

**Freisetzungsverhalten von unterschiedlich
hydrophil/hydrophoben Modellsustanzen aus Poly-(D,L-
lactid)- und Poly-(D,L-lactid)-co-PEO-co-poly-(D,L-lactid)-
Mikrosphären und pharmazeutische Anwendungen**

Von der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen
zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften
genehmigte Dissertation

vorgelegt von

Diplom-Chemiker
Georg Plum
aus Geilenkirchen

Berichter: Universitätsprofessor Dr. rer. nat. Hartwig Höcker
 Privatdozentin Dr.rer. nat. Doris Klee

Tag der mündlichen Prüfung: 05. August 2004

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek online verfügbar.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. Hartwig Höcker für die interessante Themenstellung und die wissenschaftliche Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Weiterhin möchte ich mich bei Frau PD Dr. Doris Klee für die sehr interessante und lehrreiche Zeit in der Arbeitsgruppe Biomaterialien am Deutschen Wollforschungsinstitut an der RWTH-Aachen bedanken.

Herrn Prof. Dr. med. Schrage, Herrn Dr. M. Hermel und Frau B. Kondring danke ich für die interessante Zusammenarbeit auf dem Gebiet der Ophthalmologie.

Mein ganz besonderer Dank für die fachlichen Diskussionen gilt Frau Dr. E. Schuh, Frau Dr. S. Steuer, Herrn Dr. H. Keul, Herrn Dr. R.M. Paz, Herrn Dr. N. Weiss, Herrn M. Mundt, Frau S. Spiegelberg und Frau B. Dittrich.

Für die kritische Durchsicht danke ich Frau PD Dr. D. Klee, ein riesiger Dank an Frau Dr. E. Schuh, Frau S. Sydow und Frau U. Noll sowie Dr. P. Dalton.

Bedanken möchte ich mich auch bei meinem Forscher Herrn Ch. Schmitz, und den Laboranten T. Storck und St. Berres sowie den Praktikanten Frau S. Roidot, Frau A. Mhar, Frau S. Jansen und Herrn Ch. Thiele.

Auch den hier nicht namentlich genannten Mitarbeitern des Deutschen Wollforschungsinstituts und des Lehrstuhls für Textil- und Makromolekulare Chemie sei an dieser Stelle ausdrücklich für die gute Zusammenarbeit und nette Arbeitsatmosphäre gedankt.

Ein ganz herzlicher Dank geht an meine Eltern und Großeltern, die mir immer hilfsbereit und unterstützend zur Seite standen. Meinem Bruder Christoph danke ich für seine Kenntnisse über AutoCad. Für die transatlantische Hilfe bei der Erstellung der Pflichtexemplare sei Herrn Ch. Plum und Herrn Dr. R. Eschenbach gedankt.

Und nochmal Saskia für all die Unterstützung und Rückhalt während der letzten dreieinhalb Jahre ;-)

Für Saskia

Abkürzungen

AA	Ascorbinsäure
ABA	Poly-(D,L-lactid)-co-PEO-co-poly(D,L-lactid)
bs	breites Signal
d	Tage
D	Diffusionskoeffizient
D-50	<i>Uvinul D-50</i> TM = 2,2',4,4'-Tetrahydroxybenzophenon
dest	destilliert
DHAA	Dehydroascorbinsäure
DS-49	<i>Uvinul DS-49</i> TM = 2,2'-Dihydroxy-4,4'-dimethoxybenzophenon-5,5'- dinatriumsulfonat
e-PTFE	<i>expanded</i> Polytetrafluorethylen
f_0	anfängliche Freisetzungsrage in d^{-1}
k	Boltzmann-Konstante
m	Multipllett
M	freigesetzte Substanzmenge
M/M_0	relative freigesetzte Substanzmenge
m_0	Einwaage der Sphären
M-40	<i>Uvinul M-40</i> TM = 2-Hydroxy-4-methoxybenzophenon
m_e	Masse der Sphären nach Entnahme aus dem Freisetzungsmedium und Gefriertrocknung
min	Minuten
M_n	Zahlenmittel des Molekulargewichts
M_0	insgesamt freisetzbare Substanzmenge
$m_{\text{Sphären}}$	prozentuale Masse der Sphären bezogen auf die Einwaage der Sphären
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PDLLA	Poly-(D,L-lactid)
PGA	Polyglykolsäure
PLA	Polymilchsäure
prakt.	praktisch
PTA	perkutane transluminale Angioplastie

PTCA	perkutane transluminale coronare Angioplastie
PVA	Polyvinylalkohol
PVR	Proliferative Vitreoretinopathie
ROP	Ringöffnungspolymerisation
RPE Zellen	Retinale Pigmentepithelzellen
rpm	<i>Rotation per minute</i>
T	absolute Temperatur
Tg	Glasübergangstemperatur
theor.	theoretisch
Tm	Schmelztemperatur
TMC	Trimethylencarbonat
?	Viskosität

Definitionen

theoretische Beladung	Die durch die Einwaage bestimmte Beladung der Mikrosphären mit Wirkstoff, bezogen auf 1 g Sphären
praktische Beladung	Tatsächliche Beladung der Mikrosphären mit Wirkstoff, bezogen auf 1 g Sphären
virtuelle Beladung	Wirkstoffmenge, welche bis zum Erreichen eines Gleichgewichtszustandes an das Freisetzungsmedium abgegeben wird, bezogen auf 1 g Sphären
Beladungseffektivität	Prozentualer Anteil der praktischen Beladung bezüglich der theoretischen Beladung
Freisetzungseffektivität	Prozentualer Anteil der virtuellen Beladung bezüglich der praktischen Beladung

Inhalt

1	Zusammenfassung	I
2	Einleitung	1
2.1	Wirkstofffreisetzungssysteme	1
2.1.1	Träger für Wirkstofffreisetzungssysteme	4
2.1.2	Herstellungsmethoden von Mikro- und Nanosphären	11
2.2	Ophthalmologische Anwendung	13
2.2.1	Implantate zur Medikamentenfreisetzung im Glaskörper.....	13
2.2.2	Ascorbinsäure als Proliferationshemmer für Retinale Pigmentepithelzellen (RPE).....	16
2.2.3	Analytik von Ascorbinsäure	17
2.2.4	Problemstellung	21
2.2.5	Auswahl von Modellwirkstoffen für Freisetzungssysteme.....	22
3	Poly(D,L-lactid) und Poly(D,L-lactid)-co-PEO-co-poly(D,L-lactid) als Matrixmaterial für Depotsysteme	23
3.1	Synthese von Poly-(D,L-lactid)-co-PEO-co-poly-(D,L-lactid).....	24
3.2	Freisetungsverhalten der Modellsubstanzen auf Basis unterschiedlich substituierter Benzophenone aus Poly-(D,L-lactid)-Mikrosphären	25
3.2.1	Freisetzung von 2,2'-Dihydroxy-4,4'-dimethoxybenzophenon-5,5'- dinatriumsulfonat (<i>Uvinul DS-49™</i>)	26
3.2.2	Freisetzung von 2,2',4,4'-Tetrahydroxybenzophenon (<i>Uvinul D-50™</i>).....	33
3.2.3	Freisetzung von 2-Hydroxy-4-methoxybenzophenon (<i>Uvinul M-40™</i>).....	38
3.2.4	Abbauverhalten von Poly-(D,L-lactid) Mikrosphären in Abhängigkeit von den inkorporierten Modellsubstanzen	44
3.3	Freisetungsverhalten der Modellsubstanzen auf Basis unterschiedlich substituierter Benzophenone aus Poly-(D,L-lactid)-co-PEO-co-poly-(D,L-lactid)- Mikrosphären.....	61
3.3.1	Freisetzung von 2,2'-Dihydroxy-4,4'-dimethoxybenzophenon-5,5'- dinatriumsulfonat (<i>Uvinul DS-49™</i>)	61
3.3.2	Freisetzung von 2,2',4,4'-Tetrahydroxybenzophenon (<i>Uvinul D-50™</i>).....	66
3.3.3	Freisetzung von 2-Hydroxy-4-methoxybenzophenon (<i>Uvinul M-40™</i>).....	71
3.3.4	Abbauverhalten von Poly-(D,L-lactid)-co-PEO-co-poly-(D,L-lactid)- Mikrosphären in Abhängigkeit von den inkorporierten Modellsubstanzen.....	75

3.4	Freisetzung von Ascorbinsäure aus Poly(D,L-lactid)-Mikrosphären und Poly-(D,L-lactid)-co-PEO-co-poly-(D,L-lactid)-Mikrosphären	99
3.4.1	<i>In vitro</i> Simulation der Freisetzungsbedingungen für Ascorbinsäure im Auge	101
4	Wirkstofffreisetzung aus Nanosphären bei Stents für die Verhinderung von Restenose.....	110
4.1	Poly(D,L-lactid-co-TMC)(90:10) als Matrixmaterial.....	114
4.2	Verankerung von Nanosphären in einer e-PTFE Schicht bei Stents	115
4.3	Freisetzungsverhalten von Dexamethason aus Poly(D,L-lactid-co-TMC)(90:10)-Nanosphären.....	123
4.4	Freisetzungsverhalten von Paclitaxel aus Poly-(D,L-lactid-co-TMC)(90:10)-Nanosphären.....	125
5	Experimenteller Teil.....	129
5.1	Chemikalien, Polymere und Lösungsmittel.....	129
5.2	Synthese von Poly-(D,L-lactid)-co-PEO-co-poly-(D,L-lactid).....	130
5.3	Methoden.....	131
5.3.1	Herstellung von Poly-(D,L-lactid) und Poly-(D,L-lactid)-co-PEO-co-poly-(D,L-lactid)-Mikrosphären nach der o/w-Lösungsmittel-Evaporations-Methode	131
5.3.2	Herstellung von Poly-(D,L-lactid-co-TMC)(90:10)-Nanosphären nach der o/w Lösungsmittel-Evaporations-Methode.....	132
5.3.3	Beladung von e-PTFE ummantelten Stents mit Nanosphären	133
5.3.4	<i>In vitro</i> Freisetzungsexperimente	134
5.3.5	Abbauversuche an resorbierbaren Mikrosphären	135
5.3.6	Bestimmung der Löslichkeit der Modellsubstanzen in Wasser bzw. Methylenchlorid.....	135
5.4	Analytik	136
5.4.1	UV-Vis Spektroskopie	136
5.4.2	Kernmagnetische Resonanz-Spektroskopie	136
5.4.3	Rasterelektronenmikroskopie (REM).....	136
5.4.4	Massenverlust.....	137
5.4.5	DSC.....	137
5.4.6	Gelpermeationschromatographie.....	137
5.4.7	HPLC-MS	138

6	Anhang	140
7	Literatur	142

1 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wird das Freisetungsverhalten verschiedener Modellsubstanzen und Wirkstoffe aus abbaubaren Mikrosphären auf Basis von Poly-(D,L-lactid) (PDLLA) und Poly-(D,L-lactid)-co-PEO-co-poly(D,L-lactid) (ABA) sowie aus Nanosphären aus Poly-(D,L-lactid-co-TMC)(90:10) in PBS-Puffer beschrieben.

Zur Untersuchung des Freisetungsverhaltens wurden drei verschieden hydrophil/hydrophobe Modellsubstanzen auf Basis unterschiedlich substituierter Benzophenone ausgewählt: 2,2'-Dihydroxy-4,4'-dimethoxybenzophenon-5,5'-dinatriumsulfonat (*Uvinul DS-49™*), 2,2',4,4'-Tetrahydroxybenzophenon (*Uvinul D-50™*) und 2-Hydroxy-4-methoxybenzophenon (*Uvinul M-40™*).

Das ABA-Triblockcopolymer wurde über eine ringöffnende anionische Polymerisation von Lactid in Gegenwart von Polyethylenoxid (PEO, 2000) als Initiator und Zinn(II)-2-ethylhexanoat als Katalysator synthetisiert.

Aus PDLLA und dem ABA-Triblockcopolymer wurden Mikrosphären nach der o/w-Lösungsmittel-Evaporationsmethode hergestellt und jeweils die drei Modellsubstanzen DS-49, D-50 und M-40 mit je 9, 13 und 17 Gew% theoretischer Beladung inkorporiert. Die hergestellten Mikrosphären wurden abhängig von der Breite ihrer Größenverteilung in zwei bzw. drei Partikelfractionen zwischen 100-300 µm, 300-710 µm und, falls es die Partikelgrößenverteilung erlaubte, 710-1000 µm über Mikrosiebe getrennt. Das Freisetungsverhalten wurde in Abhängigkeit von der Teilchengröße, der Beladung, der Modellsubstanz und dem polymeren Träger untersucht.

Außerdem wurde das Abbauverhalten der PDLLA- und ABA-Mikrosphären während der Freisetungszeit von etwa drei Wochen in Abhängigkeit von ihrer qualitativen und quantitativen Beladung für die Partikelfraktion 300-710 µm untersucht. Zusätzlich wurde noch ein 100 Tage Wert aufgenommen, um Tendenzen besser abschätzen zu können. Dabei kann eine Abhängigkeit des Abbaus von der inkorporierten Substanz festgestellt werden.

M-40 beladene PDLLA- Mikrosphären weisen nach 100 Tagen Verweilzeit in PBS-Puffer weniger als 1 % des anfänglichen Molekulargewichtes von $M_n = 100000$ auf. Mit steigender Hydrophilie der inkorporierten Modellschubstanz nimmt die Degradationsgeschwindigkeit ab. Nach 100 Tagen Verweilzeit im PBS-Puffer sinkt das Molekulargewicht der mit D-50 beladenen PDLLA-Mikrosphären auf 25 % des anfänglichen Molekulargewichtes, DS-49 beladene PDLLA-Mikrosphären besitzen nach dieser Zeit in PBS-Puffer noch 40 % des anfänglichen Molekulargewichtes.

DS-49, D-50 und M-40 beladene PDLLA-Mikrosphären unterscheiden sich in ihrer Oberflächenbeschaffenheit. Während DS-49 beladene Mikrosphären eine hohe Anzahl an Poren auf den Sphären zeigen, besitzen M-40 beladene Mikrosphären eine glatte Oberfläche. Die Anzahl und Größenverteilung der Poren nimmt in der Reihenfolge DS-49, D-50, M-40 ab. In DS-49 beladenen Mikrosphären kann der Puffer während der Degradation ungehindert durch die Poren in die Sphären eindringen. D-50 beladene Mikrosphären besitzen kleinere Poren als DS-49 beladene Mikrosphären. M-40 beladene Mikrosphären können aufgrund ihrer glatten Oberfläche kein Lösungsmittel über Poren aufnehmen. Es findet eine Diffusion von Lösungsmittelmolekülen durch die Polymermatrix statt.

Das Degradationsverhalten der mit DS-49, D-50 bzw. M-40 beladenen Mikrosphären kann mit Hilfe der Autokatalyse erklärt werden. Die Anwesenheit des PBS-Puffers in den mit DS-49 beladenen Mikrosphären wirkt durch Abpufferung der bei der Degradation entstehenden Protonen der protonenkatalysierten Hydrolyse der PDLLA-Ketten entgegen. Bei D-50 beladenen Sphären ist der Austausch mit dem Puffer aufgrund der geringeren Anzahl an Poren pro Sphären sowie der kleineren Poren im Vergleich zu DS-49 beladenen Sphären stark behindert. In M-40 beladene Sphären kann der Puffer nicht eindringen. Wassermoleküle diffundieren durch die Polymermatrix und führen zu einem ungepufferten Polymerabbau.

Die Inkorporation von DS-49, D-50 bzw. M-40 in ABA-Mikrosphären zeigt eine den PDLLA-Mikrosphären vergleichbare Abhängigkeit bezüglich der Modellschubstanz auf die Degradation des Polymers in PBS-Puffer. Nach 100 Tagen in PBS-Puffer sinkt das Molekulargewicht der mit DS-49 beladenen ABA-Mikrosphären auf 14 % des anfänglichen Molekulargewichtes von $M_n = 100000$. Bei D-50 beladenen ABA-Mikrosphären sinkt das Molekulargewicht auf 3 % des anfänglichen Molekulargewichtes, bei M-40 beladenen ABA-Mikrosphären auf 1 % des anfänglichen

Molekulargewichts. DS-49, D-50 und M-40 beladene ABA-Mikrosphären weisen ebenfalls eine unterschiedliche Oberflächenbeschaffenheit auf. Wie bereits bei den PDLLA-Mikrosphären nimmt auch bei den ABA-Mikrosphären die Anzahl sowie die Größe der Poren in der Reihenfolge DS-49, D-50, M-40 ab.

Der schnellere Abbau der ABA-Mikrosphären im Vergleich zu den PDLLA-Mikrosphären liegt in dem hydrophilen PEO-Segment der Molekülkette dieser Sphären begründet. Der PEO-Block führt aufgrund seiner hydrophilen Natur zu einer höheren Wasseraufnahme der Sphären und erklärt den schnelleren Abbau der ABA-Mikrosphären im Vergleich zu PDLLA-Mikrosphären.

Der Einfluss der Degradation auf die Glasübergangstemperatur des Polymers wurde untersucht. Dabei wird für DS-49 und D-50 beladene PDLLA-Mikrosphären keine signifikante Änderung von T_g über 100 Tage beobachtet. Die Glasübergangstemperatur von M-40 beladenen PDLLA-Sphären zeigt eine Abhängigkeit von der theoretischen Beladung, die auf einen Weichmachungseffekt der Modellsubstanz zurückzuführen ist. Die hochbeladenen Mikrosphären des 17 %-Ansatzes ergeben $T_g = 33^\circ\text{C}$, für den 13 %-Ansatz wird $T_g = 36^\circ\text{C}$ und für den 9 %-Ansatz $T_g = 41^\circ\text{C}$ gefunden. Diese Werte bleiben während der Freisetzezeit von drei Wochen konstant. Nach 100 Tagen in PBS-Puffer sind diese auf -2.2 , 0.8 und 18°C für die jeweiligen theoretischen Beladungen von 17, 13 und 9 % zurückgegangen.

Das verwendete Poly-(D,L-lactid)-co-PEO-co-poly(D,L-lactid) besitzt ein Molekulargewicht von $M_n = 100000$ mit einem PEO-Molekulargewicht von $M_n = 2000$. Die Polylactidblöcke bestimmen das thermische Verhalten. Die DSC-analytisch bestimmten Glasktemperaturen des ABA-Triblockcopolymers können dem Polylactidblock zugeordnet werden. ABA-Mikrosphären zeigen während der Freisetzezeit keine signifikanten Änderungen in der Glasübergangstemperatur der Polylactidblöcke. Allerdings ergibt der 100-Tage-Wert einen leichten Rückgang von T_g von 48°C auf 43°C für die DS-49 beladenen ABA-Mikrosphären. D-50 beladene Sphären ergeben einen deutlicheren Rückgang auf unter 17°C und M-40 beladene Sphären führen, wie bei den PDLLA-Sphären, zu einer von der Höhe der Beladung abhängigen Glasübergangstemperatur. Für die theoretischen Beladungen von 17, 13 und 9 % wird jeweils ein T_g von 25, 29 und 33°C gefunden, der nach 100 Tagen auf -28 , -26 und -25°C sinkt.

