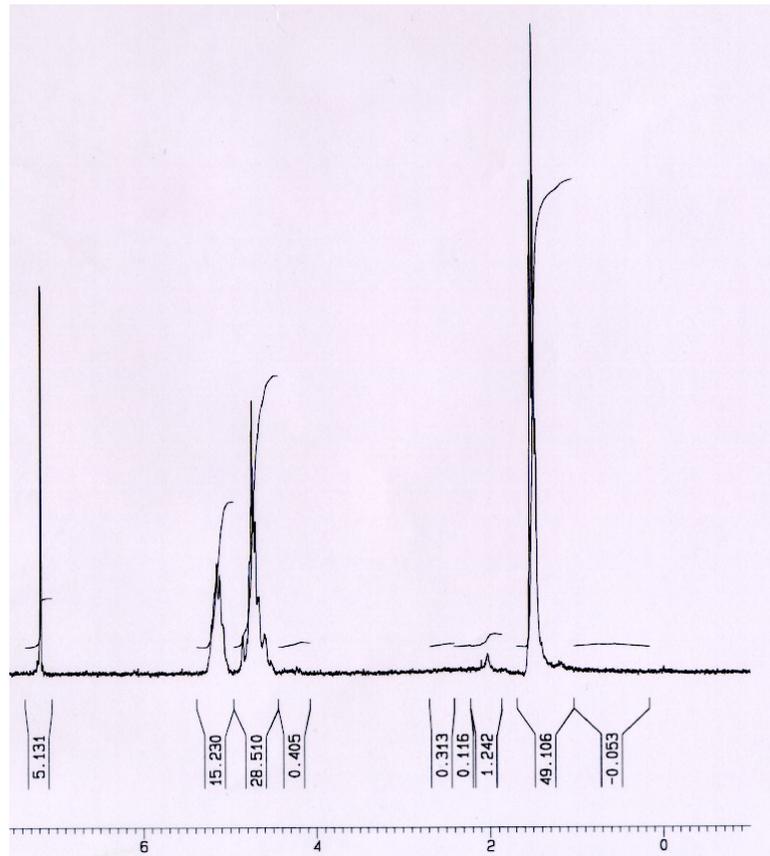


Abbildung E.13. $^1\text{H-NMR}$ -Untersuchung des Zoladex-3,6-Implantats in CDCl_3 .

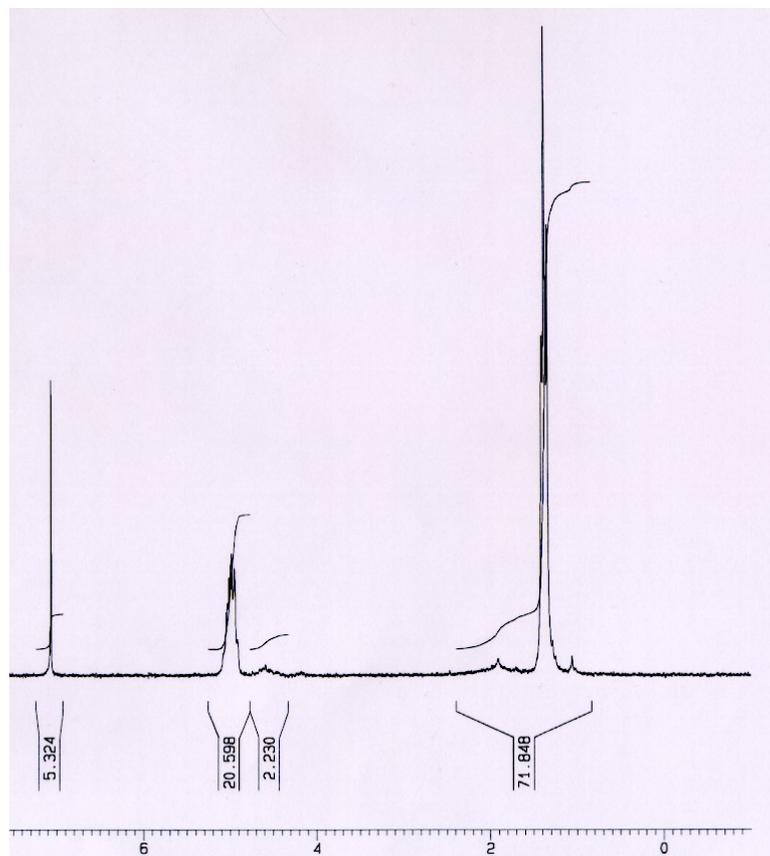


Abbildung E.14. $^1\text{H-NMR}$ -Untersuchung des Zoladex-10,8-Implantats in CDCl_3 .

(ca. 1,4 ppm), den CH₂-Gruppen des Glycolids (ca. 4,6 ppm) sowie den CH-Gruppen des Lactids (ca. 5,0 ppm) zu sehen. Die Verhältnisse der Integrale der Signale zueinander sind verschieden und weisen auf die Gehalte der Wasserstoffatome verschiedener Gruppen hin. Für PLGA 50:50 ist das theoretische Verhältnis $\text{CH}_3/\text{CH}_2/\text{CH} = 3 \cdot 50/2 \cdot 50/1 \cdot 50 = 3/2/1$, für PLGA 95:5 $\text{CH}_3/\text{CH}_2/\text{CH} = 3 \cdot 95/2 \cdot 5/1 \cdot 95 = 57/2/19$. Praktisch gefundene Verhältnisse sind 3,2/1,9/1 für Zoladex 3,6 und 64/2/18,5 für Zoladex 10,8.

E. III TG-DTA-IR – Untersuchung des Antiinsektenpflasters Hansaplast®

Antiinsektenpflaster sind ein Beispiel für eine lösungsmittelfreie Wirkstofffreisetzung. Wird so ein Pflaster auf die Haut geklebt, so wird ein flüchtiger Wirkstoff in die Umgebung freigesetzt, der Insekten abschreckt und sie daran hindert, sich dem Menschen zu nähern. Die Wirkstofffreisetzung wird durch Körperwärme beschleunigt, aber selbst bei Raumtemperatur ist sie beachtlich, weshalb die Pflaster in luftthermetischen Packungen aufbewahrt werden. Das Ziel dieser Untersuchung ist es, mittels einer TG-DTA-IR-Anlage die ungefähre Freisetzungsdauer und den Wirkstoffgehalt eines Antiinsektenpflasters der Firma „Hansaplast®“ zu bestimmen (Abbildung E.15).

In der Darstellung der TG-DTA-IR-Messung (Abbildung E.16) sind alle Kurven als Funktionen der Zeit in Minuten (Abszisse) abgebildet. Die rote Kurve und ihre Ordinate zeigen die Temperatur. Das Temperaturprogramm war wie folgt: Erhitzung ab Raumtemperatur auf 40° C mit 1 K min⁻¹, dann isotherm für 24 Stunden. Diese Bedingungen sollten das Aufkleben des Pflasters auf einen menschlichen Körper imitieren. Die blaue Kurve und ihre Ordinate (TG) entsprechen der relativen Veränderung der Probenmasse in % (100 % entspricht der Probenanfangsmasse von 95,2 mg). Die grüne Kurve und ihre Ordinate sind das DTA-Signal, d. h. die Temperaturdifferenz zwischen dem leeren Referenztiegel und dem Tiegel mit der Probe.



Abbildung E.15. Das Antiinsektenpflaster Hansaplast®.

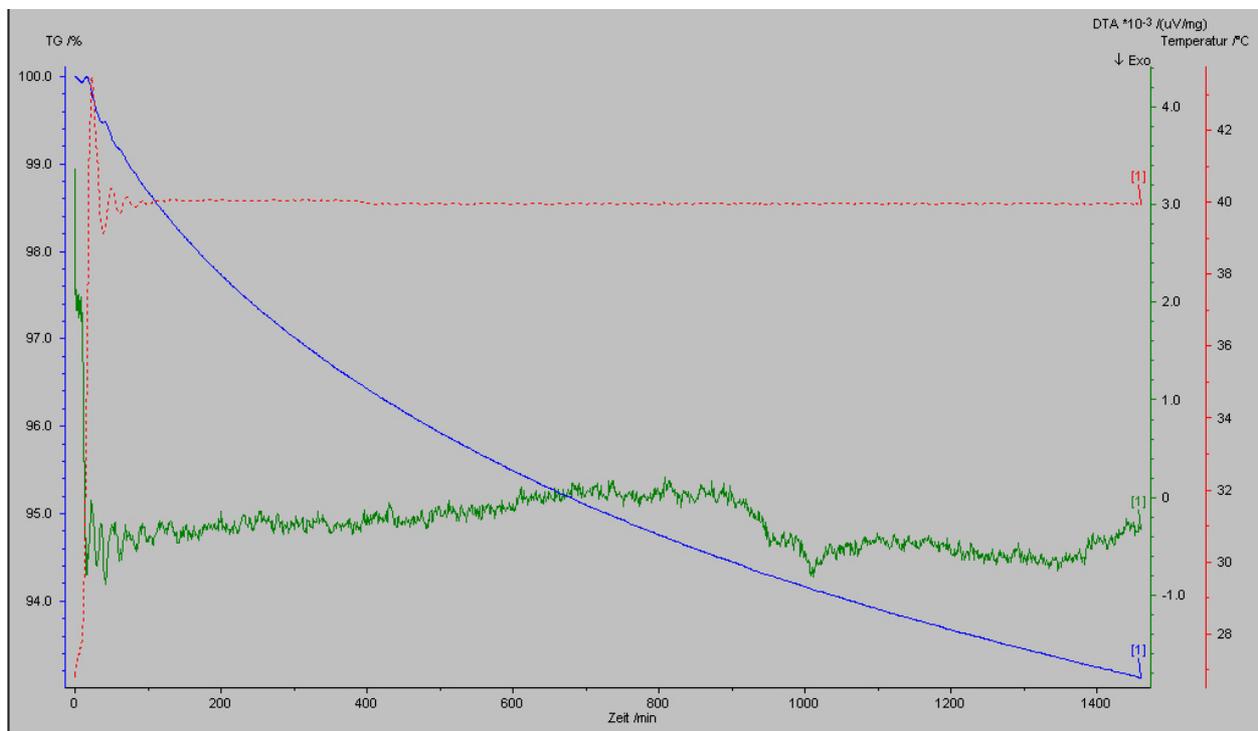


Abbildung E.16. Graphische Darstellung der TG-DTA-IR-Messung des Antiinsektenpflasters „Hansaplast®“.

Während der IR-Messungen zeigten sich innerhalb des Messvorgangs keine Signale. Auch die DTA-Kurve zeigt keine wesentlichen Veränderungen der Proben temperatur während der Messung.

Der Massenverlust der Probe nach 1460 Minuten (24 Stunden 20 Minuten) betrug 6,88 % (6,55 mg). Die Verdampfungskinetik des Wirkstoffes vom Antiinsektenpflaster (blaue Kurve, Abbildung E.16) kann mit einer Exponentialregression beschrieben werden:

$$y(t) = y_0 + (100 - y_0)e^{-t/k}, R^2 = 0,9973 \quad (\text{E.1})$$

wobei $y(t)$ die Abhängigkeit der Massenprozent der Probe von der Zeit t in Minuten ist; y_0 und k sind Konstanten:

$$y_0 = 92,654 \pm 0,014 \text{ (0,015 \% Fehler)},$$

$$k = 610,9 \pm 2,6 \text{ (0,43 \% Fehler)} \quad (\text{E.2})$$

Wie man in der Abbildung E.16 sieht, ist die Verdampfung des Wirkstoffes vom Antiinsektenpflaster selbst nach 24 Stunden noch nicht abgeschlossen. Annähernd kann man den Wirkstoffgehalt durch Extrapolation der Verdampfungskurve auf $t \rightarrow \infty$ bestimmen:

$$\lim_{t \rightarrow \infty} y(t) = y_0 \sim 92,65 \% \quad (\text{E.3})$$

Der Wirkstoffgehalt durch diese Bestimmung beträgt somit 7,35 % (7,00 mg).

E.IV TG-DTA-IR – Untersuchung des Klebstoffs „MA 73A“

Der Klebstoff „MA 37A“ wird für Pflaster verwendet. Er besteht aus einem Kohlenwasserstoff-Lösungsmittel wie z. B. einem Alkan, einer Polymerbasis wie Polyisobutylen und einer kleinen Menge an Kolophoniumharz. Das Ziel dieser Untersuchung war es, mittels TG-DTA-IR-Messung die ungefähren Gehalte dieser drei Bestandteile zu bestimmen.

Auf der Darstellung der TG-DTA-IR-Messung (Abbildung E.17) sind alle Kurven als Funktionen der Temperatur (Abszisse) angezeigt. Die blaue Kurve (TG) ist die relative

Veränderung der Probenmasse in % (100 % (Anfangsmasse 182,90 mg)). Die grüne Kurve ist das DTA-Signal, d. h. die Temperaturdifferenz zwischen dem leeren Referenztiegel und dem Tiegel mit der Probe. Wird die Differenz größer, so heißt das, dass ein endothermer Prozess stattfindet und die Temperatur der Probe sinkt. Dementsprechend wird ein exothermer Prozess von einer Erniedrigung der Temperaturdifferenz begleitet. Mit der schwarzen Punktlinie wird die Integralintensität des IR-Spektrometers angezeigt. Je höher diese ist, desto mehr Infrarot-Strahlen werden im IR-Gerät absorbiert.

Von 30 bis ca. 100° C beginnt das Heptan und/oder andere flüchtige Substanzen des Klebstoffs zu verdampfen (Massenverlust 21,63 %). Bei ca. 100°C sieht man den Anfang eines sehr schnellen Massenverlustes, was darauf hindeutet, dass die flüchtigen Substanzen siedend.

Der Siedepunkt von Heptan bei 1 bar beträgt 98,4° C. Auch in der DTA-Kurve sieht man einen Peak der Wärmeabsorption. Dieser Peak ist aber aufgespalten, was bedeuten kann, dass andere Substanzen neben Heptan im Kleber enthalten sind. Dies können andere Alkane sein: Hexan, Oktan, ihre Isomere oder Isomere des Heptans selbst und ähnliches.

In der Abbildung E.18 ist die 3D-Darstellung der IR-Messung angezeigt. Die Aufnahme der IR-Spektren erfolgt kontinuierlich. Da die Heizrate konstant ist (1 K min⁻¹) und die Messung bei 30° C angefangen wurde, kann man die Temperatur aus der Dauer der Messung berechnen:

$$T(^{\circ}\text{C}) = 30^{\circ}\text{C} + \frac{t(\text{sek})}{60(\text{sek})} \quad (\text{E.4})$$

wobei t die Zeit in Sekunden und T die Temperatur in Grad Celsius sind.

Die Maxima der IR-Absorption sieht man bei ca. 4790 Sekunden (110° C) und ca. 21060 Sekunden (381° C). Diese Zeitpunkte sind in der Abbildung E.18 mit der roten und der blauen horizontalen Linie gekennzeichnet. In der Abbildung E.19 kann man die aus diesen Zeitpunkten extrahierten IR-Spektren genauer ansehen. Die rote Kurve entspricht der roten Linie in der Abbildung E.18, die blaue Kurve der blauen Linie.

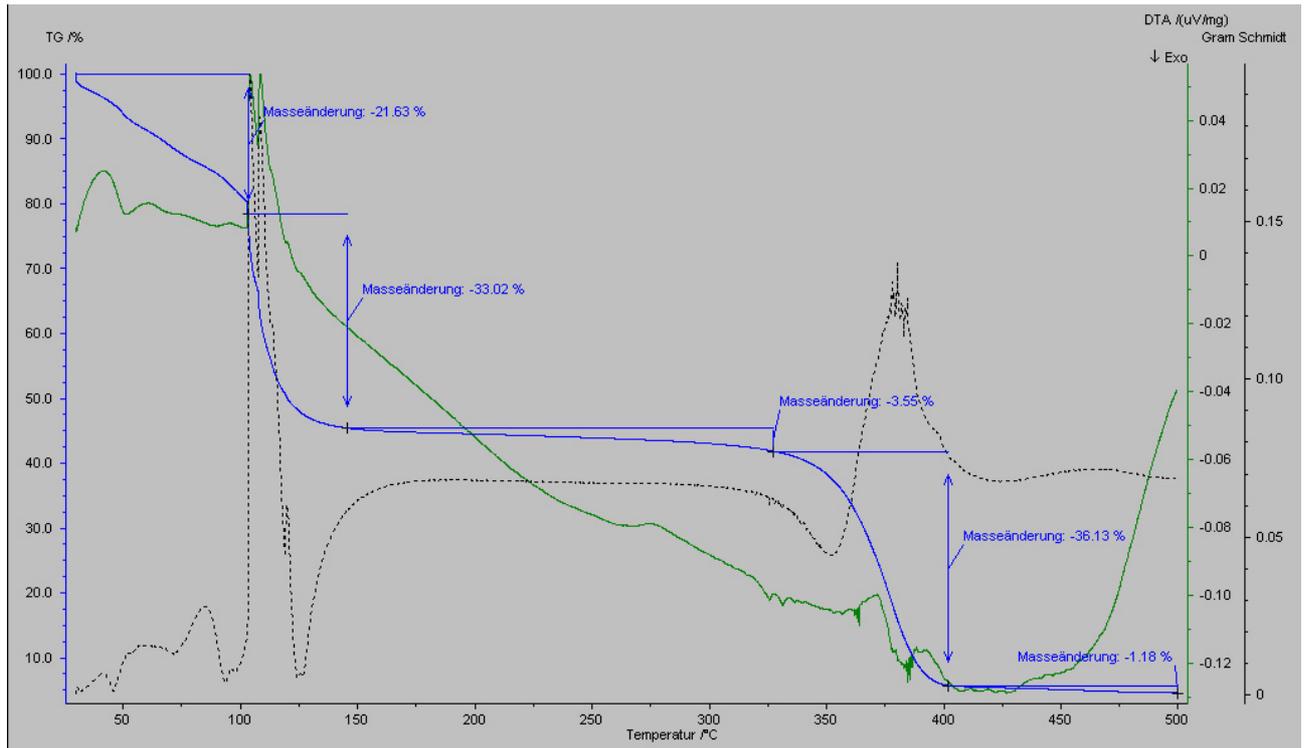


Abbildung E.17. Graphische Darstellung der TG-DTA-IR-Messung des Klebstoffs „MA 73A“ (Heizrate 5 K min⁻¹, unter Stickstoff-Atmosphäre).

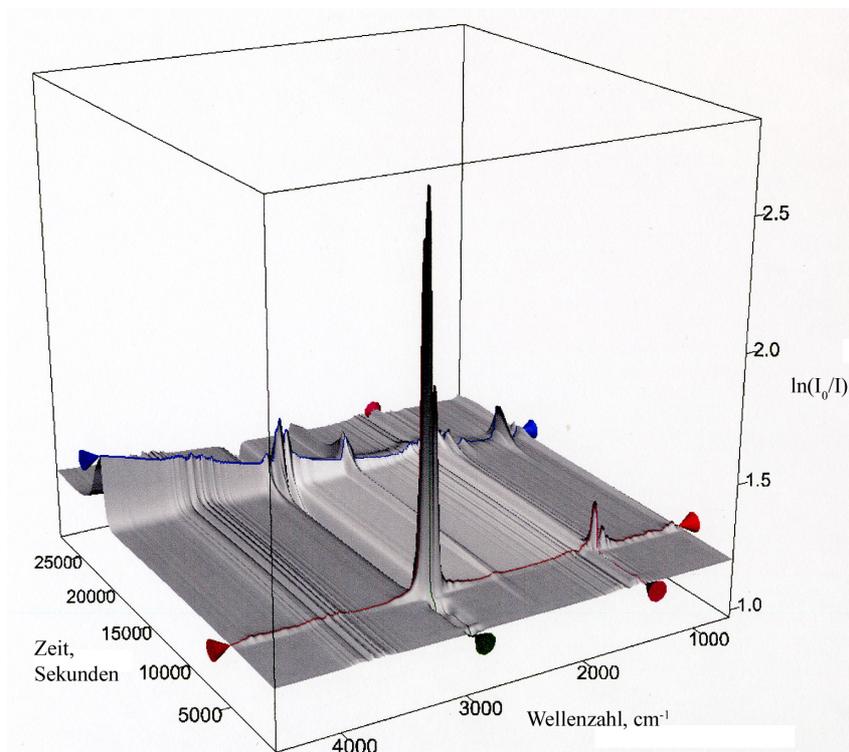


Abbildung E.18. 3D-Darstellung der während der TG-DTA-Messung des Klebstoffs „MA 73A“ aufgenommenen IR-Spektren.

Auf dem IR-Spektrum bei 110° C (Abbildung E.19) sieht man eine intensive Absorptionsbande bei 2927 cm⁻¹ und eine kleine bei 1459 cm⁻¹. Die erste Bande entspricht den C-H-Streckschwingungen, die zweite den C-C-Streckschwingungen, was auf Kohlenwasserstoffe hindeutet (Alkane).