Für eine kinetische Betrachtung der Freisetzung der Modellsubstanzen aus PDLLA und ABA-Mikrosphären wurde eine diffusionskontrollierte Freisetzung nach Higuchi angenommen. Die über lineare Regression der Auftragung der relativen Freisetzungsrates gegen Wurzel t erhaltenen Steigungen k wurden mit den aus der Ableitung der relativen Freisetzungsrates erhaltenen anfänglichen Freisetzungsraten f_0 verglichen. DS-49 beladene Mikrosphären zeigen einen *burst*-Effekt. ABA-Mikrosphären führen zu größeren relativen Freisetzungsraten von DS-49 als PDLLA-Sphären. D-50 beladene Mikrosphären zeigen die Tendenz, dass kleine Sphären kleinere relative Freisetzungsraten ergeben als große Sphären. So wird bei der Freisetzung von D-50 aus PDLLA-Mikrosphären für die theoretische Beladung von 9 % der Partikelfraktion 100-300 μm eine anfängliche Freisetzungsrates f_0 von 0,21 d^{-1} gefunden und für die Partikelfraktion 710-1000 μm ein Wert von 1,02 d^{-1} . REM-Aufnahmen von D-50 beladenen PDLLA-Sphären zeigen eine hohe Anzahl an Poren auf den großen Sphären und eine glatte Oberfläche bei kleinen Sphären. Das gleiche Phänomen unterschiedlicher Porenanzahl pro Sphären in Abhängigkeit von der Partikelgröße wird bei den D-50 beladenen ABA-Mikrosphären beobachtet. Bei den ABA-Mikrosphären mit einer theoretischen Beladung von 17 % ist der Unterschied in der Anzahl der Poren pro Sphären zwischen großen und kleinen Sphären am stärksten ausgeprägt. Für die Partikelfraktion 100-300 μm wird eine anfängliche relative Freisetzungsrates von 0,63 d^{-1} und für die Partikelfraktion 710-1000 μm 1,03 d^{-1} gefunden.

M-40 beladene Mikrosphären zeigen einen *lag*-Effekt, der sich in negativen Achsenabschnitten bei der linearen Regression bemerkbar macht. Die relativen Freisetzungsrates liegen für beide untersuchten Polymere in einem sehr engen Bereich. Im Vergleich wurde M-40 zu Beginn der Freisetzung aus ABA-Sphären in PBS-Puffer schneller freigesetzt als aus PDLLA-Sphären in PBS-Puffer. Durch die Tg-Erniedrigung des Polylactids von 52°C auf 32, 36 bzw. 40°C für die jeweiligen theoretischen Beladungen von 17, 13 und 9 % bei den PDLLA-Sphären und durch die Tg-Erniedrigung der Polylactidblöcke von 48°C auf 25, 29 und 33°C für die jeweiligen theoretischen Beladungen von 17, 13 und 9 % bei den ABA-Sphären neigen die Sphären dazu, Agglomerate zu bilden. Die Agglomeration ist bei den ABA-Sphären wegen der niedrigeren Polylactid-Glasübergangstemperaturen stärker ausgeprägt als bei den PDLLA-Sphären. Die gebildeten Agglomerate aus M-40 beladenen Mikrosphären können die Modellsubstanz nur über die dem Lösungsmittel

zugängliche Oberfläche freisetzen. Wegen der Agglomeration der Sphären ist bei der Freisetzung von M-40 aus den Agglomeraten in PBS-Puffer keine deutliche Abhängigkeit von der Sphären-Teilchengröße zu beobachten.

Ein weiterer Teil dieser Arbeit beschreibt die Herstellung von Wirkstofffreisetzungssystemen für einen Einsatz in der Ophthalmologie. Zur Behandlung der proliferativen Vitreoretinopathie (PVR) wird ein Freisetzungssystem benötigt, um einer unerwünschten Proliferation von retinalen Pigmentepithelzellen (RPE-Zellen) auf der Netzhaut entgegenzuwirken.

Die Verabreichung von Medikamenten über die Blutbahn ist im Auge wegen der Blut-Retina-Schranke schwierig. Eine Möglichkeit, die Blut-Retina Schranke zu umgehen, ist die Verabreichung des Medikaments über ein Wirkstofffreisetzungssystem direkt im Auge am Wirkungsort. Ascorbinsäure beladene Sphären wurden hergestellt, die zusammen mit einer Silikonöltamponade im Auge verabreicht werden können. Ascorbinsäure besitzt proliferationshemmende Eigenschaften auf RPE-Zellen. Ascorbinsäure beladene Sphären die sich an der Phasengrenzfläche von Silikonöl und Kammerwasser des Auges befinden, können bei Kontakt der Sphären mit der wässrigen Kammerwasserphase Ascorbinsäure in die wässrige Phase freisetzen.

Da im Glaskörper hohe Milchsäurekonzentrationen vorliegen, wurde ein Wirkstofffreisetzungssystem auf Basis von Polylactid ausgesucht und Ascorbinsäure darin nach der o/w-Lösungsmittel-Evaporationstechnik inkorporiert, um Mikrosphären zu erhalten. Diese wurden in einem *in vitro*-Freisetzungsexperiment getestet.

5 ml einer wässrigen, PBS gepufferten 1,5 mmolaren Ascorbinsäurelösung wurden mit 2 ml Silikonöl überschichtet. Die auf das Silikonöl gegebenen Sphären sinken schnell ab und liegen dann an der Phasengrenzfläche vor. Es wurden zwei unterschiedliche, sich in ihrer Viskosität unterscheidende Silikonöle verwendet.

Zunächst nimmt die Ascorbinsäurekonzentration in der wässrigen Phase ab, da ein Abbau der Ascorbinsäure zu 2,3-Dioxo-L-gulonsäure und weiteren Degradationsprodukten stattfindet. Nach 1,1 Tagen wird bei Verwendung des hochviskosen Öls-5000 eine Ascorbinsäurekonzentration von 0,51 mmol/l gemessen, welche bei der Verwendung des niedrigviskosen Öls-1000 nach dieser Zeit bei 0,65 mmol/l liegt. Das Silikonöl dringt in die Poren der Mikrosphären ein. Eine spontane Freisetzung der Ascorbinsäure aus den an der Phasengrenzfläche befindlichen Mikrosphären wird durch das in den Poren befindliche Öl verhindert. Daher ist die

Abbaurate der Ascorbinsäure in der wässrigen Phase zu Beginn des Experiments höher als die Freisetzungsrates von Ascorbinsäure aus den Mikrosphären in die wässrige Phase. Die Folge ist eine Abnahme der Ascorbinsäurekonzentration in der wässrigen Phase. Nach 1,1 Tagen steigen die Konzentrationen an und erreichen für das Öl-5000 nach 4 Tagen einen Maximalwert von 7,8 mmol/l, welcher für das Öl-1000 nach 7,9 Tagen mit 8,0 mmol/l erreicht wird. Nach Erreichen der jeweiligen Maxima gehen die Ascorbinsäurekonzentrationen in der wässrigen Lösung langsam zurück. Für den Ansatz mit dem Öl-5000 wird nach 15 Tagen und für den Ansatz mit dem Öl-1000 nach 14 Tagen nur noch eine therapeutisch unwirksame Ascorbinsäurekonzentration in der wässrigen Phase gefunden. Die erreichten Maxima der Ascorbinsäurekonzentrationsverläufe für die verwendeten Silikonöle unterscheiden sich kaum. Da Ascorbinsäure in Silikonöl unlöslich ist, kann eine Freisetzung der Ascorbinsäure aus den Mikrosphären in die wässrige Phase nur aus dem Bereich der Sphären erfolgen, die in die wässrige Phase eintauchen. Die Poren sind vermutlich mit Silikonöl gefüllt, weshalb die Freisetzung der Ascorbinsäure aus den Sphären in die wässrige Phase nur durch die polymere Matrix der Mikrosphären stattfinden kann. Die beiden Konzentrationsverläufe der Ascorbinsäure in der wässrigen Phase zeigen keine großen Unterschiede für die verwendeten Silikonöle. Die dem wässrigen Freisetzungsmedium zugängliche Oberfläche der an der Phasengrenzfläche befindlichen Mikrosphären wird vom Öl-5000 gleichermaßen minimiert wie vom Öl-1000. Da wegen der Unlöslichkeit von Ascorbinsäure in Silikonöl keine Diffusion von Ascorbinsäure aus den Sphären durch das Silikonöl in die wässrige Phase stattfinden kann, werden kaum Unterschiede im Ascorbinsäurekonzentrationsverlauf zwischen der Verwendung des hoch- und niedrigviskosen Öls gefunden.

Analoge Experimente wurden mit Ascorbinsäure beladenen ABA-Mikrosphären durchgeführt. Bei einer Zugabe von mit Ascorbinsäure beladenen ABA-Mikrosphären in die Silikonölphase geht zunächst die Ascorbinsäurekonzentration in der wässrigen Phase zurück, wobei nach 1,1 Tagen bei der Verwendung des hochviskosen Öls-5000 0,65 mmol/l und bei der Verwendung des niedrigviskosen Öls-1000 0,94 mmol/l in der wässrigen Phase gemessen werden. Bei der Überschichtung der wässrigen Ascorbinsäurelösung mit dem hochviskosen Öl-5000 wird nach 6,9 Tagen ein Maximalwert von 3,01 mmol/l und bei dem niedrigviskosen Öl-1000 nach 8,0 Tagen ein Maximum von 2,52 mmol/l in der wässrigen Phase detektiert.

Anschließend nimmt die Konzentration langsam ab und erreicht nach 14 Tagen bei Verwendung des Öls-5000 und nach 15 Tagen bei Verwendung des Öls-1000 therapeutisch irrelevante Mengen an Ascorbinsäure in der wässrigen Phase.

Die Freisetzung von Ascorbinsäure aus PDLLA- bzw. ABA-Mikrosphären in eine 1,5 mmolare Ascorbinsäurelösung bewirkt die Aufrechterhaltung eines Ascorbinsäurespiegels in der wässrigen Phase über mehr als zwei Wochen. In den Mikrosphären wird die Ascorbinsäure vor einem Abbau zu 2,3-Dioxo-L-gulonsäure und weiteren Degradationsprodukten geschützt.

Ein weiterer Teil dieser Arbeit beschreibt die Ausrüstung von Stents mit Wirkstofffreisetzungssystemen über Nanosphären für die Angioplastie. Eine Möglichkeit zur Verhinderung der In-Stent-Restenose bietet die Applikation eines Medikaments zusammen mit einem Stent über ein Wirkstofffreisetzungssystem. Es wurden unterschiedlich große Nanosphären aus Poly(D,L-lactid-co-TMC)(90:10) nach der o/w-Lösungsmittel-Evaporationsmethode hergestellt und mit Hilfe von Druck in eine den Stent ummantelnde e-PTFE-Folie gepresst. Diese Folie besitzt Poren von 5 bis 20 µm Länge und von 2 bis 5 µm Breite. Für die Herstellung unterschiedlich großer Nanosphären wurde die Polymerkonzentration in der organischen Phase von 10 auf 50 mg/ml erhöht, was zu einer exponentiellen Zunahme der mittleren Sphärengröße von 220 auf 852 nm führt. Eine optimale Beladung ergibt sich bei der Verwendung von Nanosphären mit einem mittleren Durchmesser von 542 nm. Die Nanosphären wurden mit Dexamethason bzw. Paclitaxel beladen. Das Freisetungsverhalten der im Stent eingebrachten wirkstoffbeladenen Nanosphären wurde *in vitro* untersucht. Die Freisetzung von Dexamethason aus im Stent eingebrachten Nanosphären in eine PBS-Pufferlösung ist nach 4,4 Tagen beendet. Es werden 0,78 mg Dexamethason freigesetzt.

Die Freisetzung von Paclitaxel aus im Stent eingebrachten Nanosphären in eine PBS-Pufferlösung verläuft über einen Zeitraum von etwa 37 Tagen, wobei 2 µg Paclitaxel freigesetzt werden. Wegen der hydrophoben Natur von Paclitaxel findet kaum Freisetzung aus den Sphären in das hydrophile FreisetzungsmEDIUM statt.

Der Restgehalt an Wirkstoff im Stent wurde untersucht, indem der Stent nach 57 Tagen im Freisetzungsexperiment gefriergetrocknet wurde, um anschließend die noch im Stent verbliebenen Nanosphären mit Chloroform herauszulösen. Dabei wurde qualitativ massenspektroskopisch nachgewiesen, dass Paclitaxel über 57

Tage in den Nanosphären stabil bleibt und im wässrigen Milieu keine Zersetzung erfährt. Im sauren Milieu erfährt Paclitaxel eine Deacetylierung in der Position 10 zu 10-Deacetylpaclitaxel. Bei neutralen pH-Wert ist Paclitaxel sehr beständig. Die bei der Degradation des Polylactidblocks des Poly-(D,L-lactid-co-TMC)(90:10) entstehenden Protonen werden vom PBS-Puffer abgepuffert, so dass die Deacetylierung des Paclitaxels nicht auftreten kann. Die HPLC-analytisch detektierte Menge an Paclitaxel beträgt 2,12 mg und entspricht einer praktischen Beladung von 23,5 Gew-% der im Stent verankerten Nanosphären.

Summary

Within the scope of this dissertation, the release behaviour of different model substances and drugs from degradable poly-(D,L-lactide) (PDLLA) and poly-(D,L-lactide)-co-PEO-co-poly-(D,L-lactide) (ABA) microspheres as well as poly-(D,L-lactide-co-TMC)(90:10) nanospheres in PBS-buffer are characterised.

To investigate the release behaviour, three different hydrophilic/hydrophobic benzophenone based model substances were chosen; 2,2'-dihydroxy-4,4'-dimethoxy-benzophenone-5,5'-disodium-sulfonate (*Uvinul DS-49™*), 2,2',4,4'-tetrahydroxy-benzophenone (*Uvinul D-50™*) and 2-hydroxy-4-methoxy-benzophenone (*Uvinul M-40™*).

The ABA-triblock copolymer was synthesized by ring opening polymerisation of lactide in the presence of polyethyleneoxide (PEO, 2000) as an initiator and tin(II)-2-ethylhexanoate as a catalyst.

PDLLA and ABA-triblockcopolymer microspheres were made according to the o/w-solvent-evaporation method. The three model substances DS-49, D-50 and M-40 were incorporated with a theoretical loading of 9, 13 and 17 weight% respectively. The resultant microspheres were, depending on the particle size distribution, separated into two or three particle fractions in the range of 100-300µm, 300-710µm and if available 710-1000µm. The release behaviour was investigated depending on the particle size, the loading, the model substance and the polymeric matrix.

Furthermore, the degradation behaviour of the 300-710µm ranged PDLLA- and ABA-microspheres was investigated depending on the qualitative and quantitative bading for three weeks. A 100-day value was determined additionally to estimate tendencies. In doing so, a dependency of the incorporated substance to the degradation behaviour of the polymer can be observed. M-40 loaded PDLLA-microspheres show less than 1% of the initial molecular weight of Mn=100 000 after 100 days in a PBS buffer solution. With increasing hydrophilicity of the incorporated model substance, the degradation rate decreases. The molecular weight of D-50 loaded PDLLA-microspheres show 25% and DS-49 loaded PDLLA-microspheres show 40% of the initial molecular weight after 100 days in a PBS-buffer solution.

DS-49, D-50 and M-40 loaded PDLLA-microspheres differ in their surface character. DS-49 loaded microspheres show a high number of pores while M-40 loaded spheres show a smooth surface. The quantity of pores on the microspheres decreases in the order of DS-40, D-50 and M-40. During degradation of DS-49 loaded spheres the buffer can permeate unhindered through the pores into the microspheres. D-50 loaded microspheres have much smaller pores than DS-49 loaded spheres. M-40 loaded microspheres can't assimilate solvent via pores due to the smooth surface. Diffusion of solvent molecules occurs through the polymer matrix.

The degradation behaviour of DS-49, D-50 and M-40 loaded microspheres can be explained by means of autocatalysis. The presence of the PBS-buffer in DS-49 loaded microspheres counteracts the proton catalysed hydrolysis of the PDLLA-chains. The interexchange with the buffer is hampered in D-50 loaded spheres due to much smaller and lesser pores compared with DS-49 loaded spheres. The buffer cannot penetrate into M-40 loaded spheres. Water molecules diffuse through the polymeric matrix and lead to a non buffered polymer degradation.

The incorporation of DS-49, D-50 and M-40 into ABA-microspheres show a degradation behaviour quite similar to the PDLLA-degradation. The molecular weight of DS-49 loaded ABA-microspheres show 14% of the initial molecular weight of $M_n=100000$ during 100 days in a PBS buffer solution. D-50 loaded ABA-spheres show 3% and M-40 loaded spheres show less than 1% of the initial molecular weight. DS-49, D-50 and M-40 loaded ABA-spheres differ in their surface characteristic as well. The quantity of pores on the microspheres decreases in the order of DS-40, D-50 and M-40. The faster degradation of the ABA-spheres compared to PDLLA-spheres is due to the hydrophilic PEO-segment in the ABA-molecular chain. The PEO block leads to a higher water uptake and explains the faster degradation of the ABA-spheres compared to the PDLLA-spheres.

The effect of degradation to the glass transition temperature of the polymer was investigated. No significant changes in T_g can be observed for DS-49 and D-50 loaded PDLLA-microspheres during 100 days. Due to a softener-effect T_g from M-40 loaded PDLLA-spheres show a dependency on the theoretical loading of the model substance of 33, 36 and 41°C for the respective theoretical loading of 17, 13 and 9%. T_g remains constant during the release time of three weeks. The values decrease

after 100 days in PBS-buffer to -2.2, 0.8 and 18°C for the respective theoretical loading of 17, 13 and 9%.

The used ABA-triblock copolymer has a molecular weight of $M_n=100\,000$ and a PEO-molecular weight of $M_n=2\,000$. The thermal properties are determined by the polylactide blocks. ABA-microspheres show no significant change in T_g during the release time of three weeks. Ds-49 loaded ABA-spheres show a slight decrease in T_g after 100 days from 48°C to 43°C, D-50 loaded spheres show a more obvious decrease in T_g below 17°C and M-40 loaded spheres lead to a decrease in T_g dependant to the theoretical loading. T_g of 25, 29 and 33°C is found for the respective theoretical loading of 17, 13 and 9%, which decreases to -28, -26 and -25°C after 100 days.

A diffusion controlled release according to Higuchi was accepted for a kinetic consideration. The slope k yielded by linear regression of the relative release is directly proportional to the square root of t was compared with the initial release rate f_0 yielded by calculation of the derivation of the release curve. DS-49 loaded microspheres show a burst effect. ABA microspheres lead to higher initial release rates of DS-49 than PDLLA-spheres. D-50 loaded spheres show the tendency that small spheres result in lesser relative release rates than big spheres. SEM pictures of D-50 loaded PDLLA spheres demonstrate a high number of pores on the surface of big spheres and a smooth surface on small spheres. The same phenomenon of different quantities of pores depending on a change in particle size can be observed in ABA-microspheres.

M-40 loaded microspheres show a lag-effect noticeable in negative axis intercepts at the linear regression. For both tested polymers the release rates are located in a narrow range. In the initial phase of the experiment M-40 was released faster out of ABA-spheres in comparison with PDLLA-spheres; the spheres tend to form agglomerates, due to the reduction of T_g of the polylactide. The agglomeration of ABA-spheres is stronger than the agglomeration of PDLLA-spheres, due to the lesser T_g of ABA-polymer. The model substance can be released from the surface accessible by the solvent only. Due to agglomeration of the spheres the release of M-40 out of the agglomerates shows no dependency on the particle size.