Nachdem die flüchtigen Substanzen verdampft sind (ca. 145° C, Abbildung E.17), verschwinden alle Banden im IR-Spektrum (Abbildung E.18) und es tritt nur noch ein geringer Massenverlust bis ca. 330° C auf (Abbildung E.17). Der gesamte Massenverlust zu diesem Zeitpunkt beträgt 54,65 %. Diesen Wert kann man als den Anteil der flüchtigen Kohlenwasserstoff-Komponenten im Kleber betrachten.

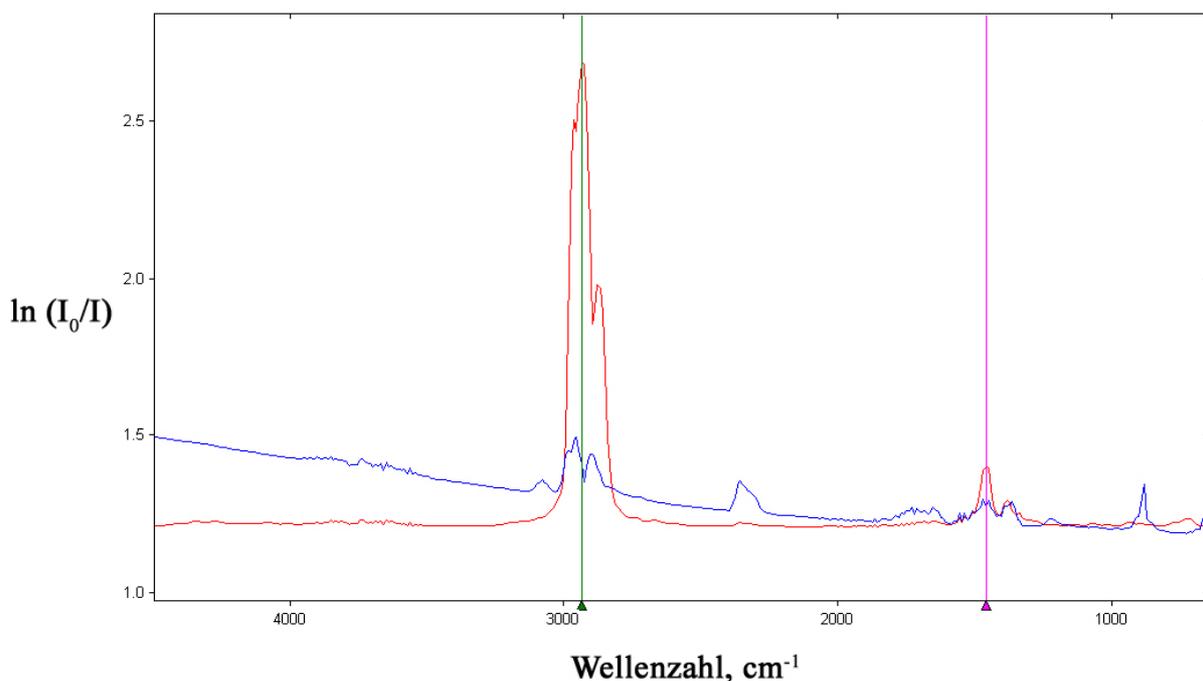


Abbildung E.19. Die während der TG-DTA-Messung des Klebstoffs „MA 73A“ aufgenommenen IR-Spektren: rote Kurve bei 110° C, blaue Kurve bei 381° C.

Bei ca. 330°C beginnt der Wert der Masse wieder schnell zu sinken (Abbildung E.17). Auch die IR-Absorption nimmt zu und erreicht ein Maximum bei ca. 380° C (Abbildung E.18). Im IR-Spektrum bei 381° C (Abbildung E.19) sieht man wie auch bei 110° C Absorptionsbanden bei 2927 cm⁻¹ (C-H) und 1459 cm⁻¹ (C-C), was auf Kohlenwasserstoffe hindeutet. Außerdem sind 2 kleine Banden bei 872 cm⁻¹ und 2349 cm⁻¹ zu sehen. Die erste Bande kann eine C-C-

Streckschwingung oder eine C-H-Deformationsschwingung sein (z. B. in Alkenen), die zweite Bande entspricht Streckschwingungen zwischen Kohlenstoff und einem mit ihm mit einer dreifachen Bindung gebundenen Element (z. B. $C\equiv C$, $C\equiv N$). In diesem Temperaturbereich verflüchtigt sich vermutlich die Polyisobutylene-Basis des Klebstoffes. Der Massenverlust beträgt dabei 36,13 %. In der DTA-Kurve ist dabei fast nichts zu sehen (Abbildung E.19).

Ab 400° C bleibt die Masse der Probe fast konstant. Die restliche Masse bei 500° C beträgt 4,49 % der Anfangsmasse. Der Reststoff ist vermutlich Kolophoniumharz. Der große Wärmeabsorptionspeak in der DTA ab 450° C kann durch Abdampfung bzw. Sublimation des Reststoffes erklärt werden.

F Literaturverzeichnis

- ¹ M. Vert, S. M. Li, G. Spenlehauer, P. Guerin, "Bioresorbability and Biocompatibility of Aliphatic Polyesters", *J. Mat. Sci. Mat. Med.* **1992**, 3, 432-446.
- ² M. Vert, G. Schwarch, J. Coudane, "Present and future of PLA polymers", *J. Macromol. Sci. Pure Appl. Chem.* **1995**, A32, 787-796.
- ³ K. A. Athanasiou, G. G. Niederauer, C. M. Agrawal, "Sterilization, toxicity, biocompatibility and clinical applications of polylactic acid/ polyglycolic acid copolymers", *Biomaterials* **1996**, 17, 93-102.
- ⁴ H. R. Kricheldorf, I. Kreiser-Saunders, C. Jürgens, D. Wolter, "Polylactides — synthesis, characterization and medical application", *Macromol. Symp.* **1996**, 103, 85-102.
- ⁵ R. K. Kulkarni, E. G. Moore, A. F. Hegyeli, F. Leonard, "Biodegradable poly(lactic acid) polymers", *J. Biomed. Mat. Res.* **1971**, 5(3), 169-181.
- ⁶ S. J. Holland, B. J. Tighe, P. L. Gould, "Polymers for biodegradable medical devices. 1. The potential of polyesters as controlled macromolecular release systems", *J. Contr. Release* **1986**, 4(3), 155-180.
- ⁷ T. Heya, H. Okada, Y. Ogawa, H. Toguchi, "Factors influencing the profiles of TRH release from copoly(d,l-lactic/glycolic acid) microspheres", *Int. J. Pharm.* **1991**, 72(3), 199-205.
- ⁸ C. Sturesson, J. Carlfors, K. Edsman, M. Andersson, "Preparation of biodegradable poly(lactic-co-glycolic) acid microspheres and their in vitro release of timolol maleate", *Int. J. Pharm.* **1993**, 89(3), 235-244.
- ⁹ C. M. Agrawal, K. A. Athanasiou, "Technique to control pH in vicinity of biodegrading PLA-PGA implants", *J. Biomed. Mater. Res.* **1997**, 38, 105-114.
- ¹⁰ L. Lu, S. J. Peter, M. D. Lyman, H. L. Lai, S. M. Leite, J. A. Tamada, J. P. Vacanti, R. Langer, A. G. Mikos, "In vitro degradation of porous poly(L-lactic acid) foams", *Biomaterials* **2000**, 21, 1595-1605.
- ¹¹ D. F. Williams, *Eng. Med.* **1981**, 10(1), 5.
- ¹² R. Jalil, J. R. Nixon, "Biodegradable poly(lactic acid) and poly(lactide-co-glycolide) microcapsules: problems associated with preparative techniques and release properties", *J. Microencapsulation* **1990**, 7, 297-325.
- ¹³ T. Chandy, R. F. Wilson, G. H. R. Rao, G. S. Das, "Changes in cisplatin delivery due to surface-coated poly(lactic acid)-poly(ϵ -caprolactone) microspheres", *J. Biomater. Appl.* **2002**, 16, 275-291.
- ¹⁴ Y. Lemmouchi, E. Schacht, P. Kageruka, R. De Deken, B. Diarra, O. Dially, S. Geerts, "Biodegradable polyesters for controlled release of trypanocidal drugs: in vitro and in vivo studies", *Biomaterials* **1998**, 19, 1827-1837.
- ¹⁵ T. F. Vandamme, J.-F. Ngombo Mukendi, "Controlled release of levamisole from poly(ϵ -caprolactone) matrices: III. Effects of molecular weight and polymer coating on drug release", *Int. J. Pharm.* **1996**, 145, 77-86.
- ¹⁶ X. Zhang, U. P. Wyss, D. Pichora, M. F. A. Goosen, "Biodegradable controlled antibiotic release devices for osteomyelitis: optimization of release properties", *J. Pharm. Pharmacol.* **1994**, 46, 718-724.
- ¹⁷ Y. Shen, W. Sun, K. J. Zhu, Z. Shen, "Regulation of biodegradability and drug release behavior of aliphatic polyesters by blending", *J. Biomed. Mat. Res.* **2000**, 50, 528-535.
- ¹⁸ X. Zhao, J. M. Harris, "Novel degradable poly(ethylene glycol) hydrogels for controlled release of protein", *J. Pharm. Sci.* **1998**, 87, 1450-1458.