An other part of this work deals with the production of a drug release system for use in ophthalmology. To treat proliferative vitreoretinopathy (PVR) a drug release system is required to prevent an undesired proliferation of retinal pigment epithel cells (RPE cells) on the retina.

The administration of drugs via the blood system to achieve a sufficient drug level in the eye is difficult, due to the blood retina barrier. Therefore ascorbic acid loaded spheres were made. They can be used with a silicon oil tamponade (vitreous body substitute), which can be administrated directly in the eye. Ascorbic acid inhibits the proliferation of RPE cells. Ascorbic acid loaded spheres situated at the phase interface between silicone oil and the water chamber of the eye can release ascorbic acid into the aqueous phase. Ascorbic acid loaded PDLLA microspheres were made according to the o/w-solvent-evaporation method. These spheres were tested in an *in vitro* drug release experiment.

5 ml of an aqueous PBS buffered 1.5 mmolar ascorbic acid solution were overlaid with 2 ml of silicone oil. The spheres sink quickly to the interface between the oil and aqueous phase. Two silicone oils were tested differing in their viscosity.

First, the ascorbic acid concentration in the aqueous phase decreases due to the decomposition of ascorbic acid to 2,3-dioxo-gulonic acid and further degradation products. The use of the high viscose oil-5000 leads to an ascorbic acid concentration of 0.51 mmol/l after 1.1 days, whereas the use of the low viscose oil-1000 leads to concentration of 0.65 mmol/l. The oil penetrates into the pores of the microspheres. A spontaneous release of ascorbic acid out of the microspheres into the aqueous phase cannot occur due to the oil in the pores. Therefore initially the decomposition rate of ascorbic acid in the aqueous phase is higher than the release rate of ascorbic acid out of the microspheres into the aqueous phase. The ascorbic acid concentration in the aqueous phase decreases. After 1.1 days the amount of ascorbic acid increases and leads to a maximum value of 7.8 mmol/l, after 4 days for the oil-5000, and 8.0 mmol/l after 7.9 days using the oil-1000. After reaching the maximum values, the ascorbic acid concentration in the aqueous phase decreases slowly and reaches non effective amounts of ascorbic acid in the aqueous phase after 15 days using the oil-5000, and after 14 days using the oil-1000. The maximum values reached barely differ for the used silicone oils. The release of ascorbic acid only occurs via the part of the spheres immersing into the aqueous phase, due to the insolubility of ascorbic acid in silicone oil. The concentration curves of ascorbic acid

barely differ for the used silicone oils. The surface of the microspheres at the phase interface accessible to the release medium is reduced from the oil-5000 or from the oil-1000 in the same way. Due to the insolubility of ascorbic acid in silicone oil no diffusion of ascorbic acid through the oil phase occurs. Therefore the concentration curves are quite similar.

Analogous experiments were carried out with ABA-triblockcopolymer microspheres. The use of the high viscose oil-5000 leads to an ascorbic acid concentration of 0.65 mmol/l after 1.1 days, whereas the use of the low viscose oil-1000 leads to a concentration of 0.95 mmol/l. After 1.1 days the amount of ascorbic acid increases and leads to a maximum value of 3.01 mmol/l, after 6.9 days for the oil-5000, and 2.52 mmol/l after 8.0 days using the oil-1000. After reaching the maximum values the ascorbic acid concentration in the aqueous phase decreases slowly, and reaches non effective amounts of ascorbic acid in the aqueous phase after 14 days using the oil-5000, and after 15 days using the oil-1000.

The release of ascorbic acid out of PDLLA- or ABA-microspheres into a 1.5 mmolar ascorbic acid solution maintains the ascorbic acid level in the aqueous phase over two weeks. The microspheres protect the ascorbic acid against decomposition to 2,3-dioxo-L-gulonic acid, and further degradation products.

Another part of this work deals with the incorporation of nanospheres into an e-PTFE foil covered stent for use in angioplasty.

Spherical nanoparticles made of poly(D,L lactide-co-TMC) (90:10) were designed in different size-distributions via the o/w solvent evaporation process. The nanosphere suspensions were pressed with pressure through an e-PTFE covered stent to obtain a foil loaded with nanoparticles. The foil has pores with a length of 5 to 20 μm and a width of 2 to 5 μm . The polymer concentration in the organic phase during the solvent evaporation process was increased from 10 to 50 mg/ml, which leads to an exponential increase of the particle size from 220 to 852 nm. Optimal loading of the e-PTFE foil is achieved using nanospheres in the range of 542 nm.

Dexamethasone and Paclitaxel loaded Nanospheres were made in the range of 542 nm and pressed into the e-PTFE foil. The release behaviour of the nanosphere loaded stents was investigated in an *in vitro* experiment. The release of dexamethasone out of a nanosphere loaded stent into a PBS buffer solution is complete after 4.4 days. 0.78 mg of dexamethasone is released.

The release of paclitaxel out of a nanospheres loaded stent into PBS buffer is complete after 37 days. 2 µg of paclitaxel is released. Due to the hydrophobic nature of paclitaxel low release occurs into the hydrophilic release medium. The remaining amount of paclitaxel in the nanospheres was detected via HPLC. 2.12 mg of paclitaxel is incorporated into the nanospheres per stent which is equivalent to 23.5 weight-%.

2 Einleitung

Die Medizin ist heute in der Lage, mit Hilfe von Biomaterialien Körperfunktionen wieder herzustellen, die durch Krankheit oder Unfall verloren gegangen sind. Die Zahl der klinisch eingesetzten, künstlichen Organe und Implantate (Zähne, Linsen, Glaskörperersatz, Sehnen, Gelenke, Knochenimplantate, Gefäßprothesen, Stents, Herzklappen, Membranen, Brustimplantate usw.) ist ständig steigend. Der Bedarf an Biomaterialien nimmt auch aufgrund der gestiegenen Lebenserwartung zu. Allein in Deutschland werden pro Jahr mehr als 100.000 Operationen an Hüftgelenk und Knie durchgeführt¹. Außerdem steht häufig die Erholung der Organfunktion bei gezielter Kombination verschiedener Verfahren im Vordergrund. Zusammen mit den Weiterentwicklungen auf den Gebieten der Medizintechnik, der Biomaterial- und Oberflächenforschung, der Zellkulturtechnologie, Stammzellforschung und Gentechnik eröffnen sich neue Wege zur Unterstützung und Wiederherstellung geschädigter Organe². Ein sehr wichtiges Gebiet in der Medizin und in der Pharmazie stellt dabei die Entwicklung von Werkstoffen und Trägersystemen für die kontrollierte Freisetzung von Arzneistoffen dar.

2.1 Wirkstofffreisetzungssysteme

Die Erforschung und Entwicklung von Wirkstoffen konzentrierte sich lange Zeit auf die Synthese und Erprobung neuer Pharmaka, wobei der Art der Verabreichung weit weniger Aufmerksamkeit geschenkt wurde. Wirkstoffe wurden nahezu ausschließlich oral oder per Injektion verabreicht, häufig abseits vom eigentlichen Zielgewebe. Mit der Entwicklung leistungsfähigerer Wirkstoffe jedoch wurden einige Nachteile konventioneller therapeutischer Systeme offensichtlich wie zum Beispiel Nebenwirkungen, stark fluktuierende Wirkstoffpegel im Organismus oder ein geringer Wirkungsgrad verabreichter Medikamente. Die Verweildauer, die Konzentration und die Bioverfügbarkeit pharmazeutischer Agenzien im Körper lässt sich nur schwer kontrollieren.

Die kontrollierte Wirkstofffreisetzung stellt eine Möglichkeit dar, diese Probleme zu überwinden^{3,4}. Die Anforderung, welche an Wirkstofffreisetzungssysteme gestellt wird, ist die Aufrechterhaltung einer therapeutischen Konzentration eines Wirkstoffes im Körper innerhalb eines bestimmten Zeitraumes, wobei der Wirkstoff in einer berechenbaren und kontrollierbaren Weise freigesetzt wird.

Konventionelle Wirkstofffreisetzungssysteme wie Tabletten oder intravenöse Injektionen verabreichen die vollständige Dosis des Wirkstoffes in einer Portion, was zu hohen, gegebenenfalls nahe der toxischen Plasmakonzentration liegenden Werte führen kann (Abb. 1).

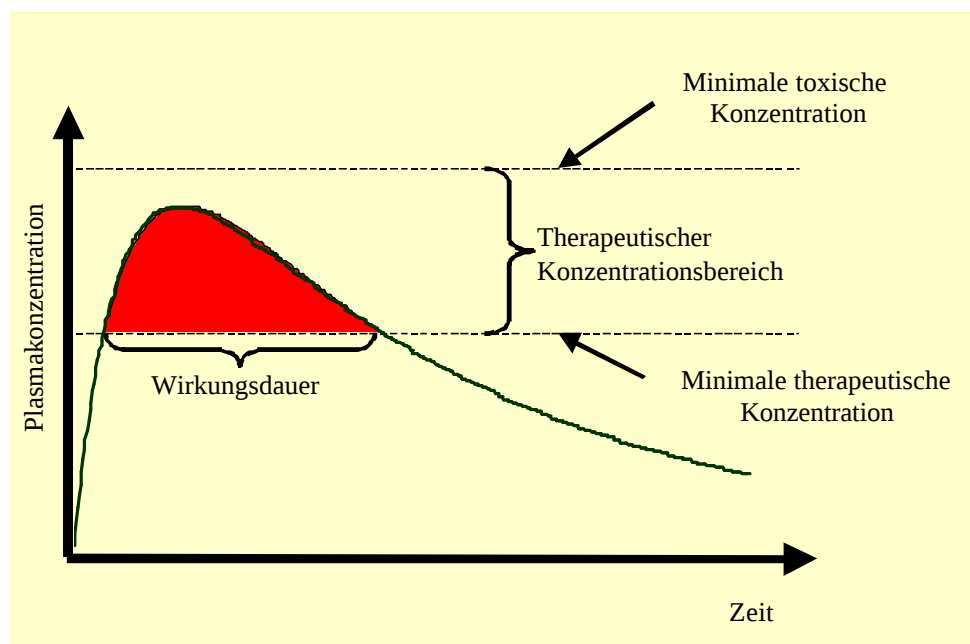


Abb. 1 Plasmakonzentration eines Wirkstoffes im Patienten als Funktion der Zeit nach einmaliger konventioneller Verabreichung über Tabletten oder intravenöser Injektion¹⁰⁶.

Eine kurze Verweildauer des Medikaments im Körper erfordert eine wiederholte Verabreichung, was für den Patienten belastend ist und zu einem stark fluktuierenden Wirkstofflevel im Körper führt. Häufig wird eine hohe Arzneidoses benötigt, damit sichergestellt werden kann, dass die notwendige Konzentration am Ort des kranken Gewebes oder Organs erreicht wird⁷⁰. Ein Wirkstofffreisetzungssystem ist dadurch gekennzeichnet, dass der Wirkstoff kontrolliert abgegeben und dabei die benötigte Plasmakonzentration für eine lange Zeit aufrechterhalten wird (Abb. 2).

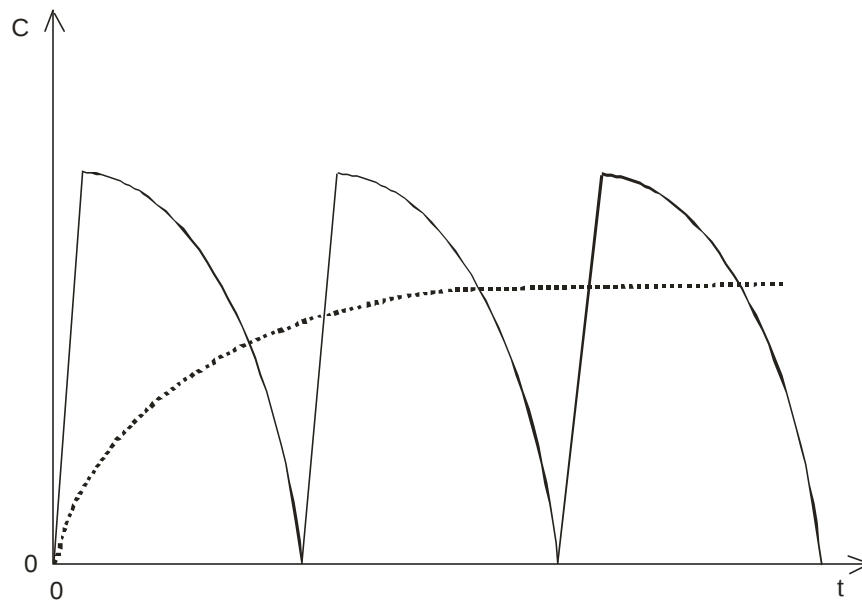


Abb. 2 Plasmakonzentrationen eines Wirkstoffes im Körper eines Patienten nach mehrmaliger konventioneller Verabreichung des Medikaments (—) und mit einem geeignetem Wirkstofffreisetzungssystem (.....).

Die Resorption des Arzneistoffes ist die Voraussetzung für seine Wirkung. Dabei müssen Haut-, Schleimhaut- oder andere Barrieren überwunden werden. Die Wirkstoffmenge, welche pro Zeiteinheit aus der Darreichungsform resorbiert und am Zielort wirksam wird, bezeichnet man als biologische Verfügbarkeit.

Kontrollierte Wirkstofffreisetzungstechnologien bieten viele Vorteile und können viele Behandlungsmethoden verbessern⁵. Sie können zum Beispiel zu einer gesteigerten Effektivität chemisch instabiler Medikamente beitragen. Der freigesetzte Wirkstoff muss physiologische Barrieren passieren und wird den metabolischen und chemischen Angriffen des Körpers ausgesetzt, bevor er das Zielorgan/-gewebe erreicht. Labile Medikamente wie Peptide, Proteine und Enzyme können ihre Aktivität verlieren, wenn sie beispielsweise dem sauren Milieu des Magens ausgesetzt werden¹⁴. Ein polymerer Träger kann das therapeutische Agens vor physiologisch hervorgerufener Denaturierung oder Degradation schützen, bis das gewünschte Zielgewebe erreicht ist.

Toxische Wirkstoffe, speziell Zytostatika in der Krebstherapie, können in hohen Konzentrationen im Tumorgewebe freigesetzt werden, was die Bioverfügbarkeit und damit die Effektivität erhöht und zugleich die systemische Exposition und anschließende Nebenwirkungen minimiert⁷⁰.

Die kontrollierte Freisetzung von Insulin stellt beispielsweise eine wichtige Herausforderung dar. Diabetes ist in den Industrieländern ein wachsendes Problem und die Behandlung schränkt den Patienten in seiner Lebensqualität ein, da täglich subkutane Injektionen notwendig sind. Eine orale Verabreichung freien Insulins ist wegen der Instabilität gegenüber Enzymen im Gastrointestinaltrakt nicht möglich. Degradierbare Polymere können dazu dienen, das Insulin zu schützen und es anhaltend und kontrolliert subkutan oder über die Lungen freizusetzen^{6,70}. Kontrollierte Freisetzung findet nicht nur in der Humantherapie eine Anwendung, sondern auch in der Veterinärmedizin, im Agrarbereich und in der Biotechnologie¹⁶.

2.1.1 Träger für Wirkstofffreisetzungssysteme

Der klinische Einsatz von synthetischen Polymeren begann in den 1960er Jahren in Form von Einwegartikeln, wie beispielsweise Spritzen und Kathetern. Dadurch konnten Infektionen infolge nicht ausreichender Sterilität der wiederverwendbaren Artikel aus Glas und metallischen Werkstoffen signifikant reduziert werden⁷. Wegen der steigenden Anzahl synthetischer Polymere und dem zunehmenden Bedarf an ärztlicher Versorgung reicht die Anwendung von Polymeren in der Medizin von preisgünstigen Einwegartikeln, die nur kurzzeitig intrakorporal eingesetzt werden, bis zu Implantaten, welche über eine längere Zeit großen Beanspruchungen im menschlichen Körper ausgesetzt sind. Die steigende Verbreitung von klinisch eingesetzten Polymeren ist auf ihre einfache und preisgünstige Verarbeitbarkeit in einer Vielzahl von Formen und Geometrien sowie auf ihr breites Eigenschaftsspektrum zurückzuführen.

Polymere werden in fast allen medizinischen Bereichen eingesetzt, wobei die Hauptanwendungsgebiete Lang- und Kurzzeitimplantate wie z.B. künstliche Blutgefäße, Herzklappen, Katheter oder Nahtmaterial sind. Desweiteren finden Polymere Anwendung bei kontrollierten Wirkstofffreisetzungssystemen und in den neuen Technologien für Gewebekulturen *in vitro* (tissue engineering)⁸.

Die ersten polymeren Träger, welche für die kontrollierte Wirkstofffreisetzung entwickelt wurden, gehen auf die frühen 1960er Jahre zurück. Hydrogele, die für einen Einsatz in der Wirkstofffreisetzung Verwendung finden können, wurden bereits im Jahre 1960 erwähnt⁹. Im Jahr 1966 veröffentlichten Folkman und Long ein Wirkstofffreisetzungssystem, welches auf der Diffusion von Anästhetika wie Ether, Lachgas bzw. Cyclopropan durch Silikonschlauchwände beruht¹⁰. Die Verwendung degradierbarer Polymere als resorbierbare Materialien in medizinischen Anwendungen wurde auch in den 1960ern publiziert. Synthetisch resorbierbare Nahtmaterialien aus Polyglykolsäure wurden 1962 von der American Cyanamid Co entwickelt und sind seit 1970 unter dem Handelsnamen Dexon™ auf dem Markt¹¹. Yolles et al. beschrieb in den 1970er Jahren die kontrollierte Freisetzung pharmazeutisch wirksamer Substanzen¹². Er setzte Opiumantagonisten wie Naloxone und Naltrexon oder Antikrebsmedikamente wie Cytosin oder Cisplatin aus Polymilchsäure frei¹³.

Biodegradierbare Polymere

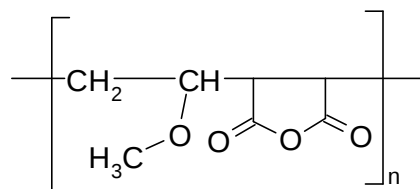
Der Abbaumechanismus von biodegradierbaren Polymeren wird in drei verschiedene Typen eingeteilt^{14, 15}.

- Typ I Erosion: Abbau von Polymeren, die über eine hydrolyseempfindliche Vernetzung wasserunlöslich gemacht werden, wobei durch den Abbau wasserlösliche Polymere entstehen.
- Typ II Erosion: Abbau linearer Polymere, die anfangs wasserunlöslich sind, aber durch Hydrolyse, Ionisierung oder Protonierung von Seitengruppen wasserlöslich werden, ohne Spaltung der Hauptkette.
-

Typ III Erosion: Abbau wasserunlöslicher Polymere, die unter Spaltung der Hauptkette zu kleinen wasserlöslichen Molekülen hydrolysiert werden.

Der Abbau von Polymeren muss dabei nicht notwendigerweise genau einem dieser Mechanismen folgen sondern kann auch eine Kombination dieser Typen darstellen. Polymere, die nach einer Typ I Erosion abbauen, sind zum Beispiel Gelatine, Collagen oder Polyvinylalkohol. Die über Vernetzung erhaltenen Polymere sind sehr hydrophil und eignen sich nicht, um niedermolekulare, wasserlösliche Substanzen physikalisch zu immobilisieren, da diese unabhängig von der Abbaurate des Polymers durch die Matrix diffundieren^{14, 16}. Solche Materialien eignen sich allerdings für die Freisetzung von wasserlöslichen Makromolekülen wie Enzyme oder Proteine, welche in der hydrophilen Matrix durch physikalische Verankerung immobilisiert werden können^{14,17,18,19}.

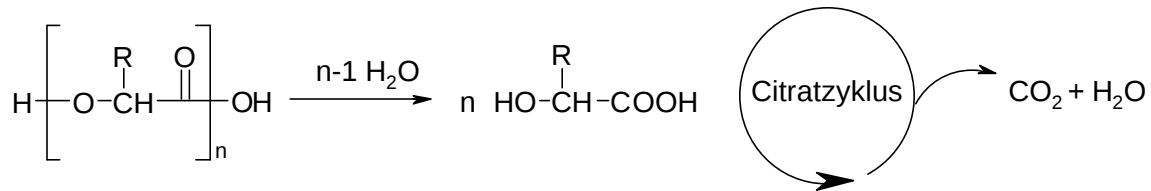
Bei einer Typ II Erosion findet kein signifikanter Abbau des Molekulargewichtes des Polymers statt. Hierzu zählen eine Reihe von Polymeren, die als Seitenketten Carbonsäuregruppen enthalten. Sie sind unlöslich bei niedrigem pH-Wert, da hier die Carboxylgruppen nicht ionisiert vorliegen, und werden bei höheren pH-Werten ionisiert und damit wasserlöslich. Solche Polymere wurden als magensaftresistente Coatings entwickelt wie zum Beispiel das Copolymer aus Methylvinylether und Maleinsäureanhydrid^{14,92}.



1

Eine Typ III Erosion führt zu kleinen wasserlöslichen Molekülen, die durch eine Spaltung der Hauptkette entstanden sind. Polymere, welche diesem Abbauverhalten folgen, sind besonders gut als Träger für eine systemische Verabreichung von Wirkstoffen unter der Voraussetzung nicht toxischer Abbauprodukte geeignet. Solche biodegradierbaren Systeme stellen beispielsweise Polymilchsäure sowie Polyglykolsäure und deren Copolymere dar.

Die Degradation dieser Polymere vollzieht sich über eine zufällige hydrolytische Spaltung der Polymerkette^{14,20}, wobei Milchsäure bzw. Glykolsäure freigesetzt wird. Da Glykolsäure und L-Milchsäure natürliche Metaboliten darstellen, werden sie vom Körper über den Krebs-Zyklus (=Citratzyklus) in Form von CO_2 und H_2O ausgeschieden¹⁴.



Schema 1 Hydrolyse-Mechanismus von Polymilchsäure ($\text{R}=\text{CH}_3$) bzw. Polyglykolsäure ($\text{R}=\text{H}$).

Polymilchsäure, Polyglykolsäure und deren Copolymere werden einerseits in der Chirurgie beispielsweise als chirurgische Nahtfäden und temporäre Klebstoffe andererseits in der Pharmazie als Trägerwerkstoffe für kontrollierte therapeutische Systeme eingesetzt⁷.

Die hydrolytische Degradation erfolgt bei Polymeren mit hydrolytisch instabilen Bindungen wie beispielsweise Ester- oder Amidgruppen. Der Depolymerisationsprozess entspricht dabei einer umgekehrten Polykondensationsreaktion. Bei der Hydrolyse wird der Abbau in der Regel durch die Diffusion von Wasser kontrolliert; die Degradationskinetik ist in erster Näherung unabhängig von der exponierten Oberfläche (bulk degradation). Die hydrolytische Degradation wird durch Temperatur, Säuren und Basen sowie durch Enzyme katalysiert. Als Beispiel ist im Folgenden die Degradationsreaktion von Polyestern dargestellt. Die Esterbindung wird unter Bildung von Alkohol und Säureendgruppen gespalten.

Aliphatische Polyester sind empfindlich gegen Hydrolyse. Aromatische Polyester wie zum Beispiel Polyethylenterephthalat (PET) sind weniger empfindlich gegen Hydrolyse, da sie wegen der aromatischen Gruppen eine größere Hydrophobie aufweisen. Die sterische Hinderung durch die aromatischen Gruppen und eine höhere Kristallinität bilden eine zusätzliche Stabilität gegen einen hydrolytischen Angriff.

Die enzymatische Degradation findet in der Regel an spezifischen Gruppen, welche vom Enzym erkannt werden, statt. Die Kettenspaltung kann dabei, je nach Enzym, hydrolytisch oder oxidativ erfolgen. Da Enzyme aufgrund ihres hohen Molekulargewichtes nicht in das Polymer diffundieren können, wird in enzymatisch degradierenden Polymeren die Degradationskinetik durch die adsorbtiv zugängliche Oberfläche kontrolliert (surface degradation). Der enzymatische Abbau wurde vor allem bei natürlichen Polymeren wie Stärke, Chitin, Alginate, aber auch bei Seide, oder Kollagen beobachtet⁷.

Poly lactide und Polyglycolide sind aliphatische Polyester und gehören zu den Poly(α -hydroxycarbonsäuren). Seit den 1960er Jahren werden sie in der Medizin vorwiegend als Trägerwerkstoffe für kontrollierte therapeutische Systeme eingesetzt⁷. Enzyme spielen bei der hydrolytischen Degradation von PLA und PGA im Gegensatz zur Degradation von Poly(ϵ -caprolacton) keine bedeutende Rolle. Es wird jedoch beschrieben, dass in einem späteren Stadium der Degradation eine enzymatische Aktivität involviert ist, wobei vermutet wird, dass das durch enzymatischen Abbau im Körper entstandene Kohlendioxid zur Hauptsache über die Lungen ausgeschieden wird^{7,21}. Obwohl der Abbau von degradierbaren Polymeren in vielen medizinischen Anwendungen die Systemeigenschaften bestimmt, ist derzeit wenig über die Grundlagen des Vorgangs der Erosion bekannt. Die Erosion wasserunlöslicher degradierbarer Polymere beginnt mit der Degradation, die in der Literatur über den Prozess der Kettenspaltung definiert wird²². Mit der Degradation findet auch eine Freisetzung von Degradationsprodukten wie Oligomeren und Monomeren statt. Das führt zu einer Massenreduktion der polymeren Matrix, die in der Literatur als Erosion bezeichnet wird²². Biodegradierbare Polymere werden in wässrigem Milieu hydrolysiert, die Hydrolyse beginnt mit dem Eindringen von Wasser in das Polymer-Bulk.

Ist die Hydrolysegeschwindigkeit langsam im Vergleich zur Diffusion des Wassers, so ist der gesamte Querschnitt einer Polymermatrix betroffen; man spricht von Bulkerosion oder homogener Erosion. Mit steigender Degradationsgeschwindigkeit wird die Erosion zunehmend ein Oberflächenphänomen. Diesen Mechanismus bezeichnet man als Oberflächenerosion bzw. heterogene Erosion (Abb. 3).



Abb. 3 Schematische Darstellung der Veränderungen einer polymeren Matrix bei homogener und heterogener Erosion^{25,23}.

Nur schnell degradierende Polymere, wie Polyanhydride und Poly-(orthoester) zeigen Oberflächenerosion²². Dabei vollzieht sich die Erosion mit konstanter Geschwindigkeit zu jeder Zeit der Erosion²⁴.

Bei Polymeren, die einer Bulkerosion unterliegen wie z.B. Poly-(D,L-lactid) und Poly-(D,L-lactid-co-glycolid) wird keine konstante Erosion beobachtet^{25,26,27}. Gewöhnlich setzt die Erosion nicht direkt mit der Degradation des Polymers ein, sondern erst dann, wenn die aus der Degradation entstehenden Kettensegmente wasserlöslich sind.

Für die Polymerdegradation, also den Kettenabbau, können einige Parameter verantwortlich gemacht werden, welche die Degradationsgeschwindigkeit beeinflussen. Dazu zählen die Copolymerzusammensetzung²⁸, die Gegenwart kristalliner Bereiche²⁹, die Autokatalyse durch saure Degradationsprodukte innerhalb der Matrix³⁰ und die Anwesenheit von sauren oder basischen Wirkstoffen^{25,31}.

Wie sich diese Parameter, welche die Degradationsgeschwindigkeit beschleunigen oder verlangsamen, auf die Erosionsmechanismen auswirken, ist nicht vollständig geklärt.

Die Einteilung in unterschiedliche Klassen polymerer Freisetzungssysteme richtet sich nach dem Mechanismus, der die Freisetzung der eingeschlossenen Teilchen bestimmt. Es wird zwischen diffusionskontrollierten Systemen, chemisch kontrollierten und durch Quellung hervorgerufenen Freisetzungssystemen unterschieden³². Jedes dieser Systeme kann wiederum in spezifischere Kategorien unterteilt werden, die von dem Freisetzungsprozess und der Geometrie des Systems abhängen³³. Die meist genutzten Freisetzungssysteme setzen die inkorporierten Substanzen diffusionskontrolliert frei^{33,34}. Dabei wird zwischen Matrix- und Reservoir-Systemen unterschieden³⁵. Bei Matrix-Systemen liegen die freizusetzenden Stoffe gleichmäßig im Polymer verteilt vor. Nach beendeter Freigabe bleibt die entleerte Polymerhülle zurück. Es gibt vier verschiedene Freisetzungsmuster, die abhängig vom Herstellungsprozess sind. Die Substanzen können entweder in gelöster oder dispergierter Form im Polymer vorliegen. Im ersten Fall wird die Löslichkeit im Polymeren nicht überschritten, wobei im zweiten Fall solange eine konstante Sättigungskonzentration aufrechterhalten bleibt, bis die Substanzen vollständig gelöst vorliegen. Die Stoffe können während der Freisetzung durch das Polymer selbst oder durch wassergefüllte Poren oder Kanäle diffundieren. Diese Poren werden durch die wandernden Substanzen selbst geschaffen oder sind Bestandteil der Polymerstruktur³³.

Bei Reservoir-Systemen sind die freizusetzenden Teilchen von einem gequollenen oder auch nicht-gequollenen Polymer umgeben, und die Diffusion der Teilchen durch das Polymer stellt den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt dar³⁴. Die Teilchendiffusion gehorcht in Reservoir Systemen dem ersten Fickschen Gesetz.

2.1.2 Herstellungsmethoden von Mikro- und Nanosphären

In der Literatur wird eine Reihe verschiedener Methoden zur Herstellung wirkstoffbeladener Mikro- oder Nanosphären genannt^{36,37}. Die Technik der Mikroverkapselung, das Verpacken von Flüssigkeiten und Feststoffen in sphärische Partikel im Mikrometerbereich geht auf die frühen 1950er Jahre zurück³⁸. Diese Technik wird in vielen Anwendungsbereichen wie zum Beispiel in der Drucktechnik, bei agrarwirtschaftlich genutzten Chemikalien, in der Klebtechnik, für Parfums oder in der Nahrungs- und Genussmittelindustrie genutzt⁴⁰. Während der letzten zehn Jahre wuchs das Interesse an der Mikroverkapselung für die Formulierung von Wirkstofffreisetzungssystemen.

Die *oil-in-water* (o/w) Lösungsmittel-Evaporationstechnik ist schematisch in Abb. 4 dargestellt³⁹.

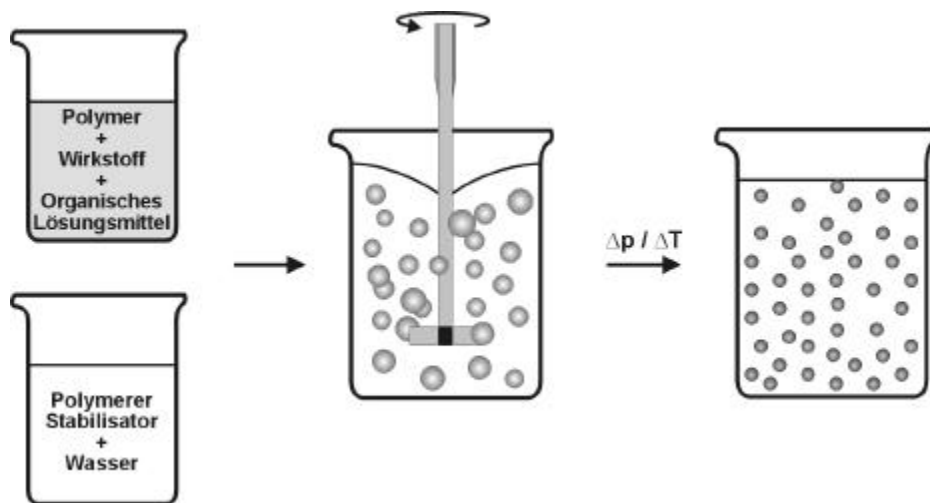


Abb. 4 Schematische Darstellung der Mikrosphärenherstellung nach der *oil-in-water* (o/w) Lösungsmittel-Evaporationsmethode.

Der Wirkstoff und das Polymer werden dabei in einem leicht flüchtigen, organischen Lösungsmittel gelöst. Diese Ölphase wird anschließend tropfenweise in eine wässrige Phase gegeben. Dabei wird kräftig gerührt, wobei die beiden nicht mischbaren Phasen eine Emulsion bilden⁷⁰. Emulsionen sind disperse Mehrphasensysteme, die aus mindestens zwei nahezu unlöslichen Flüssigkeiten bestehen. Sie sind thermodynamisch instabil. Dies bedeutet, dass die disperse Phase bestrebt ist, sich durch Koaleszenz zu größeren Bereichen zu vereinigen. Die tropfenbildende Phase wird als innere oder disperse Phase bezeichnet, während die zusammenhängende Phase äußere oder kontinuierliche Phase genannt wird. Die Konsistenz von Emulsionen richtet sich im Wesentlichen nach der Viskosität der kontinuierlichen Phase. Zur Verhinderung, dass die Tropfen einer Emulsion zusammenfließen bzw. koaleszieren, werden Emulgierhilfsstoffe benötigt. Dabei unterscheidet man zwischen Emulgatoren und Stabilisatoren. Emulgatoren sind grenzflächenaktive Stoffe mit einem hydrophilen und einem lipophilen Molekülteil. Aufgrund dieser amphiphilen Eigenschaft halten sich die Emulgatormoleküle an der Grenzfläche zwischen der wässrigen und organischen Phase auf. Bei hoher Emulgatorkonzentration in der äußeren Phase kann der Emulgator nicht nur monomer sondern auch in Form von Mizellen vorliegen. Bei entsprechend geringer Konzentration des Emulgators zerfallen diese Mizellen. Sie dienen daher als Vorrat, wenn beispielsweise durch Adsorption an neugeschaffenen Grenzflächen Emulgatormoleküle benötigt werden. Die „Demizellierung“ also das Zerfallen der Mizellen ist ein sehr schneller Vorgang, so dass in einer ausreichend konzentrierten Emulgatorlösung der grenzflächenaktive Stoff nicht verarmt und daher an neugeschaffenen Grenzflächen adsorbieren kann⁴⁰.

Stabilisatoren sind makromolekulare Stoffe wie zum Beispiel Polyvinylalkohol oder Gelatine, welche die Viskosität der äußeren Phase erhöhen. Durch Stabilisatoren wird eine mögliche Agglomeration bzw. Koaleszenz der Tropfen verzögert⁴⁰.

Durch Zugabe von Emulgatoren und Stabilisatoren werden stabile Emulsionen erhalten. Das Polymer in der dispersen Phase fällt aus, sobald der Reaktor evakuiert wird. Ist das organische Lösungsmittel der dispersen Phase in der stationären Phase löslich, so spricht man von einer Lösungsmittel-Extraktion. Die Emulsionstropfen werden dabei sehr schnell in präzipitierte, feste Sphären überführt^{41, 42}. Die ausgehärteten Mikrosphären können anschließend mit Hilfe von Mikrosieben separiert, gewaschen und getrocknet werden³⁸.

2.2 Ophthalmologische Anwendung

Die Retina ist ein in die Schädelperipherie verlagerter Teil des Zentralen-Nerven-Systems und wird, wie auch die anderen zentralen Teile des Gehirns, durch eine Blut-Hirn Schranke, der Blut-Retina Schranke, vom peripheren Immunsystem getrennt⁹⁵. Medikamente werden in der Regel nicht an ihrem Wirkungsort appliziert, sondern meist oral oder intravenös verabreicht. Die meisten Arzneistoffe müssen die oben genannten zellulären Barrieren überwinden, um an den Wirkort zu gelangen. Für einige vorzugsweise kleine, lipophile Wirkstoffe, geschieht dies durch „passive“ Diffusion. Andere vor allem hydrophile Medikamente sind dabei auf aktive Transportmechanismen mit Hilfe spezieller Carrier-Proteine angewiesen⁴³. Eine Möglichkeit, die Blut-Retina Schranke zu umgehen, ist die Verabreichung des Medikaments über ein Wirkstofffreisetzungssystem direkt im Auge am Wirkungsort⁴⁴.

2.2.1 Implantate zur Medikamentenfreisetzung im Glaskörper

Der Raum zwischen Linse und Netzhaut ist wie in Abb. 5 gezeigt mit einem transparenten Gel, dem Glaskörper gefüllt. Dieser ist eine extrazelluläre Matrix und kann als Bindegewebsbereich betrachtet werden, der von Epithelzellen (Linse, Ziliarkörper) und Neuralzellen (retinale Müllerzellen) umgeben ist⁹⁵.

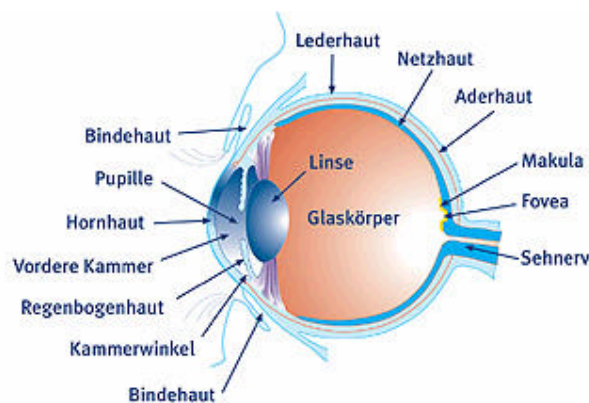


Abb. 5 Schematische Darstellung eines Augenquerschnitts.

Er bietet neben einer mechanischen Stützeigenschaft des umgebenden Okulargewebes auch eine Funktion als Stoßdämpfer, da er viskoelastische Eigenschaften besitzt.

Bei Netzhauterkrankungen wie der proliferativen diabetischen Retinopathie kommt es zu einer komplizierten Netzhautablösung (Abb. 6).

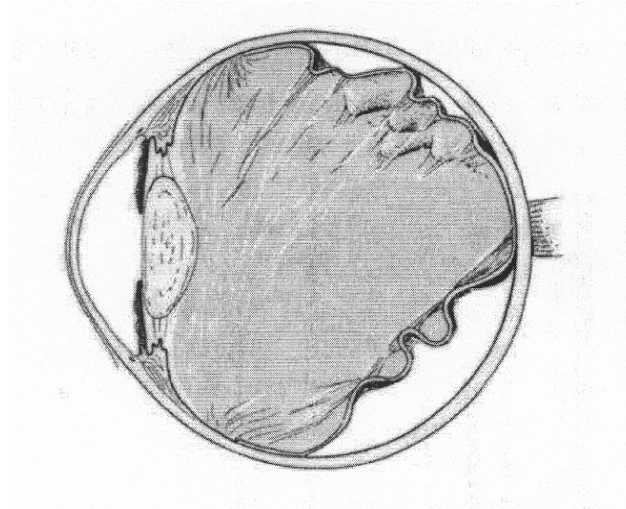


Abb. 6 Schematische Darstellung einer Netzhautablösung (proliferative Vitreoretinopathie PVR).