- 19 X. Li, X. Deng, M. Yuan, C. Xiong, Z. Huang, Y. Zhang, W. Jia, "In vitro degradation and release profiles of poly-DL-lactide-poly(ethylene glycol) microspheres with entrapped proteins", *J. Appl. Polym. Sci.* **2000**, *78*, 140-148.
- 20 M. Wei, J. Chang, K. D. Yao, S. NG, J. Heller, "Drug release from poly(ortho esters)-poly(ethylene glycol) polyblend", *J. Appl. Polym. Sci.* **1999**, *71*, 303-309.
- 21 N. Murakami, N. Saito, H. Horiuchi, T. Okada, K. Nozaki, K. Takaoka, "Repair of segmental defects in rabbit humeri with titanium fiber mesh cylinders containing recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2) and a synthetic polymer", *J. Biomed. Mat. Res.* **2002**, *62*, 169-174.
- 22 X. Deng, Y. Liu, M. Yuan, X. Li, L. Liu, W. X. Jia, "Preparation and characterization of poly-DL-lactide-poly(ethylene glycol) microspheres containing DNA", *J. Appl. Polym. Sci.* **2002**, *86*, 2557-2566.
- 23 L. Liu, C. Li, X. Li, Z. Yuan, Y. An, B. He, "Biodegradable polylactide/poly(ethylene glycol)/polylactide triblock copolymer micelles as anticancer drug carriers", *J. Appl. Polym. Sci.* **2001**, *80*, 1976-1982.
- 24 H. Suh, B. Jeong, R. Rathi, S. Wan Kim, "Regulation of smooth muscle cell proliferation using paclitaxel-loaded poly(ethylene oxide)-poly(lactide/glycolide) nanospheres", *J. Biomed. Mat. Res.* **1998**, *42*, 331-338.
- 25 X. Li, S. Zhou, X. Wu, M. Yuan, L. Liu, W. Jia, X. Deng, Z. Huang, "Poly-DL-lactide-poly(ethylene glycol) microspheres as oral and parenteral delivery systems for hepatitis B surface antigen", *J. Appl. Polym. Sci.* **2002**, *83*, 850-856.
- 26 S. K. Choi, D. Kim, "Drug-releasing behavior of MPEG/PLA block copolymer micelles and solid particles controlled by component block length", *J. Appl. Polym. Sci.* **2002**, *83*, 435-445.
- 27 J.-J. Yu, Y.-I. Jeong, Y.-H. Shim, G.-T. Lim, "Preparation of core-shell type nanoparticles of diblock copolymers of poly(L-lactide)/poly(ethylene glycol) and their characterization *in vitro*", *J. Appl. Polym. Sci.* **2002**, *85*, 2625-2634.
- 28 A. Göpferich, M. J. Alonso, R. Langer, "Development and characterization of microencapsulated microspheres", *Pharmaceut. Res.* **1994**, *11*, 1568-1574.
- 29 U. Edlund, A.-C. Albertsson, "Novel drug delivery microspheres from poly(1,5-dioxepan-2-one-co-L-lactide)", *J. Polymer Sci. A.: Polym. Chem.* **1999**, *37*, 1877-1884.
- 30 X. S. Wu. *Synthesis and properties of biodegradable lactic/glycolic acid polymers*. In: Wise. *Encyclopedic Handbook of Biomaterials and Bioengineering*. New York: Marcel Dekker, **1995**, 1551-1200.
- 31 R. Arshady, "Preparation of biodegradable microspheres and microcapsules: 2. Polylactides and related polyesters", *J. Contr. Release* **1991**, *17*, 1-22.
- 32 R. Wada, S.-H. Hyon, I. O., W. S., S. Y., I. Y., "Preparation of lactic acid oligomer microspheres containing anti-cancer drug by o/o type solvent evaporation process", *Polym. Mat. Sci. Engng.* **1988**, *59*, 803-806.
- 33 M. Cavalier, J. P. Benoit, C. Thies, "The formation and characterisation of hydrocortisone-loaded poly((±)-lactide) microspheres", *J. Pharm. Pharmacol.* **1986**, *38*, 249-253.
- 34 C. Thies, M. C. Bissery. *Biodegradable microspheres for parental administration*. In: F. Lim. *Biomedical applications of microencapsulation*. Boca Raton, FL: CRC Press, **1984**, 53-57.
- 35 D. C. Tsai, S. A. Howard, T. F. Hogan, C. J. Malanga, S. J. Kandzari, J. K. H. Ma, "Preparation and in vitro evaluation of polylactic acid-mitomycin C microcapsules", *J. Microencapsulation* **1986**, *3*, 181-193.

- 36 D. H. Lewis. *Controlled release of bioactive agents from lactide/glykolide polymers*. In: M. Chasin, R. Langer. *Biodegradable polymers as drug delivery systems*. New York: Marcel Dekker, **1990**, 1-41.
- 37 R. A. Jain, "The manufacturing techniques of various drug-loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) devices", *Biomaterials* **2000**, *21*, 2475-2490.
- 38 R. Bodmeier, J. W. McGinity, "Poly(lactic acid) microcapsules containing quinidine sulfate prepared by solvent evaporation technique. III. Morphology of the microspheres during dissolution studies", *J. Microencapsulation* **1988**, *5*, 325-330.
- 39 M. Dunne, O. I. Corrifa, Z. Ramtoola, "Influence of particle size and dissolution conditions on the degradation properties of polylactide-co-glykolide particles", *Biomaterials* **2000**, *21*, 1659-1668.
- 40 R. Jeyanthi, B. C. Thanoo, R. C. Metha, P. P. DeLuca, "Effect of solvent removal technique on the matrix characteristics of polylactide/glycolide microspheres for peptide delivery", *J. Control. Release* **1996**, *38*, 235-244.
- 41 J. F. Fitzgerald, O. I. Corrigan, "Investigation of the mechanism governing the release of levamisole from polylactide-co-glycolide delivery systems", *J. Contr. Release* **1996**, *42*, 125-132.
- 42 M. Siedler. Untersuchungen an festkörperchemisch darstellbaren biodegradierbaren Polyhydroxycarbonsäuren - Synthese und Anwendung in der Medizintechnik. *Dissertation*. Universität Hamburg, **2001**.
- 43 B. W. Wagenaar, B. W. Müller, "Piroxicam release from spray-dried biodegradable microspheres", *Biomaterials* **1994**, *15*, 49-54.
- 44 M. R. Kreitz, J. A. Domm, E. Mathiowitz, "Controlled delivery of therapeutics from microporous membranes. II. In vitro degradation and release of heparin-loaded poly(D,L-lactide-co-glycolide)", *Biomaterials* **1997**, *18*, 1645-1651.
- 45 Y. Y. Yang, T. S. Chung, N. P. Nag, "Morphology, drug distribution and in vitro release profiles of biodegradable polymeric microspheres containing protein fabricated by double-emulsion solvent extraction/evaporation method", *Biomaterials* **2001**, *22*, 231-241.
- 46 D. A. Eppstein, J. P. Longenecker, "Alternative delivery systems for peptides and proteins as drugs", *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Systems* **1988**, *5*, 99-139.
- 47 K. J. Zhu, L. Xiangzhou, Y. Shilin, "Preparation, characterization, and properties of polylactide (PLA)-poly(ethylene glycol) (PEG) copolymers: A potential drug carrier", *J. Appl. Polym. Sci.* **1990**, *39(1)*, 1-9.
- 48 K. J. Zhu, S. Bihai, Y. Shilin, ""Super microcapsules" (SMC). I. Preparation and characterization of star polymethylene oxide (PEO)-polylactide (PLA) copolymers", *J. Polym. Sci. A: Polym. Chem.* **1989**, *27(7)*, 2151-2159.
- 49 K. J. Zhu, L. Xiangzhou, Y. Shilin, "Preparation and properties of D,L-lactide and ethylene oxide copolymer: A modifying biodegradable polymeric material", *J. Polym. Sci. C: Polym. Lett.* **1986**, *24(7)*, 331-337.
- 50 H. Younes, D. Cohn, "Morphological study of biodegradable PEO/PLA block copolymers", *J. Biomed. Mat. Res.* **1987**, *21(11)*, 1301.
- 51 P. Cerrari, M. Tricoli, *Makromol. Chem. Rapid Commun.* **1993**, *14*, 529.
- 52 S. M. Li, I. Rashkov, J. L. Espartero, N. Manolova, M. Vert, "Synthesis, Characterization, and Hydrolytic Degradation of PLA/PEO/PLA Triblock Copolymers with Long Poly(L-lactic acid) Blocks", *Macromolecules* **1996**, *29(1)*, 57-62.
- 53 I. Rashkov, N. Manolova, S. M. Li, J. L. Espartero, M. Vert, "Synthesis, Characterization, and Hydrolytic Degradation of PLA/PEO/PLA Triblock Copolymers with Short Poly(L-lactic acid) Chains", *Macromolecules* **1996**, *29(1)*, 50-56.

- 54 X. Chen, S. P. McCarthy, R. A. Gross, "Synthesis and Characterization of [L]-Lactide-Ethylene Oxide Multiblock Copolymers", *Macromolecules* **1997**, *30*(15), 4295-4301.
- 55 X. M. Deng, C. D. Xiong, L. M. Cheng, R. P. Xu, "Synthesis and characterization of block copolymers from D,L-lactide and poly(ethylene glycol) with stannous chloride", *J. Polym. Sci. Polym. Lett. Ed.* **1990**, *28*(13), 411-416.
- 56 R. Gref, Y. Minamitake, M. T. Peracchia, V. Trubetskoy, V. Torchilin, R. Langer, "Biodegradable long-circulating polymeric nanospheres", *Science* **1994**, *263*, 1600-1603.
- 57 Y. I. Jeong, J. B. Cheon, S. H. Kim, J. W. Nah, Y. M. Lee, Y. K. Sung, T. Akaike, C. S. Cho, "Clonazepam release from core-shell type nanoparticles in vitro", *J. Contr. Release* **1998**, *51*(2-3), 169-178.
- 58 G. S. Kwon, M. Naito, M. Yokoyama, T. Okano, Y. Sakurai, K. Kataoka, "Physical Entrapment of Adriamycin in AB Block Copolymer Micelles", *Pharmaceut. Res.* **1995**, *12*(2), 192-195.
- 59 G. Kwon, M. Naito, M. Yokoyama, T. Okano, Y. Sakurai, K. Kataoka, "Micelles based on AB block copolymers of poly(ethylene oxide) and poly(β -benzyl L-aspartate)", *Langmuir* **1993**, *9*(4), 945-949.
- 60 S. B. La, T. Okano, K. Kataoka, "Preparation and characterization of the micelle-forming polymeric drug indomethacin-incorporated poly(ethylene oxide)-poly(β -benzyl L-aspartate) block copolymer micelles", *J. Pharm. Sci.* **1996**, *85*(1), 85-90.
- 61 J. W. Nah, Y. I. Jeong, C. S. Cho, "Clonazepam release from core-shell type nanoparticles composed of poly(γ -benzyl L-glutamate) as the hydrophobic part and poly(ethylene oxide) as the hydrophilic part", *J. Polym. Sci. B. Polym. Phys.* **1998**, *36*(3), 415-423.
- 62 Y. C. Chung, J. M. Jeong, J. H. Hwang, "Comparison of a Polymerized Liposome with Nonpolymerizable Ones", *Bull. Kor. Chem. Soc.* **1998**, *19*(7), 780.
- 63 S. Vemuri, C. T. Rhodes, "Preparation and characterization of liposomes as therapeutic delivery systems: a review", *Pharm. Acta Helv.* **1995**, *70*(2), 95-111.
- 64 A. L. Klibanov, K. Maruyama, V. P. Torchilin, L. Huang, "Amphipathic polyethyleneglycols effectively prolong the circulation time of liposomes", *FEBS Lett.* **1990**, *268*(1), 235-237.
- 65 S. E. Dunn, A. Brindley, S. S. Davis, M. C. Davies, L. Illum, "Polystyrene-Poly(Ethylene Glycol) (PS-PEG2000) Particles as Model Systems for Site Specific Drug Delivery. 2. The Effect of PEG Surface Density on the in Vitro Cell Interaction and in Vivo Biodistribution", *Pharmaceut. Res.* **1994**, *11*(7), 1016-1022.
- 66 L. Illum, I. M. Hunneyball, S. S. Davis, "The effect of hydrophilic coatings on the uptake of colloidal particles by the liver and peritoneal macrophages", *Int. J. Pharm.* **1986**, *29*(1), 53-65.
- 67 C. Schmidt, R. Wenz, B. Nies, F. Moll, "Antibiotic in vivo/in vitro release, histocompatibility and biodegradation of gentamicin implants based on lactic acid polymers", *J. Contr. Release* **1995**, *37*, 83-94.
- 68 N. Kinou, Y. Ogura, M. Hashizoe, Y. Honda, S.-H. Hyon, Y. Ikada, "Controlled delivery of ganciclovir with use of biodegradable scleral implant in rabbits", *J. Contr. Release* **1995**, *37*, 143-150.
- 69 J. H. Kou, C. Emmett, P. Shen, S. Aswani, T. Iwamoto, F. Vaghefi, G. Cain, L. Sanders, "Bioerosion and biocompatibility of poly(D,L-lactic-co-glycolic acid)", *J. Contr. Release* **1997**, *43*, 123-130.
- 70 I. Kaetsu, "Biodegradable implant composites for local therapy", *J. Contr. Release* **1987**, *6*, 249-263.
- 71 R. DePonti, C. Torricelli, A. Martini, E. Lardini. Use of supercritical fluids to obtain porous spongy biodegradable polymers. *EP 90/01895 (1991)*