Der zelluläre Ablauf einer PVR ist wie folgt⁹⁵:

- 1) Migration von Gliazellen, Pigmentepithelzellen und Fibrocyten in den Glaskörper, wo sie proliferieren und letztendlich umfangreichen Transformationen und Umdifferenzierungen unterworfen sind.
- 2) Wechselwirkung dieser Zellen mit endogenen Membrankomponenten im Glaskörper (z.B. Collagen), was zur Ausbildung von vitrealen, epiretinalen und subretinalen kontraktile Membranen führt.
- 3) Eine durch die Kontraktion entstehende Zugkraft verursacht die Ablösung der Retina.

Meist wird eine umfangreiche operative Versorgung bei dieser Erkrankung erforderlich⁴⁵. Dabei wird wie in Abb. 7 gezeigt eine Glaskörperentfernung vorgenommen (Vitrektomie).

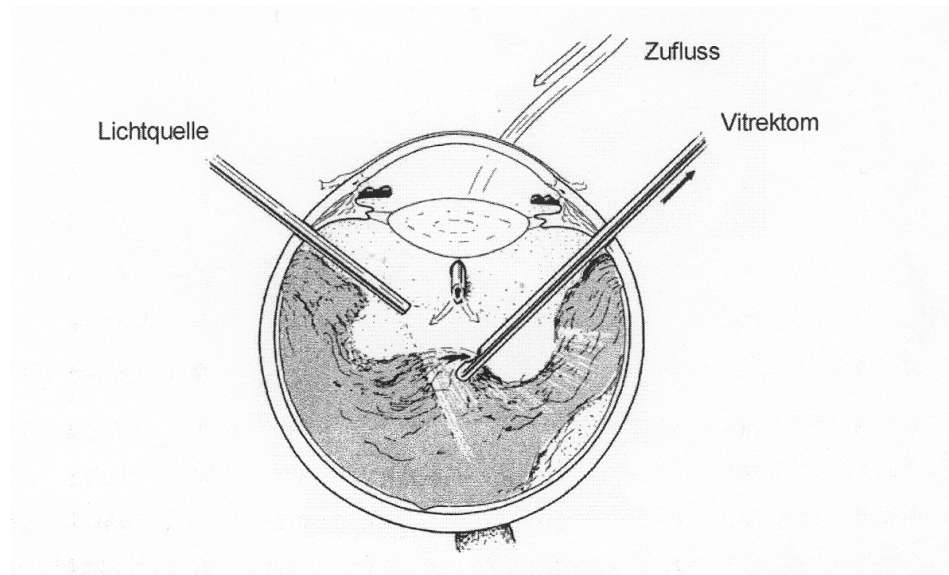


Abb. 7 Schematische Darstellung der Vitrektomie.

Zum einen bildet der Glaskörper ein Reservoir an Wachstumsfaktoren, zum anderen stellt er nach unvollständiger Entfernung eine Brücke für die Proliferation von Zellen dar, die Membranen im Glaskörper und auf der Netzhaut ausbilden⁴⁶.

Nach der meist unumgänglichen, umfangreichen operativen Versorgung des verletzten Auges mit Vitrektomie, Membran-Peeling und anschließender Glaskörperendotamponade durch Silikonöl sind derzeit in kurzen Abständen Revisionsoperationen erforderlich, da es zum Wachstum proliferativer Membranen auf der Netzhaut kommt, die durch Kontraktion zu einer Wiederablösung der Netzhaut auch unter Tamponade führen (proliferative Vitreoretinopathie, PVR).

Beim Auftreten von proliferativen Komplikationen oder entsprechendem Risikoprofil wird neben einer Endotamponade mittels Silikonöl eine medikamentöse Hemmung der Proliferation mittels intraokular applizierter Substanzen erforderlich. Durch intravitreale Einzelgaben von Steroiden und Zytostatika konnte dabei eine kurzfristige Besserung erreicht werden. Langfristige Ergebnisse blieben jedoch unbefriedigend^{47,48}.

2.2.2 Ascorbinsäure als Proliferationshemmer für Retinale Pigmentepithelzellen (RPE)

Dedifferenzierte RPE Zellen spielen eine signifikante Rolle bei der Bildung epiretinaler Membranen in der PVR⁴⁹. Dabei werden Corticosteroide und antiproliferative Agenzien in der Therapie eingesetzt⁵⁰. Derzeit wird Ascorbinsäure als natürlich vorkommende Substanz im Glaskörper als proliferationshemmender Faktor für RPE Zellen diskutiert^{51,52}. Neben der Funktion als Radikalfänger nimmt Ascorbinsäure in der Ophthalmologie wegen ihrer proliferationshemmenden Wirkung auf Fibroblasten und Linsenepithelzellen eine immer größere Bedeutung ein⁵¹. Ascorbinsäure löst in Fibroblasten, in Linsenepithelzellen und glatten Muskelzellen über unterschiedliche Mechanismen antiproliferative Effekte aus⁵¹. Ascorbinsäure ist in gesunden Augen in den Okularflüssigkeiten (Glaskörper, Kammerwasser) vorhanden, wogegen die Ascorbinsäurekonzentration in den Okularflüssigkeiten von Augen mit proliferativen Schädigungen vermindert ist. Es wird angenommen, dass Ascorbinsäure in der Kontrolle der intraokularen Zellproliferation involviert ist⁵¹. Wegen der Blut Retina Schranke und der damit verbundenen schweren Zugänglichkeit des Glaskörpers über intravenöse oder orale Applikation wird ein Wirkstofffreisetzungssystem aus mit Ascorbinsäure beladenen Mikrosphären für die Therapie der PVR diskutiert⁵³.

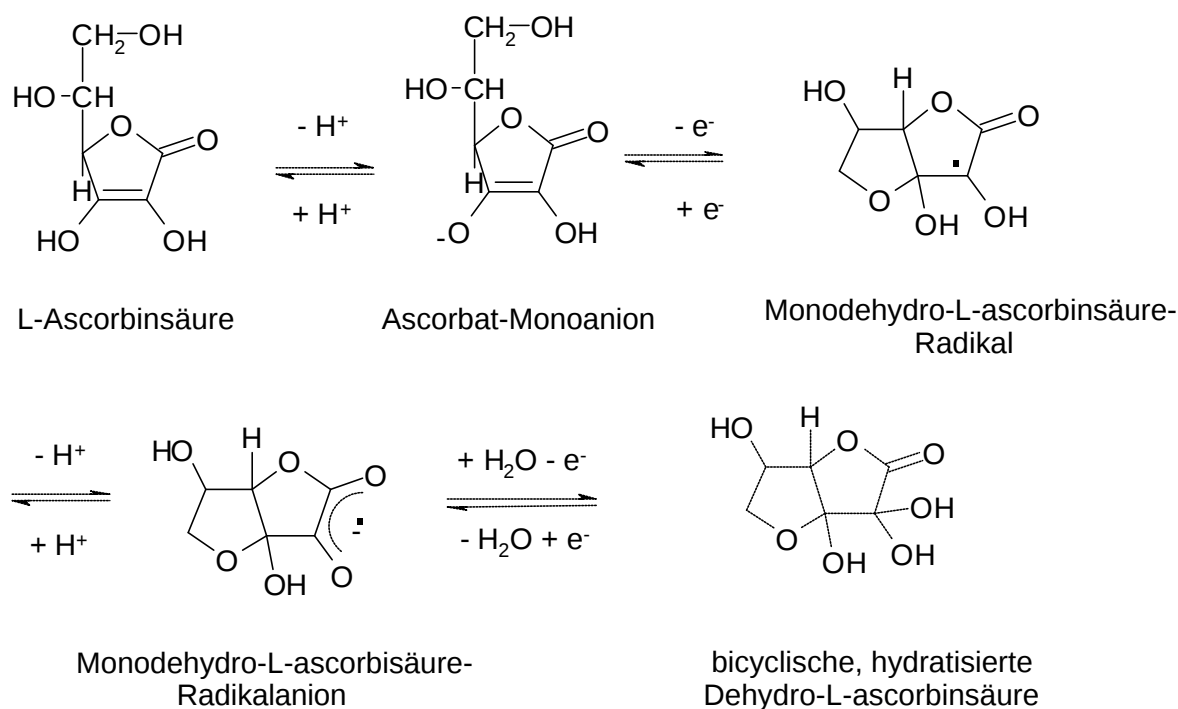
2.2.3 Analytik von Ascorbinsäure

L-Ascorbinsäure und Dehydro-L-ascorbinsäure bilden ein Redoxgleichgewicht, bei dem Monodehydro-L-ascorbinsäure als radikalische Zwischenstufe auftritt.

L-Ascorbinsäure reagiert in wässrigen Lösungen aufgrund der Dissoziation der beiden enolischen Hydroxyl-Gruppen als zweibasige Säure. Dabei ist die Hydroxyl-Gruppe am C-3 stärker sauer ($pK_{a1} = 4,17$) als die am C-2 ($pK_{a2} = 11,57$)^{54,55}. Als Folge der Dissoziation tritt in wässrigen Lösungen eine pH-Abhängigkeit der UV-Absorptionseigenschaften von L-Ascorbinsäure auf⁵⁶. In gepufferten, wässrigen Lösungen liegt L-Ascorbinsäure bei pH 2,0 zu mehr als 99 % in der undissoziierten Form vor, die ein Absorptionsmaximum bei 243 nm mit einem molaren Extinktionskoeffizienten von $10.000 \text{ mol}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$ aufweist. Im Gegensatz dazu liegt L-Ascorbinsäure bei pH 7,0 zu mehr als 99 % in Form des Monoanions vor, welches ein Absorptionsmaximum bei 265 nm mit einem molaren Extinktionskoeffizienten von $16.500 \text{ mol}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$ zeigt. In wässrigen, nicht gepufferten Lösungen wird mit Abnahme der L-Ascorbinsäure-Konzentration von 158 mg/l auf 2 mg/l aufgrund der zunehmenden Dissoziation eine Verschiebung des Absorptionsmaximums von 246 nm auf 264 nm beobachtet⁵⁶.

Diese Konzentrationsabhängigkeit des Absorptionsmaximums ist in gepufferten Lösungen, bedingt durch den konstanten Dissoziationsgrad, nicht zu beobachten. Für die quantitative Bestimmung von L-Ascorbinsäure mittels UV-Detektion folgt, dass zur Vermeidung einer Änderung des Absorptionsmaximums aufgrund unterschiedlicher Konzentrationen oder geringfügiger pH-Änderungen die Messungen in gepufferten Lösungen durchgeführt werden müssen.

Der Mechanismus der Oxidation von L-Ascorbinsäure zu Dehydro-L-ascorbinsäure in wässrigen Lösungen ist in Schema 2 dargestellt.



Schema 2 Mechanismus der Oxidation von L-Ascorbinsäure zu Dehydro-L-ascorbinsäure in wässriger Lösung.

Dabei erfolgt zunächst durch Deprotonierung die Bildung des Ascorbat-Monoanions, welches unter Abgabe eines Elektrons und Ringschluss in das Monodehydro-L-ascorbinsäure-Radikal übergeht. Mit einem pK_a -Wert von -0,45 ist dieses stärker sauer als die L-Ascorbinsäure selbst. Nach dem Verlust eines weiteren Protons wird das Radikal zum Radikalanion, das resonanzstabilisiert und deshalb relativ reaktionsträge ist.

Anschließend bilden die Radikalanionen Dimere, welche durch Disproportionierung in je ein Ascorbinsäure- und ein Dehydroascorbinsäure-Molekül zerfallen. In wässrigen Lösungen bildet sich dabei sofort das bicyclische, hydratisierte Hemiacetal der Dehydro-L-ascorbinsäure^{57, 58}.

Aufgrund der Beteiligung von Protonen am Redoxgleichgewicht zwischen L-Ascorbinsäure und Dehydro-L-ascorbinsäure ist das Redoxpotenzial vom pH-Wert der betrachteten Lösung abhängig. Diese Abhängigkeit wird durch die Nernst Gleichung beschrieben, welche sich unter der Annahme gleicher Aktivitäten von L-

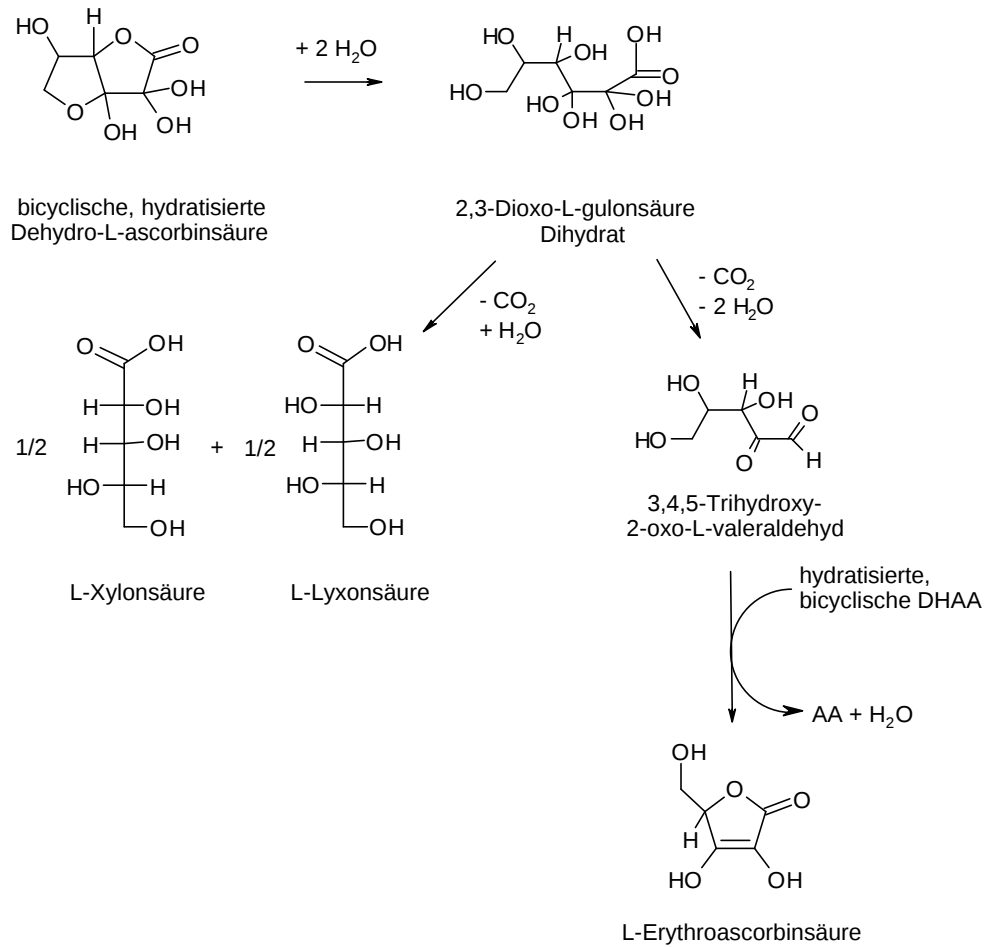
Ascorbinsäure und Dehydro-L-ascorbinsäure und einer gleichbleibenden Aktivität für Wasser zu

$$E = E_0 - 0,059 \text{ pH}$$

Gl. 1

vereinfachen lässt. Für das Redoxpotenzial (E) der Oxidation von L-Ascorbinsäure zu Dehydro-L-ascorbinsäure wird in der Literatur ein Wert von -0,06 V bei pH 7 angegeben⁵⁹. Mit Hilfe der Nernst-Gleichung lässt sich daraus das Standard-Redoxpotenzial berechnen, welches +0,35 V beträgt. Aufgrund des niedrigen Redoxpotenzials verläuft die Oxidation von L-Ascorbinsäure in neutralen und alkalischen Lösungen schneller als in sauren Lösungen. Die leichte Oxidierbarkeit von L-Ascorbinsäure ist ferner für deren Instabilität in wässrigen Lösungen verantwortlich. Die Reaktionsgeschwindigkeit nimmt dabei mit steigender Temperatur und abnehmender Ascorbinsäure-Konzentration zu; die Reaktion wird unter der Einwirkung von Tageslicht katalysiert^{60,61}.

Der Abbau der Dehydroascorbinsäure in wässriger Lösung beginnt mit einem irreversiblen Schritt unter Hydrolyse des Lactonringes (Schema 3). Das gebildete 2,3-Dioxo-L-gulonsäure Dihydrat wird einerseits unter Decarboxylierung zu 3,4,5-Trihydroxy-2-oxo-L-valeraldehyd umgesetzt. Dieser wird anschließend zu L-Erythroascorbinsäure oxidiert, wobei gleichzeitig Dehydro-L-ascorbinsäure zu L-Ascorbinsäure reduziert wird^{58,59,60}. Der Abbau der 2,3-Dioxo-L-gulonsäure führt außerdem unter Decarboxylierung zu L-Lyxonsäure und L-Xylonsäure⁶⁰.



Schema 3 Abbau der Dehydroascorbinsäure in wässriger Lösung zu verschiedenen Abbauprodukten

2.2.4 Problemstellung

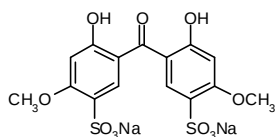
Ziel dieser Arbeit ist die Untersuchung des Freisetungsverhaltens von sphärischen Wirkstofffreisetzungssystemen im Mikrometerbereich auf Basis von Poly-(D,L-lactid) bzw. Poly(D,L-lactid)-co-PEO-co-poly(D,L-lactid). Die Mikrosphären sollen nach der o/w-Lösungsmittel-Evaporationsmethode hergestellt werden und mit verschiedenen hydrophil/hydrophoben Modellschubstanzen beladen werden. Das Freisetungsverhalten soll in Abhängigkeit von der Teilchengröße, der Beladung, der Modellschubstanz und dem polymeren Träger untersucht werden.

In der Ophthalmologie wird zur Behandlung der PVR ein Ascorbinsäure-Freisetzungssystem benötigt, welches die Vorteile einer Endotamponade mit denen eines implantierbaren Freisetzungssystems vereinigt. Diesbezüglich sollen die polymeren Träger PDLLA und das Poly(D,L-lactid)-co-PEO-co-poly(D,L-lactid) getestet werden, wobei über 14 Tage eine gewünschte Wirkstoffkonzentration aufrecht erhalten werden soll.

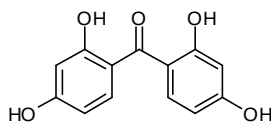
In der Angioplastie werden sogenannte Stents zur Beseitigung von Gefäßengungen verwendet. Dabei tritt häufig eine In-Stent Restenose auf, die dazu führt, dass das Gefäß erneut verengt. Dieser erneuten Gefäßverengung kann mit Wirkstoff tragenden Stents entgegengewirkt werden. Es soll gezeigt werden, dass ein e-PTFE ummantelter Stent mit Poly-(D,L-lactid)-co-TMC-Nanosphären beladen werden kann. Die Beladungseffektivität soll optimiert, die e-PTFE-Schicht mit Wirkstoff tragenden Nanosphären beladen und das Freisetungsverhalten des Wirkstoffes aus den Nanosphären in PBS-Puffer untersucht werden.

2.2.5 Auswahl von Modellwirkstoffen für Freisetzungssysteme

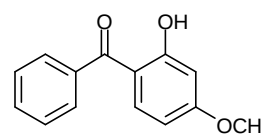
Für diese Arbeit wurden 2,2'-Dihydroxy-4,4'-dimethoxybenzophenon-5,5'-dinatriumsulfonat (*Uvinul DS-49™*), 2,2',4,4'-Tetrahydroxybenzophenon (*Uvinul D-50™*) und 2-Hydroxy-4-methoxybenzophenon (*Uvinul M-40™*) gewählt. Diese Präparate finden in der Sonnenschutzkosmetik als UV-Absorber Anwendung, filtern UV-Strahlen im UVB-Bereich 280-320 nm aus und schirmen damit die Haut insbesondere im Bereich des Maximums der Erythembildung bei 300-310 nm ab⁶².



DS-49



D-50



M-40

Für die Freisetzungsversuche wurden drei Modellsubstanzen gesucht, die in ihrer chemischen Struktur vergleichbar sind, aber eine unterschiedliche Hydrophilie aufweisen. Diesbezüglich eignen sich die oben genannten Benzophenone, welche eine vergleichbare chemische Struktur aufweisen, aber durch Hydroxylierung, Methoxylierung bzw. Sulfonierung verschiedene Wasserlöslichkeiten erhalten. Die Eigenschaften dieser Substanzklasse, die gute UV-Absorptionsfähigkeit und die Stabilität im wässrigen Milieu über lange Zeit macht sie für die Untersuchung von Wirkstofffreisetzungssystemen attraktiv. In Tab. 1 sind die Löslichkeiten der ausgewählten Modellsubstanzen in Wasser und Methylenchlorid gezeigt.

Tab. 1 Vergleich der Löslichkeiten der verwendeten Modellsubstanzen.

Modellsubstanz	Löslichkeit in H ₂ O in g/l	Löslichkeit in CH ₂ Cl ₂ in g/l
DS-49	52,63 ⁶³	0,05 ^a
D-50	0,14 ^a	1,09 ^a
M-40	0,05 ^a	749,45 ^a

a) Nach Versuchsbeschreibung 5.3.6. (Experimenteller Teil) bestimmt.

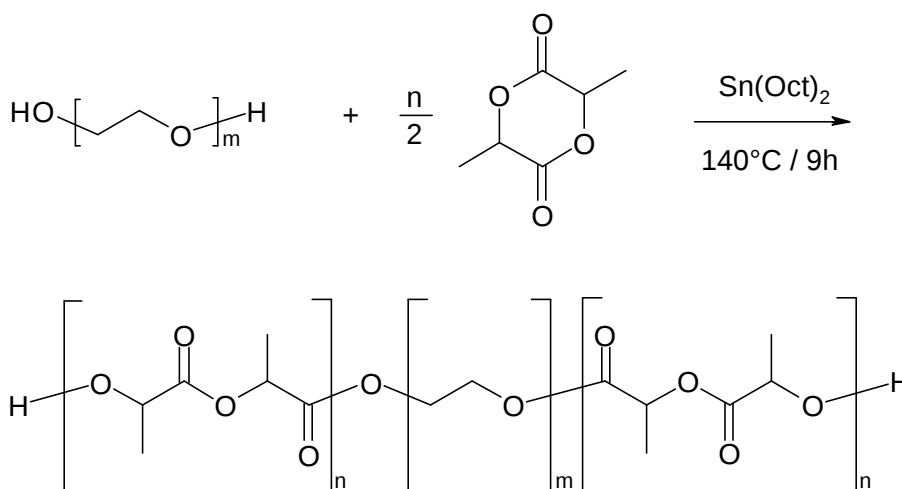
3 Poly(D,L-lactid) und Poly(D,L-lactid)-co-PEO-co-poly(D,L-lactid) als Matrixmaterial für Depotsysteme

Aliphatische Polyester stellen eine attraktive Klasse von Polymeren dar, die eine biomedizinische und pharmazeutische Anwendung finden. Ein Grund für das wachsende Interesse an diesem Typus eines degradierbaren Polymers liegt darin, dass sich die physikalischen und chemischen Eigenschaften über einen weiten Bereich durch Copolymerisation verändern lassen.

Poly lactide können über zwei verschiedene Arten synthetisiert werden. Die Polykondensation einer Hydroxycarbonsäure oder die ringöffnende Polymerisation (ROP) eines zyklischen Esters führt jeweils zu Polylactiden. Dabei ist die Polykondensationstechnik kostengünstiger als die Ringöffnungspolymerisation, allerdings ist es schwierig, mit der Polykondensationstechnik hohe Molekulargewichte zu erhalten. Die ROP von Lactonen und Lactiden ist sehr gut untersucht worden und wurde für Lactone erstmals von Schlack, später auch von Carothers et al. für Lactone, Anhydride und Carbonate beschrieben^{64,65,66}.

3.1 Synthese von Poly-(D,L-lactid)-co-PEO-co-poly-(D,L-lactid)

Bei der Synthese dieses ABA-Triblockcopolymers handelt es sich um eine ringöffnende, anionische Polymerisation von Lactid in Gegenwart von Polyethylenoxid (PEO, 2000) als Initiator und Zinn(II)-2-ethylhexanoat als Katalysator (Schema 4).



Schema 4 Reaktionsschema für die ringöffnende Polymerisation von Lactid in Gegenwart von Polyethylenoxid als Initiator und Zinn(II)-2-ethylhexanoat als Katalysator zu Poly-(D,L-lactid)-b-PEO-b-poly-(D,L-lactid).

Zinn(II)-2-ethylhexanoat wird in der Literatur gewöhnlich mit Zinnoctoat $[\text{Sn}(\text{Oct})_2]$ bezeichnet und ist für die Ringöffnungspolymerisation von Lactonen und Lactiden ein häufig verwendeter Katalysator^{67,68,69}. SnOct_2 wurde von der amerikanischen *Food and Drug Administration (FDA)* als Lebensmittelzusatz freigegeben^{70, 71} und findet bei der Synthese von Polylactiden Verwendung, die als Nahtmaterial eingesetzt werden⁷⁰.

Die Charakterisierung und die Bestimmung des Polymerisationsgrades wurde ^1H -NMR-spektroskopisch durchgeführt. Für die Herstellung von Mikrosphären nach der Lösungsmittel-Evaporationsmethode wurde ein hohes Molekulargewicht von $M_n = 100000$ eingestellt.

3.2 Freisetungsverhalten der Modellsubstanzen auf Basis unterschiedlich substituierter Benzophenone aus Poly-(D,L-lactid)- Mikrosphären

Für die Versuchsreihe wurden Mikrosphären aus PDLLA nach der o/w Lösungsmittel-Evaporationsmethode hergestellt. Die Einwaage an Modellsubstanz betrug jeweils 9, 13 und 17 Gew-%. Die auf ein Gramm Mikrosphären bezogenen Einwaagen werden als theoretische Beladung bezeichnet. Über Mikrosiebe wurden Partikelfractionen von 100-300 µm, 300-710 µm und, falls es die Partikelverteilung zuließ, 710-1000 µm isoliert, so dass jede Probe über ihre theoretische Beladung, ihre Partikelfraktion, ihre Modellsubstanz und den polymeren Träger charakterisiert werden kann. Zusätzlich wurde der Gehalt an Modellsubstanz in den Sphären bestimmt und mit praktischer Beladung bezeichnet. Die tatsächlich freigesetzte Menge an Modellsubstanz wird mit virtueller Beladung bezeichnet. Die Freisetzungsexperimente wurden bei 37°C in PBS-Puffer in einem Schüttelinkubator unter Sink-Bedingungen durchgeführt.

3.2.1 Freisetzung von 2,2'-Dihydroxy-4,4'-dimethoxybenzophenon-5,5'-dinatriumsulfonat (*Uvinul DS-49™*)

In Abb. 8 ist das Freisetzungsverhalten von 2,2'-Dihydroxy-4,4'-dimethoxybenzophenon-5,5'-dinatriumsulfonat (DS-49) aus PDLLA-Mikrosphären in Abhängigkeit von der Beladung und der Teilchengröße sowie die zu den Freisetzungskurven gehörenden relativen Freisetzungsraten dargestellt. Mit der relativen Freisetzung wird die freigesetzte Substanzmenge M bezogen auf die insgesamt freisetzbare Substanzmenge M_0 bezeichnet. Die relative Freisetzung M/M_0 von DS-49 aus PDLLA-Mikrosphären in eine PBS-Pufferlösung wird kumulativ, d.h. additiv gegen die Zeit aufgetragen. Die relativen Freisetzungsraten werden aus den relativen Freisetzungskurven durch Bildung der ersten Ableitung bezüglich der Zeit berechnet und geben die relative freigesetzte Wirkstoffmenge pro Zeiteinheit an.

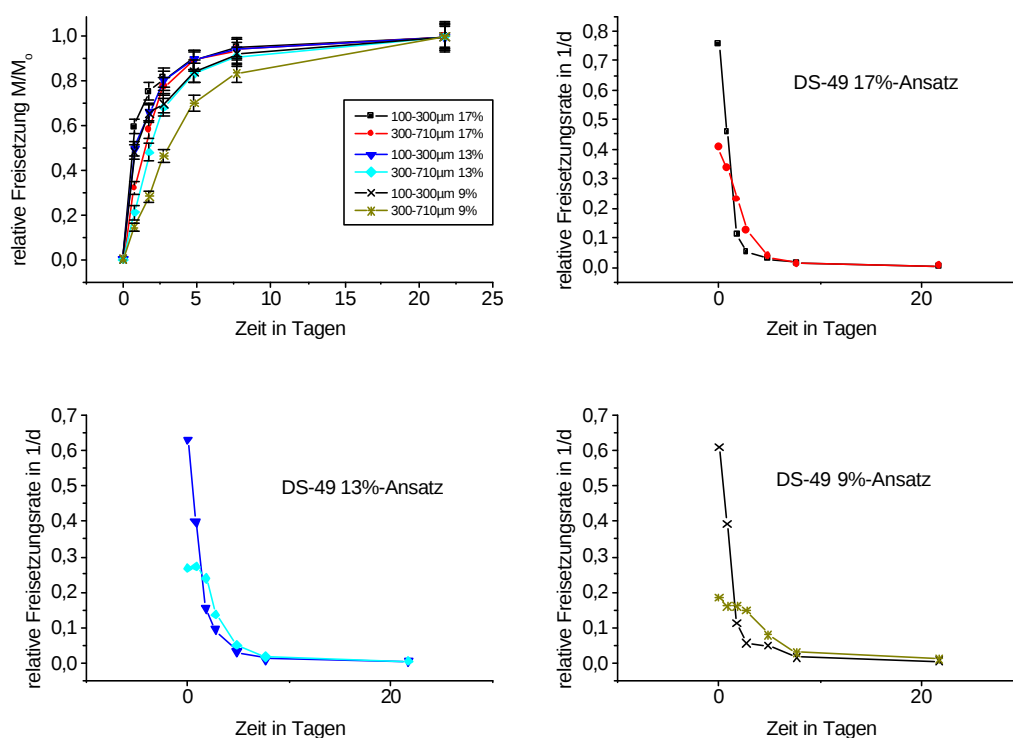


Abb. 8 Relative, kumulative Freisetzung von DS-49 aus PDLLA-Mikrosphären in Abhängigkeit von ihrer Beladung und Partikelgröße bei 37°C in PBS-Puffer unter Sink-Bedingungen und entsprechende relative Freisetzungsraten.

DS-49 besitzt als Salz hydrophile Eigenschaften. Nach drei Wochen wird keine Modellsubstanz mehr im Freisetzungsmedium nachgewiesen. Die relativen anfänglichen Freisetzungsraten f_0 der in Abb. 8 dargestellten relativen Freisetzungsraten sind in Tab. 2 zusammengestellt.

Tab. 2 Anfängliche relative Freisetzungsraten f_0 für DS-49 aus PDLLA-Mikrosphären in Abhängigkeit von der Partikelgröße und der theoretischen Beladung.

DS-49 PDLLA f_0 in d ⁻¹	Theoretische Beladung		
Partikelfraktion	17%	13%	9%
100-300 µm	0,756	0,630	0,609
300-710 µm	0,406	0,267	0,184

Die relativen anfänglichen Freisetzungsraten zeigen eine Abhängigkeit von der Partikelgröße und der theoretischen Beladung. Dabei setzen die Mikrosphären im Größenbereich von 100-300 µm wegen ihres größeren Oberflächen/Volumen-Verhältnisses schneller frei als die Mikrosphären im Bereich von 300-710 µm.

Die relativen Freisetzungsraten fallen für die kleinen Sphären im Bereich von 100-300 µm schnell ab. Zu Beginn der Freisetzung bei Kontakt der Sphären mit dem wässrigen Medium wird ein sogenannter *burst*-Effekt⁷² beobachtet. Die Freisetzungsraten während des *burst*-Effekts ist abhängig von der Oberfläche, von der Masse und der Verteilung des Wirkstoffes in den oberflächennahen Bereichen⁷³ sowie der Löslichkeit der Substanz in der Matrix und im Medium^{73,74,75,76,77}. Die Partikelfraktion von 300-710 µm zeigt ein anderes Freisetzungsverhalten als die 100-300 µm Partikelfraktion. Für die 9- und 13 %-Ansätze der 300-710 µm Fraktion wird unter Berücksichtigung von Messungenauigkeiten zunächst eine konstante Freisetzungsraten bzw. langsam abfallende Freisetzungsraten gefunden. Die relative Freisetzungsraten des 9 %-Ansatzes beträgt zu Beginn der Freisetzung 0,18 d⁻¹ und sinkt langsam nach 2,7 Tagen auf 0,15 d⁻¹. Anschließend sinkt sie schnell auf 0,08 d⁻¹ nach 4,8 Tagen ab. Die relative Freisetzungsraten des 13%-Ansatzes der 300-710 µm Fraktion zeigt zu Beginn der Freisetzung einen Wert von 0,27 d⁻¹. Nach 1,8 Tagen wird ein Wert von 0,24 d⁻¹ gefunden. Anschließend sinkt die relative Freisetzungsraten schnell ab und erreicht nach 4,8 Tagen einen Wert von 0,02 d⁻¹.

Der 17%-Ansatz der 300-710 μm Fraktion zeigt eine schnell abfallende relative Freisetzungsrates, die von $0,40 \text{ d}^{-1}$ zu Beginn der Freisetzung auf $0,04 \text{ d}^{-1}$ nach 4,8 Tagen abfällt. Zur Erklärung der genannten Ergebnisse muss auf die Herstellung der mit DS-49 beladenen Mikrosphären näher eingegangen werden.

Für die Herstellung der mit DS-49 beladenen PDLLA-Mikrosphären nach der Lösungsmittel-Evaporationsmethode wurde die Modellschubstanz in der kontinuierlichen, wässrigen Phase gelöst. Danach wurde die Ölphase hergestellt, indem zunächst PDLLA in Methylenchlorid gelöst und nach der Auflösung des Polymers eine definierte Menge an Modellschubstanz zugegeben wurde. Die kontinuierliche Phase war mit Modellschubstanz angereichert, um einen hohen Verlust an Modellschubstanz in den Sphären durch Diffusion während der o/w-Emulsionsbildung aus den Ölphasen-Tröpfchen (disperse Phase) in die wässrige (kontinuierliche) Phase entgegenzuwirken.

Da die kontinuierliche Phase nicht mit DS-49 gesättigt ist, findet eine Diffusion des hydrophilen DS-49 aus den Ölphasen-Tröpfchen in die wässrige Phase statt, die zu einer Ausbildung von Poren und Kanälen in den Mikrosphären führt^{78,79}. Die Ölphase setzt sich aus Dichlormethan, Polymer und Modellschubstanz zusammen. Eine geringe Beladung der Ölphasen-Tröpfchen mit Modellschubstanz führt zu Partikeln, in denen die Modellschubstanz nach Evaporation des Dichlormethans separiert in der Polymermatrix vorliegt. Mit zunehmender Beladung der Ölphase mit Modellschubstanz entsteht ein zusammenhängendes Kanalsystem einer DS-49 Phase, in den Mikrosphären. In Abb. 9 ist eine mit DS-49 beladene PDLLA-Mikrosphäre des 13 %-Ansatzes der Partikelfraktion von 300-710 μm gezeigt.

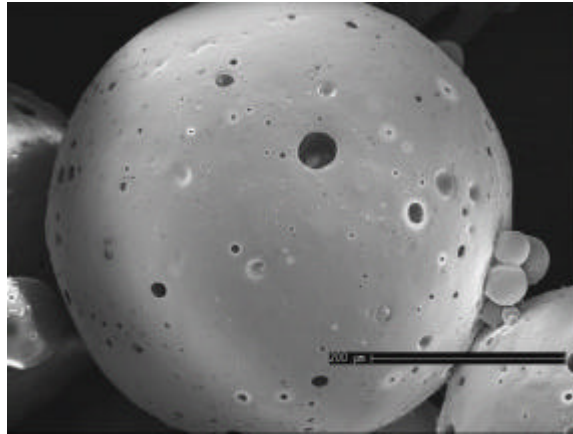


Abb. 9 REM-Aufnahme einer einzelnen mit DS-49 beladenen PDLLA-Mikrosphäre der Partikelfraktion 300-710 μm des 13 %-Ansatzes.

DS-49 beladene PDLLA-Mikrosphären erweisen sich als porenreiche Sphären. Während der Freisetzung von DS-49 aus PDLLA-Mikrosphären in das wässrige FreisetzungsmEDIUM dringt Wasser in die Poren und Kanäle ein. Die Löslichkeit und das Diffusionsvermögen der dispergierten Modellschubstanz in dem FreisetzungsmEDIUM bestimmt die Freisetzungsrute. Wegen der hydrophilen Natur von DS-49 und der damit verbundenen guten Wasserlöslichkeit wird die Modellschubstanz schnell aus den 100-300 μm Sphären freigesetzt. Da mit steigender Beladung der Sphären ein dichteres Kanalsystem in den Sphären entsteht⁷⁸, kann der Anstieg der anfänglichen relativen Freisetzungsrute mit steigender theoretischer Beladung erklärt werden. Die 300-710 μm Sphären zeigen das gleiche tendenzielle Verhalten wie die 100-300 μm Sphären. Die anfänglichen relativen Freisetzungsraten ergeben für die großen Sphären kleinere Werte als bei den kleinen Mikrosphären. Wegen des geringeren Oberflächen/Volumen-Verhältnisses der 300-710 μm Sphären im Vergleich zu den 100-300 μm Sphären werden kleinere anfängliche Freisetzungsraten als bei den großen Sphären gefunden.

In Abb. 10 sind die praktischen und virtuellen Beladungen der mit DS-49 beladenen PDLLA-Mikrosphären gezeigt.