- 72 K. Whang, T. K. Goldstick, K. E. Healy, "A biodegradable polymer scaffold for delivery
of osteotropic factors", *Biomaterials* **2000**, *21*, 2545-2551.
- 73 A. Tschakaloff, R. von Oepen, S. Seibt, M. Vieting, W. Michaeli, "Das
Begasungsverfahren zur Beladung resorbierbarer Polymere mit thermolabilen
74 Substanzen", *Dtsch. Z. Mund Kiefer GesichtsChir.* **1996**, *20*, 47-50.
- R. Nakaoka, Y. Tabata, Y. Ikada, "Antibody production by administration of
biodegradable granules incorporating antigen through different injection routes", *J.*
Contr. Release **1996**, *40*, 11-21.
- 75 N. H. Shah, A. S. Railkar, F. C. Chen, R. Tarantino, S. Kumar, M. Murjani, D. Palmer,
M. H. Infeld, A. W. Malick, "A biodegradable injectable implant for delivering micro
and macromolecules using poly(lactic-co-glycolic) acid (PLGA) copolymers", *J. Contr.*
Release **1993**, *27*, 139-147.
- 76 M. L. Shively, B. A. Coonts, W. D. Renner, J. L. Southard, A. T. Bennett, "Physico-
chemical characterization of a polymeric injectable implant delivery system", *J. Contr.*
Release **1995**, *33*, 237-243.
- 77 W. Linhart, F. Peters, W. Lehmann, A. F. Schilling, K. Schwarz, M. Amling, J. M.
Rueger, M. Epple, "Biologically and chemically optimized composites of carbonated
apatite and polyglycolide as bone substitution materials", *J. Biomed. Mater. Res.* **2001**,
54, 162-171.
- 78 H. R. Kricheldorf, *Handbook of polymer synthesis*, Marcel Dekker, New York, **1992**.
- 79 G. T. Long, S. Vyazovkin, N. Gamble, C. A. Wight, "Hard to swallow: kinetics and
mechanism of the anhydrous thermal decomposition of acetylsalicylic acid", *J. Pharm.*
Sci. **2002**, *91*, 800-809.
- 80 R. Hoffmann, "Ueber Monochloressigsaeure", *Liebigs Ann. Chem.* **1857**, *102*, 1-20.
- 81 A. Kekulé, "IV. Bildung von Glycolsaeure aus Essigsaeure", *Liebigs Ann. Chem.* **1858**,
105, 288-292.
- 82 O. Herzberg, M. Epple, "Formation of polyesters by thermally induced polymerization
reactions of molecular solids", *Eur. J. Inorg. Chem.* **2001**, 1395-1406.
- 83 B. Kutscher, M. Bernd, T. Beckers, E. E. Polymeropoulos, J. Engel, "Chemie und
Molekularbiologie bei der Suche nach neuen LHRH-Antagonisten", *Angew. Chem.* **1997**,
109, 2240-2254.
- 84 G. Flouret, Z. S. Arnold, T. Majewski, N. H. Petousis, K. Mahan, F. Farooqui, K. A.
Blum, D. Konopinska, S. Natarajan, D. Crich, "Antioviulatory antagonists of LHRH
related to antide", *Pept. Sci.* **1995**, *1*, 89-108.
- 85 P. M. Conn, W. F. Crowley, "Gonadotropin-releasing hormone and ist analogs", *Annu.*
Rev. Med. **1994**, *45*, 391-405.
- 86 A. V. Schally, S. M. McCann, "The Privileges of a Nobel Laureate", *Fertil. Steril.* **1995**,
64, 452-453.
- 87 A. V. Schally, A. Arimura, A. J. Kastin, "Gonadotropin-releasing hormone: one
polypeptide regulates secretion of luteinizing and follicle-stimulating hormones", *Science*
1971, *173*, 1036-1038.
- 88 H. Matsuo, Y. Baba, R. M. Nair, A. Arimura, A. V. Schally, "Structure of the porcine
LH- and FSH-releasing hormone. I. The proposed amino acid sequence", *Biochem.*
Biophys. Res. Commun. **1971**, *43*, 1334-1339.
- 89 G. Emons, A. V. Schally, "The use of luteinizing hormone releasing hormone agonists
and antagonists in gynaecological cancers", *Hum. Reprod.* **1994**, *9*, 1364-1379.
- 90 P. M. Conn, W. Crowley, "Gonadotropin-releasing hormone and ist analogues", *New*
Engl. J. Med. **1991**, *324*, 93-103.
- 91 G. F. Weinbauer, E. Nieschlag. In: Springer, Heidelberg. *Peptides in Oncology I.* **1992**,
113-136.

- 92 A. S. Dutta, "Luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) antagonists", *Drugs of the Future* **1988**, *13*, 43-57.
- 93 M. Filicori, C. Flamingi, "GnRH agonists and antagonists: a review of their current status", *Drugs* **1988**, *35*, 63-82.
- 94 M. T. Goulet, *Annu. Rep. Med. Chem.* **1995**, *30*, 169-178.
- 95 T. Reissmann, R. Felberbaum, K. Dietrich, J. Engel, A. M. Comaru-Schally, A. V. Schally, "Development and application of luteinizing hormone-releasing hormone antagonists in the treatment of infertility: an overview", *Hum. Reprod.* **1995**, *10*, 1974-1981.
- 96 J. Lunt, "Large-scale production, properties and commercial applications of polylactic acid polymers", *Polym. Degrad. Stab.* **1998**, *59*, 145-152.
- 97 D. K. Gilding, A. M. Reed, "Biodegradable polymers for use in surgery - polyglycolide/poly(lactic acid) homo- and copolymers: 1", *Polymer* **1979**, *20*, 1459-1464.
- 98 K. Enomoto, M. Ajioka, A. Yamaguchi. *US Patent* 5,310,865 (**1994**)
- 99 F. E. Kohn, J. G. van Ommen, J. Feijen, "The mechanism of the ring-opening polymerization of lactide and glycolide", *Eur. Polym. J.* **1983**, *19(12)*, 1081-1088.
- 100 M. Epple, H. Kirschnick, "The thermally induced solid-state polymerization reaction in halogenoacetates", *Chem. Ber.* **1996**, *129*, 1123-1129.
- 101 M. Siedler, S. J. Kitchin, K. D. M. Harris, A. L. C. Lagoa, H. P. Diogo, M. E. M. da Piedade, M. Epple, "Porous Poly(D,L-lactide) and poly(D,L-lactide-co-glycolide) by thermal salt elimination from halogenocarboxylates", *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **2001**, 3140-3148.
- 102 K. Schwarz. Biodegradable polyesters from solid-state precursors - basic components of biomedical materials concept. *Dissertation*. Universität Hamburg, **2001**.
- 103 P. A. Lovell. *Dilute solution viscosimetry*. In: *Comprehensive polymer science, vol. 1*. Pergamon, Oxford, New York, Beijing, Frankfurt, Sao Paulo, Sydney, Tokyo, Toronto: **1989**, 173-197.
- 104 R. A. Kenley, M. O. Lee, T. R. Mahoney, L. M. Sanders, "Poly(lactide-co-glycolide) decomposition kinetics in vivo and in vitro", *Macromolecules* **1987**, *20*, 2398-2403.
- 105 G. Rafler, J. Dahlmann, K. Wiener, "Biologisch abbaubare Polymere. 1. Mitt.: Viskositäts-Molmassen-Beziehung für poly-D,L-lactid und Poly(glycolid(50)-co-lactid(50))", *Acta Polym.* **1990**, *41*, 328-333.
- 106 M. Nof, L. D. Shea, "Drug-releasing scaffolds fabricated from drug-loaded microspheres", *J. Biomed. Mat. Res.* **2002**, *59*, 349-356.
- 107 S. J. Liu, S. W. N. Ueng, E. C. Chan, S. S. Lin, C. H. Tsai, F. C. Wei, C. H. Shih, "In vitro Elution of Vancomycin from Biodegradable Beads", *J. Biomed. Mat. Res. (Appl. Biomater.)* **1999**, *48*, 613-620.
- 108 F. Qian, A. Szymaski, J. Gao, "Fabrication and characterization of controlled release poly(D,L-lactide-co-glycolide) millirods", *J. Biomed. Mat. Res.* **2001**, *55*, 512-522.
- 109 S. S. Lin, S. W. N. Ueng, S. J. Liu, E. C. Chan, E. K. Chao, C. H. Tsai, K. T. Chen, F. C. Wei, C. H. Shih, "Development of a Biodegradable Antibiotic Delivery System", *Clin. Orthop. Rel. Res.* **1999**, *1(362)*, 240-250.
- 110 E. Sánchez, M. Baro, I. Soriano, A. Perera, C. Évora, "In vivo-in vitro study of biodegradable and osteointegrable gentamicin bone implants", *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2001**, *52*, 151-158.
- 111 M. Ramchandani, D. Robinson, "In vitro and in vivo release of ciprofloxacin from PLGA 50:50 implants", *J. Contr. Release* **1998**, *54*, 167-175.
- 112 G. Wang, I. G. Tucker, M. S. Roberts, L. W. Hirst, "In Vitro and in Vivo Evaluation in Rabbits of a Controlled Release 5-fluorouracil Subconjunctival Implant Based on Poly(D,L-lactide-co-glycolide)", *Pharmaceut. Res.* **1996**, *13(7)*, 1059-1064.