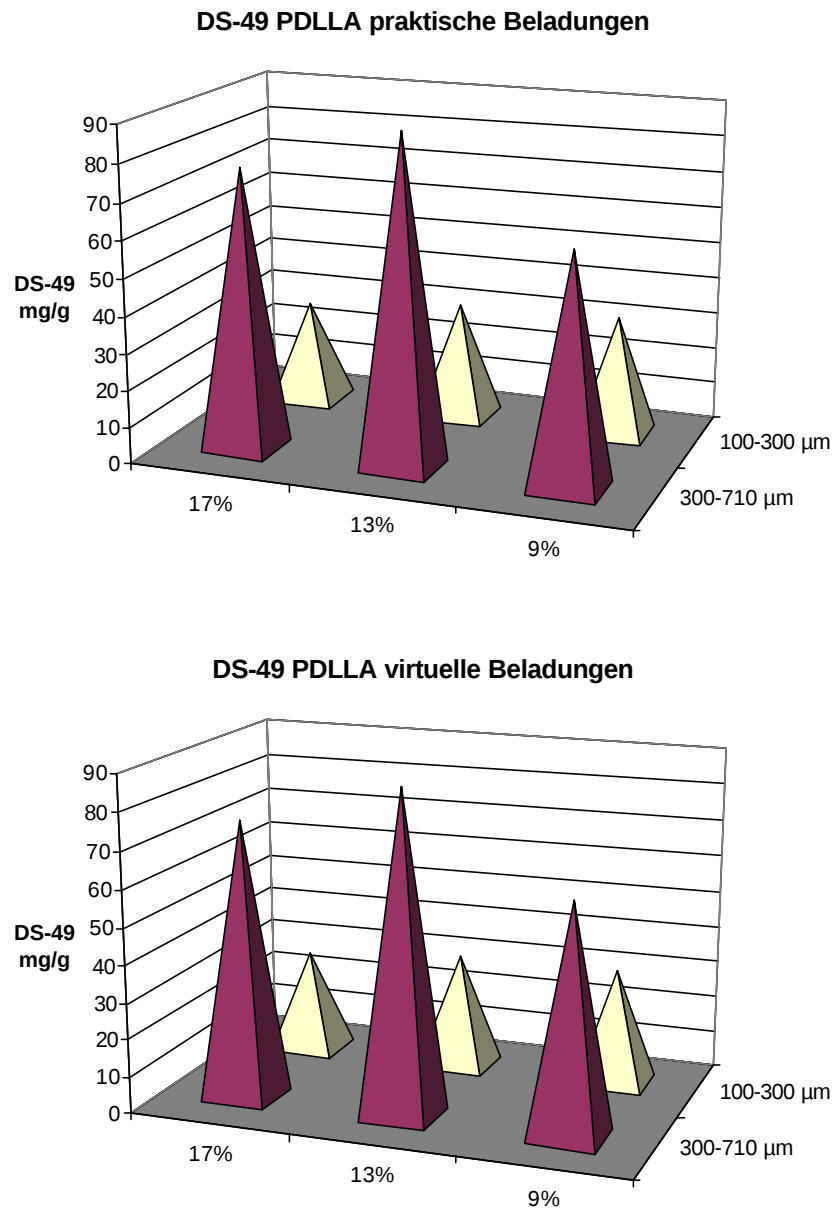


Abb. 10 Praktische und virtuelle Beladungen der mit DS-49 beladenen PDLLA-Mikrosphären. Die virtuelle Beladung gibt die bis zum 21. Tag freigesetzte Menge an. Die Werte sind in Milligramm angegeben und beziehen sich auf jeweils ein Gramm eingesetzter Mikrosphären.

Die praktische Beladung gibt die tatsächliche Beladung der Mikrosphären mit Wirkstoff bezogen auf ein Gramm Sphären an. Die virtuelle Beladung bezeichnet die freisetzbare Wirkstoffmenge bezogen auf ein Gramm Sphären.

Es fällt auf, dass die in Abb. 10 gezeigten praktischen Beladungen von DS-49 in PDLLA-Mikrosphären der 100-300 μm Sphären geringer ausfallen als die der 300-710 μm Sphären. Während der Herstellung nach der Lösungsmittel-Evaporationsmethode findet eine Diffusion von DS-49 aus den Öltröpfchen in die wässrige kontinuierliche Phase statt. Wegen des größeren Oberflächen/Volumen-Verhältnisses der 100-300 μm -Sphären im Vergleich zu den 300-710 μm -Sphären kann aus den kleinen Sphären mehr DS-49 in die kontinuierliche Phase diffundieren als aus den großen Sphären. Die durch Evaporation verursachte Entfernung des Lösungsmittels Dichlormethan aus der dispersen Phase führt zu einer Aushärtung der Mikrosphären und damit zu dem Einschluss von DS-49 in der polymeren Matrix. Dabei entstehen Mikrosphären, die eine geringere praktische Beladung für kleine Partikel aufweisen als für große.

Ein Vergleich der praktischen Beladung mit der virtuellen Beladung ergibt äquivalente Werte für beide Beladungstypen. Dies bedeutet, dass die Sphären nach der Freisetzungszeit von drei Wochen keine Modellsubstanz mehr inkorporieren. In Tab. 3 sind praktische, virtuelle und theoretische Beladung zusammen mit den Beladungseffektivitäten und den Freisetzungseffektivitäten gegenüber gestellt. Die Beladungseffektivität stellt die prozentuale praktische Beladung bezogen auf die theoretische Beladung dar. Die Freisetzungseffektivität beschreibt die prozentuale virtuelle Beladung, bezogen auf die praktische Beladung.

Tab. 3 Vergleich der theoretischen, praktischen und virtuellen Beladungen sowie errechnete Beladungs- und Freisetzungseffektivitäten der mit DS-49 beladenen PDLLA-Mikrosphären, bezogen auf jeweils 1 g Sphären.

DS 49 PDLLA		100-300 µm		300-710 µm	
		in mg/g	in %	in mg/g	in %
Theor. Beladung	9%	91	Beladungs- effektivität	91	Beladungs- effektivität
	13%	130		130	
	17%	167		167	
Prakt. Beladung	9%	32	35	62	68
	13%	32	25	89	68
	17%	28	17	76	46
			Freisetzungs- effektivität		Freisetzungs- effektivität
Virtuelle Beladung	9%	32	100	62	100
	13%	32	100	89	100
	17%	28	100	76	100

Die praktischen Beladungen unterscheiden sich deutlich von den theoretischen Beladungen. Die theoretischen Beladungen von 91, 130 und 167 mg/g werden bei den praktischen Beladungen für keine Sphärenfraktion erreicht. Wegen der hydrophilen Natur von DS-49 findet eine bereits beschriebene Diffusion der Modellsubstanz aus den Öltröpfchen in die wässrige Phase während der Herstellung nach der Lösungsmittel-Evaporationsmethode statt. Daher sind die praktischen Beladungen der mit DS-49 beladenen Mikrosphären geringer als die jeweiligen theoretischen Beladungen. Die Beladungseffektivität der mit DS-49 beladenen PDLLA Mikrosphären bleibt entweder konstant oder nimmt mit zunehmender theoretischer Beladung ab. PDLLA-Mikrosphären im Größenordnungsbereich von 100-300 µm weisen für eine theoretische Beladung von 9 % eine Beladungseffektivität von 35 % auf. Eine theoretische Beladung von 13 bzw. 17 % führt zu einer Beladungseffektivität von 25 bzw. 17 %. Ähnlich sieht es für die Partikelfraktion 300-710 µm aus. Die Beladungseffektivität sinkt mit steigender theoretischer Beladung von 68 auf 46 %. Da sich mit steigender theoretischer Beladung der Sphären ein dichteres Kanalsystem in den Sphären ausbildet^{78,79}, kann die Abnahme der Beladungseffektivität mit steigender theoretischer Beladung erklärt werden.

3.2.2 Freisetzung von 2,2',4,4'-Tetrahydroxybenzophenon (*Uvinul D-50TM*)

D-50 ist sowohl in Wasser als auch in Dichlormethan löslich. Die Löslichkeit von D-50 in Methylenchlorid ist mit 1,09 g/l höher als in Wasser mit 0,145 g/l. D-50 besitzt somit einen hydrophoberen Charakter als DS-49. In Abb. 11 ist das Freisetzungsverhalten von 2,2',4,4'-Tetrahydroxybenzophenon (D-50) aus PDLLA-Mikrosphären in Abhängigkeit von der theoretischen Beladung und der Partikelgröße sowie die entsprechenden relativen Freisetzungsraten gezeigt.

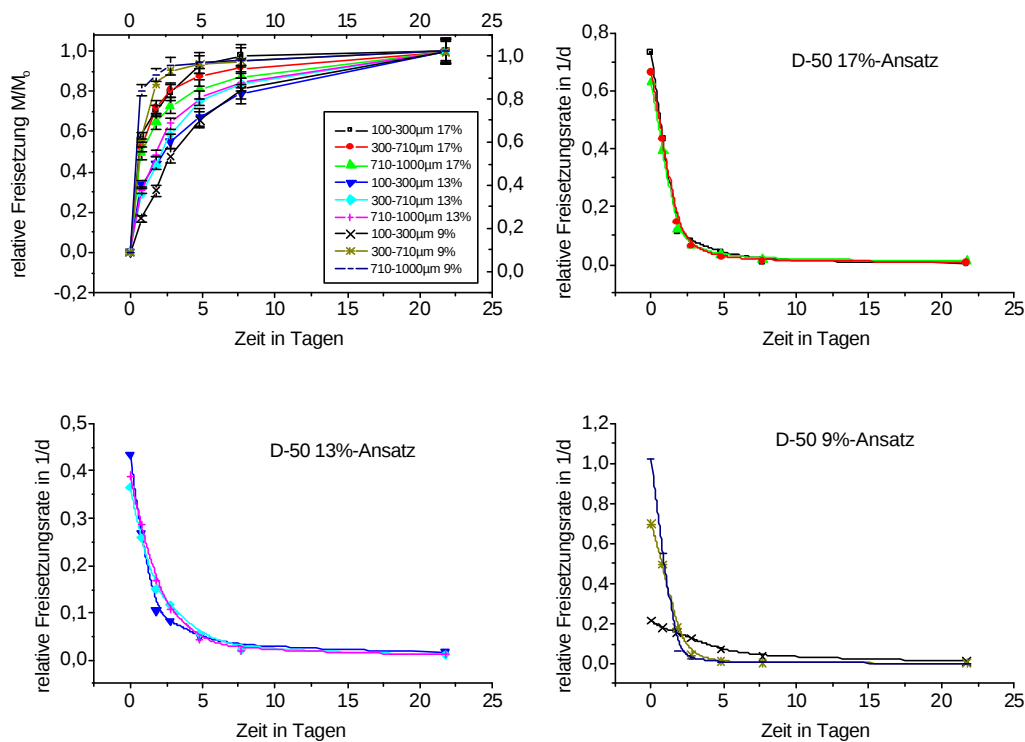


Abb. 11 Relative, kumulative Freisetzungen und entsprechende relative Freisetzungsraten von D-50 aus PDLLA-Mikrosphären in Abhängigkeit von ihrer Beladung und Partikelgröße bei 37°C in PBS-Puffer unter Sink-Bedingungen.

Bei Betrachtung der relativen Freisetzungen fällt auf, dass bei dem 9 %-Ansatz aus den kleinen Sphären der Partikelfraktion von 100-300 μm D-50 langsamer freigesetzt wird als aus den großen Sphären der Partikelfraktion von 710-1000 μm . Die 13 und 17 %-Ansätze zeigen keinen so deutlichen Unterschied wie der 9 %-Ansatz. Die relativen Freisetzungsraten der jeweiligen Partikelfraktionen des 13 und 17 %-Ansatzes zeigen einen ähnlichen zeitlichen Verlauf. In allen Fällen sinkt die relative Freisetzungsrates schnell ab. Die anfänglichen relativen Freisetzungsraten sind in Tab. 4 zusammengestellt.

Tab. 4 Anfängliche relative Freisetzungsraten f_0 für D-50 aus PDLLA-Mikrosphären in Abhängigkeit von der Partikelgröße und der theoretischen Beladung.

D-50 PDLLA f_0 in d^{-1}	Theoretische Beladung		
Partikelfraktion	17%	13%	9%
100-300 μm	0,734	0,433	0,214
300-710 μm	0,665	0,366	0,698
710-1000 μm	0,627	0,389	1,019

Auffallend ist, dass sowohl der 17% wie auch der 13%-Ansatz kaum Veränderungen in den jeweiligen anfänglichen Freisetzungsraten in Bezug auf die unterschiedlichen Partikelfraktionen zeigt. Für den 9%-Ansatz wird für die Partikelfraktion von 710-1000 μm mit 1,02 d^{-1} die höchste anfängliche relative Freisetzungsrates gefunden und für die 100-300 μm -Fraktion der kleinste Wert mit 0,21 d^{-1} . Es kann eine Tendenz beobachtet werden, dass die großen Sphären schneller freisetzen als die kleinen. Diese Tendenz nimmt dabei mit sinkender theoretischer Beladung zu. In Abb. 12 sind REM-Aufnahmen der Sphären des 9 %-Ansatzes gezeigt.

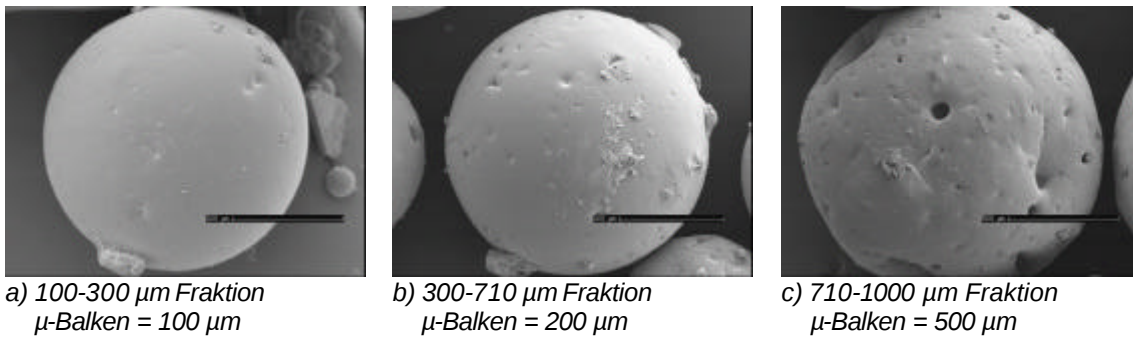
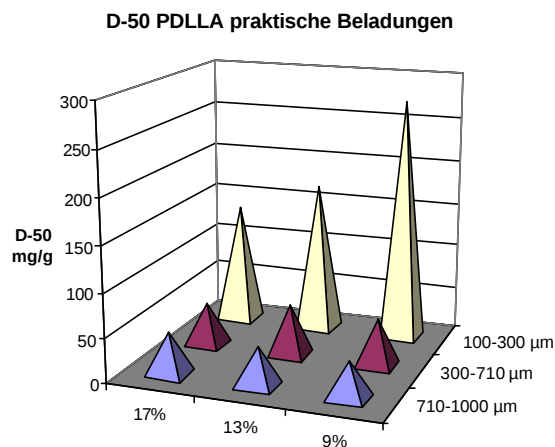


Abb. 12 REM-Aufnahmen einzelner Sphären der Partikelfraktion 100-300 µm (a), 300-710 µm (b) und 710-1000 µm des 9 %-Ansatzes der mit D-50 beladenen PDLLA-Mikrosphären.

Sphären mit der Partikelfraktion 100-300 µm weisen sehr glatte Oberflächen auf. Mit zunehmender Sphärengroße steigt die Anzahl der Poren auf den Sphären. Poren und Kanäle führen zu einer erhöhten Wasseraufnahme der Matrix^{80,81}. Dadurch können innerhalb kurzer Zeit große Mengen an Wirkstoff gelöst und freigesetzt werden^{78,80,81}. Daher setzen große Sphären schneller frei als kleine. D-50 zeigt somit ein gegensätzliches Freisetzungsverhalten aus PDLLA-Mikrosphären in PBS-Puffer als DS-49, bei dem kleine Sphären schneller freisetzen als große.

In Abb. 13 sind die Diagramme für die praktischen und virtuellen Beladungen der mit D-50 beladenen PDLLA-Mikrosphären gezeigt.



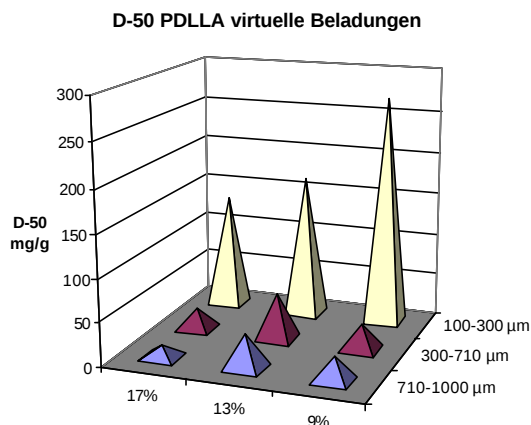


Abb. 13 Praktische und virtuelle Beladungen der mit D-50 beladenen PDLLA-Mikrosphären. Die virtuelle Beladung gibt die bis zum 21. Tag freigesetzte Menge an. Die Werte sind in Milligramm pro Gramm eingesetzter Mikrosphären angegeben.

Es fällt auf, dass die Sphären der Partikelfraktion von 100-300 µm sehr hohe praktische Beladungen aufweisen. Diese fallen für die 9- und 13%igen Ansätze sogar höher aus als die theoretische Beladung. Für die Herstellung der mit D-50 beladenen PDLLA-Mikrosphären nach der Lösungsmittel-Evaporationsmethode wurde analog der Herstellung von DS-49 beladenen PDLLA-Mikrosphären verfahren. D-50 befindet sich in gelöster Form in der kontinuierlichen, wässrigen Phase. Zur Bildung der Ölphase wurde PDLLA in Dichlormethan gelöst und anschließend D-50 mit einer Korngröße < 50 µm zugegeben. Nach kurzem Rühren wurde die Ölphase zur kontinuierlichen Phase gegeben; D-50 lag innerhalb der Ölphase zum größten Teil suspendiert vor. Unter Rühren entstand eine o/w-Emulsion. Die D-50-Partikel in der Ölphase lösen sich langsam in Dichlormethan auf. Außerdem findet eine Diffusion von D-50 aus der wässrigen Phase in die Ölphase statt. Da D-50 in der wässrigen Phase in gelöster Form vorliegt, können D-50-Moleküle leichter aus der wässrigen Phase in die Ölphase hineindiffundieren, als die in suspendierter Form vorliegenden D-50-Partikel in den Öltröpfchen D-50-Moleküle an das organische Lösungsmittel abgeben. In kleinen Sphären kann aufgrund des größeren Oberflächen/Volumen-Verhältnisses schneller eine Sättigung der Ölphase mit D-50 eintreten als in großen Sphären. Während der Herstellung nach der Lösungsmittel-Evaporationsmethode wird das organische Lösungsmittel entfernt und die Sphären erhärten. Kleine Sphären erhärten wiederum wegen des größeren Oberflächen/Volumen-

Verhältnisses schneller als große Sphären, wobei die Modellschubstanz in der polymeren Matrix inkorporiert wird. Dabei entstehen mit D-50 hochbeladene kleine Sphären. Bei großen Sphären wird mehr Zeit benötigt bis sie ausgehärtet sind. Die durch Evaporation bedingte Abnahme der Methylenchloridkonzentration in den mit D-50 hochbeladenen Sphären bewirkt eine Sättigung der Sphären mit Modellschubstanz. Die kontinuierliche wässrige Phase löst nun die in den Sphären befindlichen D-50-Partikel auf, wobei Poren und Kanäle entstehen. Je länger der Erhärtungsprozess der Sphären andauert, desto ausgeprägter entwickelt sich das Poren- und Kanalsystem. Damit kann die mit steigender Sphärengröße beobachtete zunehmende Anzahl an Poren auf D-50 beladenen PDLLA-Mikrosphären erklärt werden (Abb 12).