- ¹¹³ N. Marcotte, A. Polk, M. F. A. Goosen, "Kinetics of Protein Diffusion from a Poly(D,L-Lactide) Reservoir System", *J. Pharm. Sci.* **1990**, 79(5), 407-410.
- ¹¹⁴ X. Zhang, U. P. Wyss, D. Pichora, B. Amsden, M. F. A. Goosen, "Controlled release of albumin from biodegradable poly(DL-lactide) cylinders", *J. Contr. Release* **1993**, 25, 61-69.
- ¹¹⁵ X. Zhang, K. B. McAuley, M. F. A. Goosen, "Towards predictions of release profiles of antibiotics from coated poly(DL-lactide) cylinders", *J. Contr. Release* **1995**, 34, 175-179.
- ¹¹⁶ J. Rich, T. Karjalainen, L. Ahjopalo, J. Seppälä, "Model Compound Release from DL-Lactide/ ϵ -Caprolactone Copolymers and Evaluation of Specific Interactions by Molecular Modeling", *J. Appl. Polym. Sci.* **2002**, 86, 1-9.
- ¹¹⁷ *SDBS-Integrated Spectral Data Base System for Organic Compounds.*
- ¹¹⁸ R. Hariharan, A. G. Pinkus, "Useful NMR solvent mixture for polyesters: trifluoroacetic acid-d/chloroform-d", *Polym. Bull.* **1993**, 30, 91-95.

G Zusammenfassung

Das Hauptziel der Arbeit war es herauszufinden, inwiefern die porösen Polyester Poly-D,L-lactid, PDLLA, und Polyglycolid, PGA, die durch die festkörperchemischen Polymerisationsreaktionen aus den Natrium-Salzen der entsprechenden α -Chlorcarbonsäuren (Natrium-(R,S)-2-chlorpropionat und Natriumchloracetat) hergestellt wurden, für eine kontinuierliche Wirkstofffreisetzung in wässrigen Medien geeignet sind.

Das als Nebenprodukt der Polymerisationsreaktionen entstehende Natriumchlorid scheidet sich in Form von Mikrokristallen (mit Größenordnung unter einem Mikrometer) innerhalb der Polymermatrix ab. Durch das Auswaschen von Natriumchlorid mit Wasser entsteht somit ein mikroporöses Polymer, das mit einem Wirkstoff beladen werden kann.

Die angestrebte Freisetzung sollte möglichst linear sein und eine beträchtliche Zeitspanne (mehr als drei Monate) andauern. Der Beladungsgrad der Freisetzungskörper sollte dabei etwa 30 % betragen. Solche Freisetzungseigenschaften sind insbesondere für eine Hormontherapie förderlich, in der eine geringe Menge Wirkstoff innerhalb eines langen Zeitraumes abgegeben werden soll. Als Modellwirkstoffe wurden die Aminosäure L-Phenylalanin und das LHRH-Agonist Goserelin in seiner Monoacetat-Form verwendet. Wegen der großen Hydrophilie beider Wirkstoffe, ihrer hohen Wasserlöslichkeit und des beachtlichen Beladungsgrades der Freisetzungskörper von etwa 30 % war die Erzielung einer langsamen und linearen Wirkstofffreisetzung problematisch. Die mikroporösen Polyester PDLLA und PGA waren in dieser Hinsicht interessante Materialien, da die Poren in diesen Polymeren mit einer Wirkstofflösung durch Sorption bei Raumtemperatur beladen werden können. Nachdem das Lösungsmittel durch Abdampfen entfernt wird, bleibt der Wirkstoff in den Mikroporen. Nachfolgende Kompaktierung bei Raumtemperatur oder bei leicht erhöhten Temperaturen führt im Idealfall zu einem Polymerimplantat mit einem in der Polymermatrix eingeschlossenem

Wirkstoff. Durch diese Methode wird jegliche thermische Einwirkung auf den Wirkstoff vermieden.

Die ungefähre Temperatur des Polymerisationsbeginns für Natrium-(R,S)-2-chlorpropionat und Natriumchloracetat wurde durch die Ergebnisse der DSC-Untersuchungen ermittelt. Der Reaktionsverlauf wurde durch Messung von IR-Spektren der direkt aus der Reaktionsmischung entnommenen Proben kontrolliert. Die erhaltenen Produkte wurden mittels Viskosimetrie, DSC, IR, REM und $^1\text{H-NMR}$ (nur PDLLA) charakterisiert.

Die hergestellten Polymere unterschieden sich sehr in ihren physikalischen Eigenschaften. Das PGA war partiell kristallin, während das PDLLA völlig röntgenamorph war. Durch seine Struktur hat das PGA einen relativ hohen Schmelzpunkt und ist nur in sehr wenigen Lösungsmitteln löslich. Zum Unterschied von PGA ist PDLLA gut in vielen organischen Lösungsmitteln wie Aceton, Dichlormethan, Chloroform, Ethylacetat löslich.

Der erste Teil der Untersuchungen der Wirkstofffreisetzung aus porösen Polyestern wurde mit uniaxial gepressten Formkörpern mit dem Modellwirkstoff L-Phenylalanin durchgeführt. Die Konzentration des Phenylalanins in wässrigen Lösungen während der Freisetzung wurde mittels UV-Spektroskopie bestimmt. Alle Formkörper wurden durch uniaxiales Verpressen in einer Pressform aus Edelstahl in einer hydraulischen Presse hergestellt.

Die erste Freisetzung wurde mit 9 %ig beladenem Stäbchen aus porösem PDLLA durchgeführt. Die ganze Menge an Phenylalanin war schon nach ca. 40 Stunden freigesetzt. Ein weiteres Stäbchen wurde aus porösem PGA und mit 9 % Phenylalanin hergestellt. In diesem Fall erfolgte die Freisetzung ebenfalls sehr schnell (ca. zwei Tage), obwohl das Stäbchen nach dem Ende der Freisetzung seine ursprüngliche Geometrie behielt. Das zeugt davon, dass die Freisetzung selbst bei einem nicht so hohen Beladungsgrad (9 %) eher diffusions- als degradationskontrolliert ist.

Das nächste Stäbchen aus PGA wurde mit 30 % Phenylalanin beladen. Das Stäbchen wurde in sechs gleiche Würfel zersägt. Vier von den Würfeln wurden mit PLLA (8x und 14x) und

PDLLA (1x und 13x) beschichtet. Die Beschichtung erfolgte durch Eintauchen in eine Lösung von Hochmolekulargewicht-PLLA (Resomer[®] L210, Boehringer) oder PDLLA (Resomer[®] R207, Boehringer) in Chloroform. Bei der PLLA 8x-Beschichtung wurde die Freisetzung auf vier Tage verlangsamt. Bei der PLLA 14x-Beschichtung betrug die Freisetzungsdauer ca. 9 Tage. Die PDLLA 1x-Beschichtung ist vergleichbar mit der PLLA 8x-Beschichtung. Bei der PDLLA 13x-Beschichtung verlief die Freisetzung innerhalb von 75 Tagen fast linear. Die PDLLA-Beschichtungen waren somit viel wirksamer als die PLLA-Beschichtungen.

Dann wurde eine neue Methode zur Präparation von PGA-Formkörpern getestet: einfaches Vermischen von Phenylalanin mit PGA mit oder ohne Zusatz von PDLLA (Boehringer) und Verpressen unter sehr hoher Stempelkraft (120 kN). Ein Zusatz von PDLLA vor dem Verpressen sollte als Fließhilfsmittel dienen. Die PLLA-Beschichtungen hatten hier auch keinen bedeutenden Einfluss auf die Freisetzungskinetik. Bei der PDLLA 13x-Beschichtung lief die Freisetzung aber langsamer als im Fall vom vorherigen Stäbchen, das unter dem kleineren Druck hergestellt wurde. Eine Korrelation zwischen der Anzahl der Beschichtungsvorgänge und der Freisetzungsdauer war zu erkennen. Die Freisetzungen für die Würfel, die unter dem Zusatz von PDLLA (Boehringer) hergestellt wurden, verliefen für die Formkörper mit dünnen PDLLA-Beschichtungen langsamer.

Da ohne äußere Polymerschicht jede der oben angeführten Freisetzungen eine viel geringere Dauer hätte, bestand das Problem, die Freisetzungskinetik zu verlangsamen, auch wenn ein beschichteter Freisetzungskörper zufällig abbricht. Denn wenn ein Implantat zufällig im Körper abbricht, würde man auf diese Weise kurzfristig eine Dosis erhalten, die sonst erst innerhalb von drei Monaten freigesetzt würde. Dafür wurde ein Stäbchen hergestellt, in dem alle beladenen PGA-Partikel vor dem Pressen mit PDLLA (Boehringer) aus einer Lösung in Chloroform beschichtet wurden. Ein solches Verfahren konnte die Freisetzungsdauer bis auf fünf Tagen verlangsamen. Im Vergleich zu den Formkörpern mit einer äußeren PDLLA-Beschichtung kann

dieses Verfahren hinsichtlich Effektivität nur mit der PDLLA 1x-Beschichtung verglichen werden.

Betrachtete man die unterschiedlichen zeitlichen Verläufe der Freisetzung von Phenylalanin aus den bei verschiedenen Stempelkräften hergestellten PGA-Formkörpern, so lag der Schluss nahe, dass es ebenfalls eine analoge Korrelation der Freisetzungskinetik für Formkörper aus porösem PDLLA mit Goserelin als Wirkstoff geben sollte. Für diese Untersuchungen wurde mikroporöses PDLLA mit 30 % Goserelin beladen und mit verschiedenen Stempelkräften verpresst. Von diesen Stäbchen wurden Würfel abgesägt und mit einer PDLLA(Boehringer)-Aceton Lösung durch Eintauchen 3x mit PDLLA beschichtet. Bei Kenntnis der Dichte des PDLLA konnte die theoretische Dicke der PDLLA-Schichten auf den Würfeln berechnet werden. Bei Kenntnis der Dichten der hergestellten Würfel (ohne Beschichtung) konnte auch die Porosität bestimmt werden. Da die genaue Dichte der Goserelin-Kristalle unbekannt ist, wurde die theoretische Dichte der PDLLA-Goserelin-Mischung wie die Dichte von einer Mischung aus 30 % Zucker und 70 % PDLLA berechnet. Die Freisetzungskinetik von Goserelin war in diesem Fall von dem Herstellungsdruck unabhängig.

Der zweite Teil der Untersuchungen zur Wirkstofffreisetzung aus porösen Polyestern wurde mit extrudierten Formkörpern mit dem Modellwirkstoff Goserelin-Acetat durchgeführt. Die ersten Extrusionsversuche wurden mit Hilfe des Extruders Rheoflixer[®] bei der Firma Novosis (Miesbach) durchgeführt. Stäbchen mit PGA wurden durch eine Herstellungsmethode angefertigt, indem jede einzelne mit einem Wirkstoff beladene PGA-Partikel mit einer Schicht aus PDLLA (Boehringer) versehen wurde. Ein weiteres Stäbchen wurde aus mit 30 % Goserelin porösem PDLLA hergestellt.

Die Freisetzungskörper bestanden aus Zylindern, die aus den extrudierten Stäbchen abgesägt wurden. Die Beschichtung von den abgesägten Zylindern wurde genauso wie die Beschichtung der gepressten Formkörper durchgeführt, mit dem Unterschied, dass das PDLLA (Boehringer)

nicht in Chloroform sondern in Aceton gelöst wurde. Die Bestimmung der Konzentration des Goserelins in wässrigen Lösungen wurde an einer HPLC-Anlage durchgeführt.

Die Extrusion der Mischungen mit PGA begannen erst bei 100° C und die Verteilung des Stoffes innerhalb der Stäbchen war ungleichmäßig. Die Freisetzung von Goserelin war sehr kurz. Der meiste Wirkstoff wurde bereits innerhalb von 2-3 Tagen freigesetzt.

In den HPLC-Chromatogrammen der Proben mit Goserelin, die später als 30 Tage nach Beginn der Freisetzung entnommen wurden, war ein kleiner Peak von einer unbekanntem Beimischung bei einer kleineren Retentionszeit zu sehen. Vermutlich fand nach dieser langen Einwirkzeit des Wirkstoffes in Lösung Hydrolyse statt, und es entstehen Abbauprodukte mit kleineren Molmassen. Es wurde ein Experiment zur Untersuchung der Zersetzungskinetik des Goserelins im Phosphatpuffer bei 37° C vorgenommen. Anhand dieser Untersuchungen konnte eine Zersetzungskorrektur für jede Freisetzungskurve von Goserelin eingeführt werden. Es wurden zwei Methoden zur Korrektur der Freisetzungskurven entwickelt.

Die Mischungen aus 30 % Goserelin und porösem PDLLA konnten schon bei 70° C extrudiert werden. Von dem Produkt wurden fünf Zylinder abgesägt und mit PDLLA (Boehringer) 1x, 3x, 5x, 7x und 9x beschichtet. Bei Kenntnis der Dichte von PDLLA konnte die theoretische Dicke von PDLLA-Schichten auf den Zylindern berechnet und die Abhängigkeit der theoretischen und praktisch gefundenen Schichtdicken von der Anzahl der Beschichtungsvorgänge ermittelt werden. Bei Kenntnis der Dichten der hergestellten Stäbchen konnte ihre Porositäten berechnet werden. Die Beschichtungsanzahlen hatten kaum Einfluss auf die Freisetzungskinetiken. Das heißt, dass sogar die 1x-Beschichtung für das Verlangsamen der Freisetzung ausreichte. Die PDLLA-Schicht war somit für die umgebende Pufferlösung nur wenig durchlässig. Die Freisetzungen verliefen fast linear innerhalb von ca. drei Monaten. Dennoch wurde das Goserelin innerhalb von 100 Tagen nicht vollständig freigesetzt. Die Freisetzung wurde also

entweder noch nicht beendet oder ein Teil des Goserelins bildete einen stabilen Komplex mit der PDLLA-Matrix.

Zur Überprüfung der Beladung der Zylinder mit 30 % Goserelin wurden einige von ihnen direkt nach der Extrusion abgewogen und gemörsert. Das Goserelin wurde mit einem bestimmten Volumen Phosphatpuffer extrahiert und die Konzentration des Goserelins in diesen Lösungen wurde mittels HPLC-Analyse bestimmt.

Für Extrusionsversuche in der Universität Duisburg-Essen wurde ein eigener Extruder angefertigt. Die Substanz wurde in einen runden Behälter aus Stahl gegeben, in dessen Boden eine Düse aus Silberstahl mit einem kleinen Loch in der Mitte (1 mm im Durchmesser) vorhanden war. Die ganze Pressform wurde bis zu einer bestimmten Temperatur erhitzt und dann konstant gehalten. Der Stoff wurde mit einem Stempel aus Silberstahl mit Hilfe einer hydraulischen Presse durch das Loch in der Düse herausgepresst. Trotz der viel höheren Stempelkraft konnten Polymer-Wirkstoff-Mischungen mit dem eigenen Extruder in denselben Temperaturbereichen wie bei der Firma Novosis extrudiert werden. Dies führte zu dem Schluss, dass die viel höhere Stempelkraft keinen erkennbaren Einfluss auf den Extrusionsvorgang hat. Eine viel wichtigere Bedingung war die Temperatur der zu extrudierenden Probe.

Ein Stäbchen wurde mit Hilfe des eigenen Extruders hergestellt. Es bestand aus mit 30 % Goserelin beladenem porösem PDLLA. Von diesem Stäbchen wurden drei Zylinder abgeschnitten und jeder von ihnen 2x mit PDLLA beschichtet. Bei diesem Versuch wurden alle Zylinder gleich beschichtet, um die Reproduzierbarkeit der PDLLA-Beschichtung zu untersuchen. Die Reproduzierbarkeit der PDLLA-Beschichtung konnte als zufriedenstellend bezeichnet werden. Der Unterschied der Freisetzung zwischen den einzelnen Zylindern konnte innerhalb von 60 Tagen bis zu 15 % Goserelin betragen.

H Anhang

H.I Eingesetzte Geräte

Differential Scanning Calorimetry (DSC)

Die DSC-Messungen wurden an einem Gerät der Firma Netzsch unter Luft in Aluminiumtiegel mit der Heizrate 10 K min^{-1} durchgeführt (DSC 204 DSC-Zelle, TASC 414/3 A Heizungskontroller, CC 200 L Kühlungskontroller, CC 200 Stickstoff-Versorgungssystem). Die Aluminiumtiegel wurden mit Aluminiumdeckeln mit Hilfe einer Handpresse geschlossen. Die Aluminiumdeckel wurden vor dem Schließen einmal durchgestochen.

Extrusion und uniaxiales Pressen

Die Extrusionsversuche bei der Firma Novosis (Miesbach) wurden mit Hilfe des computer-gesteuerten Extruders Rheoflixxer[®] durchgeführt. Vor der Extrusion wurde jede Mischung in der Pressform ca. 10 min per Hand vorgepresst. Nach dem Einbau der Pressform in den Extruder wurde ca. 20 Minuten gewartet, bis sich die Temperatur im ganzen System konstant eingestellt hatte.

Die Extrusion und das uniaxiales Pressen an der Universität Duisburg-Essen erfolgten in selbstgebauten Pressformen mit Hilfe einer hydraulischen Presse der Firma Paul-Otto Weber Maschinen-Apparatebau GmbH PW 10 H (maximale Kraft 132,72 kN). Die Pressplatten wurden mit dem Thermostat Typ TG2E/PT100 derselben Firma gekoppelt. Vor jeder Extrusion wurde der zu extrudierende Stoff in der hydraulischen Presse ca. 30 Minuten bei ca. 5 kN vorgepresst und dabei temperiert.

Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC)

Es wurde eine HPLC-Anlage der Firma Shimadzu in der Firma Novosis (Miesbach) benutzt (UV-Detektor SPD10 AVP bei der Wellenlänge 220 nm, Ofen CTO10 AVP, Sampler SILHTA, Pumpe LC10 ADVP, Degasys DGU 14A). Die Goserelin-Bestimmungen wurden mit einer Scheidesäule Jupiter C18 50x2 mm, Pufferlösung A : 1 % (v/v) CF₃COOH in H₂O, Pufferlösung B : 1 % (v/v) CF₃COOH, 50 % (v/v) CH₃CN in H₂O, Eluent : 50 % A, 50 % B, ohne Gradient durchgeführt.

Infrarotspektroskopie (IR)

Für alle IR-Messungen wurden die zu untersuchenden Proben mit ausreichender Menge Kaliumbromid verrieben und mit einer hydraulischen Presse der Firma Perkin-Elmer bei 100 kN 5 Minuten in Presslinge (Durchmesser 13 mm) gepresst. Es wurde ein IR-Spektrometer FTS 175C der Firma BIO-RAD benutzt.

Kernresonanzspektroskopie (NMR)

Alle ¹H-NMR-Messungen wurden in NMR-Röhrchen (Durchmesser 5 mm) mit Hilfe eines NMR-Spektrometers Bruker DPX 300 (300 MHz) durchgeführt.

Rasterelektronenmikroskopie (REM)

Rasterelektronenmikroskopie wurde am Gerät LEO Gemini 1530 mit gold-bedampften Proben durchgeführt.

Thermogravimetrie (TG)

Die TG-DTA-IR-Messungen erfolgten in Al₂O₃-Tiegel mit einer computergesteuerten Thermowaage Netzsch STA 409PC, die mit einem IR-Spektrometer Bruker Vertex 70 gekoppelt

war (Heizrate 5 K min^{-1} , unter Stickstoff-Atmosphäre).

Ultraviolettspektroskopie (UV)

Für UV-Messungen wurde ein Gerät UV-Visible Spectrometer Cary 1 Bio benutzt. Die Messungen wurden in Küvetten aus Quarzglas Suprasil[®] (optischer Weg 1 cm, Durchlässigkeitsbereich 200-2500 nm) durchgeführt.

Röntgenpulverdiffraktometrie (XRD)

Die Pulverdiffraktometrie erfolgte an einem Diffraktometer Bruker D8 Advance (Cu-K α -Strahlung mit Wellenlänge $1,54178 \text{ \AA}$, Ni-Filter, Göbel-Spiegel, ortsempfindlicher Detektor, Flachproben auf Si 711-Träger).

H.II Sicherheit und Entsorgung

Verbindung	Gefahrensymbole	R- und S-Sätze	Entsorgungsschlüssel
Aceton		R: 11-36-66-67 S: 9-16-26	1
Chloressigsäure Natriumsalz		R: 25-38-50 S: 22-37-45-61	4
Chloroform		R: 22-38-40-48/20/22 S: 36/37	2
Chloroform-d ¹		R: 22-38-40-48/20/22 S: 36/37	2

Verbindung	Gefahrensymbole	R- und S-Sätze	Entsorgungsschlüssel
(R,S)-2-Chlorpropionsäure	 	R: 22-35 S: 23-26-28-36-45	3
(R,S)-2-Chlorpropionsäure Natriumsalz		R: 52/53 S: 61	3
Deuteriumoxid	-	-	-
di-Natriumhydrogenphosphat-Heptahydrat	-	-	5
Ethanol		R: 11 S: 7-16	-
Goserelinacetat		R: 20/22 S: 22-36/37	1
1,1,1,3,3,3-Hexafluor-2-propanol	 	R: 20/22-34 S: 26-36/37/39-45	2
Kaliumbromid	-	-	5
Methanol	 	R: 11-23/24/25-39/23/24/25 S: 7-16-36/37-45	1
Natriumchlorid	-	-	-
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat	-	-	5
Natriumhydroxid		R: 35 S: 26-36/37/39-45	5
PGA, PLGA, PLLA, PDLLA	-	-	-
Phenylalanin	-	-	-

R-Sätze

R 11	Leichtentzündlich
R 22	Gesundheitsschädlich beim Verschlucken
R 25	Giftig beim Verschlucken
R 34	Verursacht Verätzungen
R 35	Verursacht schwere Verätzungen
R 36	Reizt die Augen
R 38	Reizt die Haut
R 40	Irreversibler Schaden möglich
R 50	Sehr giftig für Wasserorganismen
R 66	Wiederholter Kontakt kann zu spröder oder rissiger Haut führen
R 67	Dämpfe können Schläfrigkeit und Benommenheit verursachen
R 20/22	Gesundheitsschädlich beim Einatmen und Verschlucken
R 23/24/25	Giftig beim Einatmen, Verschlucken und bei Berührung mit der Haut
R 39/23/24/25	Giftig: ernste Gefahr irreversiblen Schadens durch Einatmen, Berührung mit der Haut und durch Verschlucken
R 48/20/22	Gesundheitsschädlich: Gefahr ernster Gesundheitsschäden bei längerer Exposition durch Einatmen, Berührung mit der Haut und durch Verschlucken
R 52/53	Schädlich für Wasserorganismen, kann in Gewässern längerfristig schädliche Wirkungen haben

S-Sätze

S 7	Behälter dicht geschlossen halten
S 9	Behälter an einem gut gelüfteten Ort aufbewahren
S 16	Von Zündquellen fernhalten - Nicht rauchen
S 22	Staub nicht einatmen
S 23	Gas/Rauch/Dampf/Aerosol nicht einatmen (geeignete Bezeichnung(en) vom Hersteller anzugeben)
S 26	Bei Berührung mit den Augen sofort gründlich mit Wasser abspülen und Arzt konsultieren
S 28	Bei Berührung mit der Haut sofort abwaschen mit viel ... (vom Hersteller anzugeben)
S 36	Bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung tragen
S 37	Geeignete Schutzhandschuhe tragen
S 45	Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt hinzuziehen (wenn möglich, dieses Etikett vorzeigen)
S 61	Freisetzung in die Umwelt vermeiden. Besondere Anweisungen einholen/Sicherheitsdatenblatt zu Rate ziehen
S 36/37	Bei der Arbeit geeignete Schutzhandschuhe und Schutzkleidung tragen
S 36/37/39	Bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung, Schutzhandschuhe und Schutzbrille/Gesichtsschutz tragen

Definition der Abfallkategorien

A	Halogenfreie organische Lösungsmittel und Lösungen organischer Stoffe
B	Halogenhaltige organische Lösungsmittel und Lösungen organischer Stoffe, die Halogene enthalten
C	Feste organische Laborchemikalien-Rückstände
D	Salzlösungen; ein pH-Wert von 6 - 8 ist einzustellen
E	Giftige anorganische Rückstände sowie Schwermetall-Salze und ihre Lösungen
F	Giftige entzündliche Verbindungen

Entsorgungsschlüssel

1	Stark verschmutzte, außerhalb der Retrologistikspezifikation liegende organische halogenfreie Lösungsmittel und Lösungen organischer Stoffe: Kategorie A.
2	Organische halogenhaltige Lösungsmittel und organischer halogenhaltiger Stoffe nimmt neben Entsorgungsunternehmen auch der Vertreiber gemäß HKW-Abfall Verordnung zurück und recycelt sie im Lohnauftrag. Allerdings müssen die halogenhaltigen Lösungsmittel bei der Sammlung getrennt gehalten werden und die Spezifikation erfüllen. Stark verunreinigte oder vermischte halogenhaltige Lösemittel, die außerhalb der Rücknahmebedingungen liegen: Kategorie B. Achtung: keine Behälter aus Aluminium und bei wasserhaltigen chlorierten Abfällen! Auch keine Behälter aus Edelstahl verwenden (Gefahr von Undichtigkeiten durch Korrosion)!
3	Wässrige Lösungen organischer Säuren können vorsichtig mit Natriumhydrogencarbonat oder Natriumhydroxid neutralisiert werden. Vor Abfüllen in Kategorie D den pH-Wert mit pH-Universal-Indikatorstäbchen kontrollieren. Aromatische Carbonsäuren können mit verdünnter Salzsäure ausgefällt und abgesaugt werden. Niederschlag: Kategorie C; Filtrat: Kategorie D.
4	Cancerogene und als "sehr giftig" bzw. "giftig" gekennzeichnete brennbare Verbindungen (außer Lösemitteln): Kategorie F. Alkylsulfate sind cancerogen: Einatmen und jeglichen Hautkontakt unbedingt vermeiden. Sie können zur Desaktivierung aus einem Tropftrichter unter starkem Rühren in eine konzentrierte, eisgekühlte Ammoniak-Lösung getropft werden. Vor Abfüllen in Kategorie D den pH-Wert mit pH-Universal-Indikatorstäbchen kontrollieren.
5	Neutrale Lösungen anorganischer Salze: Kategorie D. Vor dem Abfüllen den pH-Wert mit pH-Universal-Indikatorstäbchen kontrollieren.

H.III Verwendete Abkürzungen (in alphabetischer Reihenfolge)

BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>	PEG	Polyethylenglycol
DTA	Differenz-Thermoanalyse	PGA	Polyglycolid
DSC	<i>Differential Scanning Calorimetry</i>	Phe	L-Phenylalanin
GnRH	<i>Gonadotropin-Releasing-Hormon</i>	PDLLA	Poly(D,L-lactid)
HFIP	1,1,1,3,3,3-Hexafluor-2-propanol	PLA	Polylactid
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>	PLGA	Poly(lactid-co-glycolid)
HSA	<i>Human Serum Albumin</i>	PLLA	Poly(L-lactid)
IR	Infrarot	REM	Rasterelektronenmikroskopie
LHRH	<i>Luteinizing Hormon-Releasing Hormon</i>	TG	Thermogravimetrie
N, kN	Newton, Kilonewton	THF	Tetrahydrofuran
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>	UV	Ultraviolett
Pa, MPa	Pascal, Megapascal	XRD	<i>X-Ray Diffraction</i>
PCL	Poly(ϵ -caprolacton)		

H.IV Veröffentlichungen

- 1) A. Kovalchuk, W. Fischer, M. Epple. „Controlled Release of Goserelin from Microporous Polyglycolide and Polylactide“, *Macromol. Biosci.* **2005**, 5, 289-298.

H.V Lebenslauf

Geburtsort	Magadan, ehemalige UdSSR
Geburtsdatum	02.11.1979
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	Russische Föderation

Schulbildung

1986-1994	Grundschule, Siedlung Nachabino, Moskauer Gebiet
1994-1996	Mittelschule, Stadt Krasnogorsk, Moskauer Gebiet

Hochschulausbildung

1996-2001	Studium an der Moskauer Lomonosov Staatsuniversität, Fakultät für Chemie
1997-1999	Jahresarbeiten: Anorganische Chemie (1997), Analytische Chemie (1998), Organische Chemie (1999), Physikalische Chemie (1999)
01.10.2000-01.06.2001	Diplomarbeit am Institut der bioorganischen Chemie, Russische Akademie der Wissenschaften, Betreuung von Dr. M. Turchinskiy. Thema: „ <i>Synthese von 2'-Desoxy-5-(3-nikotiamidopropen-1-il)-uridin-5'-triphosphat als Substrat bei der Amplifikation einer kombinatorischen Bibliothek</i> “
05.03.2002	Beginn der Dissertation im Arbeitskreis Prof. Dr. Matthias Epple. Thema: „ <i>Wirkstofffreisetzung aus porösen biodegradierbaren Polyestern Polyglycolid (PGA) und Poly-D,L-lactid (PDLLA)</i> “.

H.VI Dank

Hiermit möchte ich mich bei allen bedanken, die mich bei der Durchführung und der schriftlichen Zusammenfassung dieser Arbeit unterstützt haben.

Vor allem danke ich:

Prof. Dr. Matthias Epple für das Überlassen des Themas, die Hilfe bei meiner Einreise nach Deutschland und die hervorragende wissenschaftliche Betreuung;

Herrn Dr. Wilfried Fischer der Firma Novosis für das Kooperationsprojekt, das diese Arbeit ermöglicht hat;

Allen Mitarbeitern des ehemaligen Arbeitskreises Epple an der Ruhr-Universität Bochum und den gegenwärtigen Mitarbeitern des Arbeitskreises Epple an der Universität Duisburg-Essen.

Besonders möchte ich mich bei den folgenden Personen bedanken:

Frau Sabine Bollmann und Frau Barbara Nota für die Hilfe bei vielen Verwaltungstätigkeiten;

Frau Rosa Osiadac und Herrn Dr. Michael Siedler für die Hilfe am Anfangsstadium dieser Arbeit;

Frau Ursula Giebel für die sorgfältige Durchsicht der Arbeit;

Herrn Dr. Matthias Finckh, Herrn Dr. Dirk Schenk, Frau Habon und Frau Eva Nebel der Firma Novosis für die Hilfe bei der Durchführung der Extrusionsversuche und der Durchführung der HPLC-Analysen.

H.VII Eidesstattliche Erklärungen

Hiermit versichere ich eidesstattlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine außer den angegebenen Hilfsmitteln und Quellen verwendet habe.

Essen, im März 2005

Andrey Kovalchuk

Hiermit erkläre ich eidesstattlich, dass ich keine weiteren Promotionsversuche unternommen habe.

Essen, im März 2005

Andrey Kovalchuk