In Tab. 5 sind die theoretischen, praktischen und virtuellen Beladungen der mit D-50 beladenen PDLLA-Mikrosphären zusammen mit den Beladungseffektivitäten und den Freisetzungseffektivitäten gegenübergestellt.

Tab. 5 Vergleich der theoretischen, praktischen und virtuellen Beladungen sowie entsprechende Beladungs- und Freisetzungseffektivitäten der mit D-50 beladenen PDLLA-Mikrosphären bezogen auf jeweils 1 g Sphären.

D 50 PDLLA		100-300 µm		300-710 µm		710-1000 µm	
		in mg/g	in %	in mg/g	in %	in mg/g	in %
Theor. Beladung	9%	91	Beladungs- effektivität	91	Beladungs- effektivität	91	Beladungs- effektivität
	13%	130		130		130	
	17%	167		167		167	
Prakt. Beladung	9%	274	301	52	57	40	44
	13%	170	131	57	44	43	33
	17%	136	81	46	28	47	28
		Freisetzungs- effektivität		Freisetzungs- effektivität		Freisetzungs- effektivität	
Virtuelle Beladung	9%	270	99	30	58	28,4	70
	13%	169	99	55	96	40,1	93
	17%	135	99	23	50	14,1	30

3.2.3 Freisetzung von 2-Hydroxy-4-methoxybenzophenon (*Uvinul M-40TM*)

In der folgenden Versuchsreihe wurden PDLLA-Mikrosphären mit M-40 beladen und die Freisetzung der Modellsubstanz aus den Sphären in PBS-Puffer untersucht. In Abb.14 sind die relativen Freisetzung von 2-Hydroxy-4-methoxybenzophenon (M-40) aus PDLLA-Mikrosphären in PBS-Puffer und die entsprechenden relativen Freisetzungsraten in Abhängigkeit von der Beladung und der Partikelgröße gezeigt.

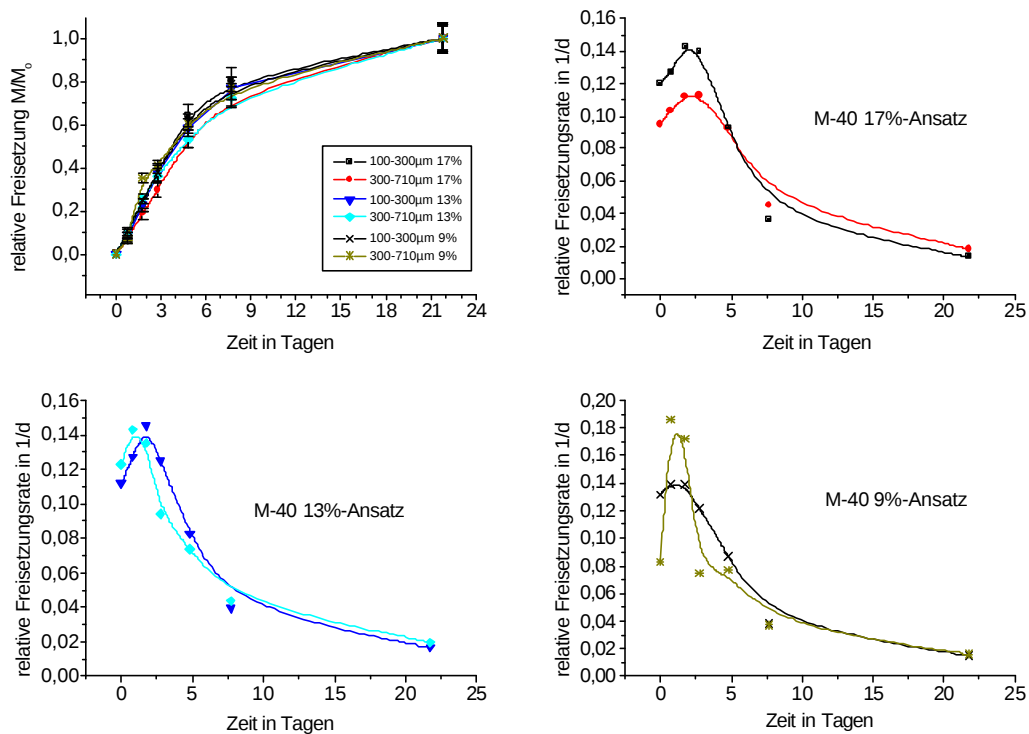


Abb. 14 Relative, kumulative Freisetzung von M-40 aus PDLLA Mikrosphären in Abhängigkeit von ihrer Beladung und Partikelgröße bei 37°C in PBS-Puffer unter Sink-Bedingungen und dazugehörige relative Freisetzungsraten.

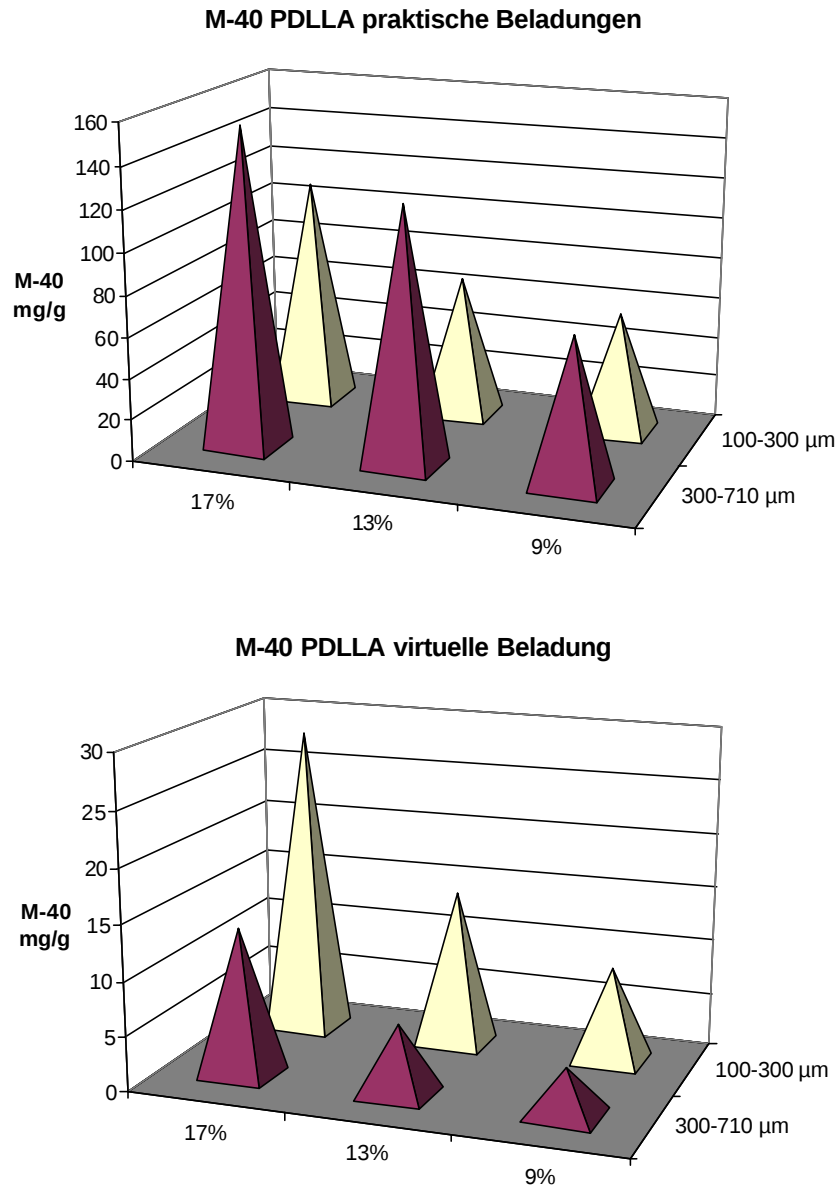
Die relativen Freisetzungskurven unterscheiden sich kaum und liegen alle in einem sehr engen Bereich. Die anfänglichen relativen Freisetzungsraten f_0 sind in Tab. 6 zusammengefasst.

Tab. 6 Anfängliche relative Freisetzungsraten f_0 für M-40 aus PDLLA-Mikrosphären in Abhängigkeit von der Partikelgröße und der theoretischen Beladung.

M-40 PDLLA f_0 in d ⁻¹	Theoretische Beladung		
Partikelfraktion	17%	13%	9%
100-300 µm	0,120	0,111	0,132
300-710 µm	0,095	0,123	0,083

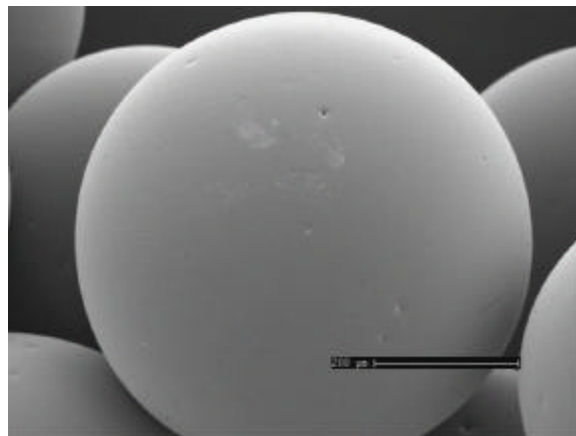
Wie die relativen Freisetzungskurven der mit M-40 beladenen PDLLA-Mikrosphären liegen auch die Werte für die anfänglichen relativen Freisetzungsraten in einem engen Bereich und es kann keine auffällige Abhängigkeit von der anfänglichen Freisetzungsraten weder bezüglich der unterschiedlichen theoretischen Beladungen noch der Teilchengröße beobachtet werden. Die relativen Freisetzungsraten der mit M-40 beladenen PDLLA-Sphären weisen alle ein Maximum auf. Um das Freisetzungsverhalten von M-40 aus PDLLA-Mikrosphären in eine PBS-Puffer-Lösung bei 37°C erklären zu können, muss der Einfluss der praktischen Beladung auf die Glasübergangstemperatur des PDLLA berücksichtigt werden, auf die später in diesem Kapitel genauer eingegangen wird.

In Abb. 15 sind die praktischen und die virtuellen Beladungen der mit M-40 beladenen PDLLA-Mikrosphären gegenübergestellt.

**Abb. 15**

Praktische und virtuelle Beladungen der mit M-40 beladenen PDLLA-Mikrosphären. Die virtuelle Beladung gibt die bis zum 21. Tag freigesetzte Menge an. Die Werte sind in Milligramm pro Gramm eingesetzter Mikrosphären angegeben.

Mit steigender theoretischer Beladung und steigendem Radius nimmt die praktische Beladung zu. M-40 besitzt eine Löslichkeit in Methylenchlorid von 749 g/l. Die Löslichkeit in Wasser beträgt 0,05 g/l. Für die Herstellung der M-40 beladenen PDLLA-Mikrosphären nach der Lösungsmittel-Evaporationsmethode werden zunächst die kontinuierliche und die disperse Phase separat hergestellt. Wegen der guten Löslichkeit von M-40 in Methylenchlorid stellt, anders als bei der Herstellung von DS-49 bzw. D-50 beladenen PDLLA-Mikrosphären, die Ölphase keine Suspension sondern eine Lösung von M-40 und PDLLA in Dichlormethan dar. Da in der Ölphase keine M-40-Partikel sondern gelöste M-40 Moleküle vorliegen, kann sich während der o/w-Emulsionsbildung kein ausgeprägtes Poren- und Kanalsystem in den Sphären ausbilden; wegen der homogenen Verteilung der M-40-Moleküle kann kein Wasser aus der kontinuierlichen Phase in die Sphären eindringen, um die Modellsubstanz auszuspülen. In Abb. 16 ist eine REM-Aufnahme von M-40 beladenen PDLLA-Mikrosphären des 13 %-Ansatzes der Partikelfraktion von 300-710 μm dargestellt.



μ -Balken = 200 μm

Abb. 16 REM-Aufnahme einer mit M-40 beladenen PDLLA-Mikrosphäre des 13%-Ansatzes der Partikelfraktion von 300-710 μm .

Die Oberfläche von M-40 beladenen PDLLA-Mikrosphären erweist sich als glatt, und es sind kaum Poren zu sehen. In Tab. 7 sind theoretische, praktische und virtuelle Beladungen gemeinsam mit den Beladungs- und Freisetzungseffektivitäten für M-40 in PDLLA-Mikrosphären zusammengefasst.

Tab. 7 Vergleich der theoretischen, praktischen und virtuellen Beladungen sowie entsprechender Beladungs- und Freisetzungseffektivitäten der mit M-40 beladenen PDLLA-Mikrosphären bezogen auf jeweils 1 g Sphären.

M 40 PDLLA		100-300 μm		300-710 μm	
		in mg/g	in %	in mg/g	in %
Theor. Beladung	9%	91	Beladungs- effektivität	91	Beladungs- effektivität
	13%	130		130	
	17%	167		167	
Prakt. Beladung	9%	59	65	70	77
	13%	69	53	124	95
	17%	110	66	155	93
			Freisetzungseffektivität		Freisetzungseffektivität
Virtuelle Beladung	9%	9	15	4	6
	13%	14	20	6	5
	17%	28	25	14	9

Da bei M-40 beladenen PDLLA-Mikrosphären während der Herstellung nach der Lösungsmittel-Evaporationsmethode kaum M-40 aus den Sphären ausgewaschen werden kann, steigen die praktischen Beladungen mit steigender theoretischer Beladung an. Außerdem werden aufgrund der geringen Löslichkeit von M-40 in der wässrigen Phase hohe Beladungseffektivitäten gefunden, die für die Partikelfraktion von 300-710 μm jeweils über 77 % liegen und geringe Freisetzungseffektivitäten, die für den 17 % Ansatz bei der Partikelfraktion von 100-300 μm einen Maximalwert von 25 % erreichen. Eine geringe Löslichkeit von M-40 in der wässrigen Phase bedeutet jedoch nicht, dass während der Herstellung keine Diffusion von M-40 aus der Ölphase in die kontinuierliche Phase stattfindet. Die niedrigeren Beladungseffektivitäten der 100-300 μm Sphären im Vergleich zu den 300-710 μm -Sphären zeigen, dass bei den kleinen Sphären wegen des größeren Oberflächen/Volumen-Verhältnisses mehr M-40 aus der Ölphase in die wässrige Phase diffundiert als bei den großen Sphären.

Für die Freisetzung von M-40 aus PDLLA-Mikrosphären in PBS-Puffer werden im Vergleich zur Freisetzung von DS-49 bzw. D-50 aus PDLLA-Mikrosphären geringe Freisetzungseffektivitäten gefunden.

Wegen der hydrophoben Natur von Polylactid⁸² wird für M-40 eine höhere Löslichkeit im Polymer gefunden als beispielsweise für DS-49. M-40 Moleküle sind wegen der homogenen Verteilung in den Sphären im Polymer*bulk* eingeschlossen und die Diffusion der M-40 Moleküle erfolgt durch die polymere Matrix. Die mit M-40 beladenen Mikrosphären sind nach einer Freisetzungszeit von drei Wochen noch hoch beladen. Wegen des großen Oberflächen/Volumen-Verhältnisses sind die Freisetzungseffektivitäten der Sphären mit der Partikelfraktion von 100-300 µm höher als die der Fraktion im Bereich von 300-710 µm.

3.2.4 Abbauverhalten von Poly-(D,L-lactid) Mikrosphären in Abhängigkeit von den inkorporierten Modellschubstanzen

Da PDLLA in wässrigem Milieu einem hydrolytischen Abbau unterworfen ist, wurde für die Partikelfraktion von 300-710 μm das Abbauverhalten während der Freisetzungszeit in Abhängigkeit von der theoretischen Beladung und der inkorporierten Modellschubstanz untersucht. Zusätzlich wurde für jeden Ansatz ein 100-Tage-Wert bestimmt, um Tendenzen besser abschätzen zu können. Hierzu wurde der Massenverlust der jeweiligen Mikrosphären gravimetrisch verfolgt. Die Degradation wurde gelpermeations-chromatographisch und der Einfluss der Degradation auf die Glasübergangstemperatur T_g wurde DSC-analytisch bestimmt.

Der Abbau des Polylactids erfolgt über eine Hydrolyse der Esterbindungen in der Hauptkette^{20,22,24,83}. Dabei entstehen zunächst niedermolekulare Fragmente, die unter fortschreitender Esterhydrolyse zu wasserlöslichen Abbauprodukten umgesetzt werden. In Abb. 17 ist der Massenverlust der mit DS-49 beladenen PDLLA-Mikrosphären gezeigt.

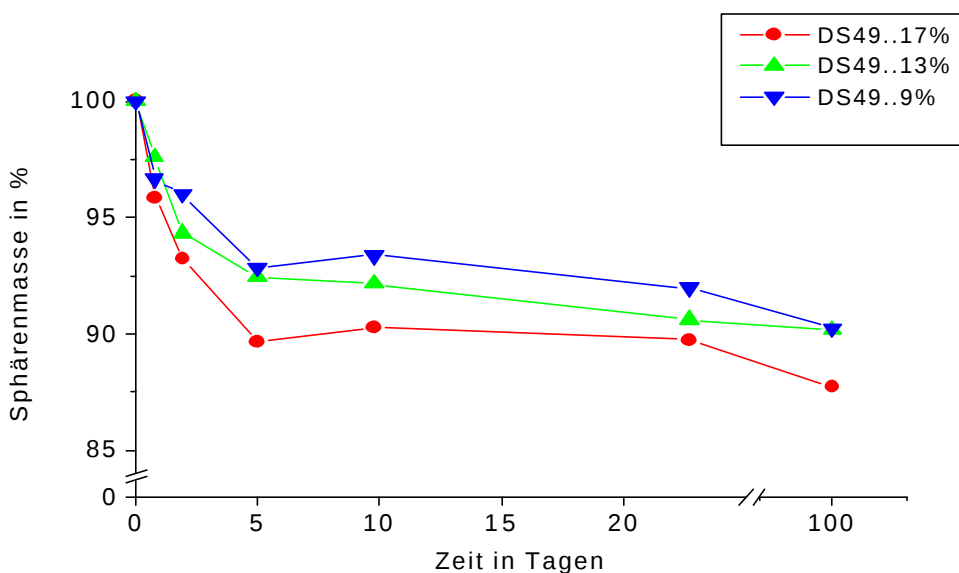


Abb. 17 Massenverlust der mit DS-49 beladenen PDLLA-Mikrosphären der Partikelfraktion von 300-710 μm während des Freisetzungsexperiments in PBS-Puffer bei 37°C unter Sink-Bedingungen.

Während der ersten zehn Tage im Freisetzungsmedium findet ein schnell verlaufender Massenverlust der mit DS-49 beladenen PDLLA-Mikrosphären statt. Die Mikrosphären des 17 %-Ansatzes verlieren 10%, die des 13 %-Ansatzes 8 % und die des 9 %-Ansatzes 7 % ihrer Masse. Bis zum 100. Tag verändert sich die Masse der Mikrosphären dann nur noch geringfügig und kann als konstant betrachtet werden, da die Messungenauigkeit bei der gravimetrischen Bestimmung der Sphärenmasse mit etwa 7 % abgeschätzt werden kann. In Abb. 18 und Abb. 19 ist jeweils der Massenverlust der mit D-50 bzw. M-40 beladenen PDLLA-Mikrosphären während des Freisetzungsexperiments in PBS-Puffer zu sehen.

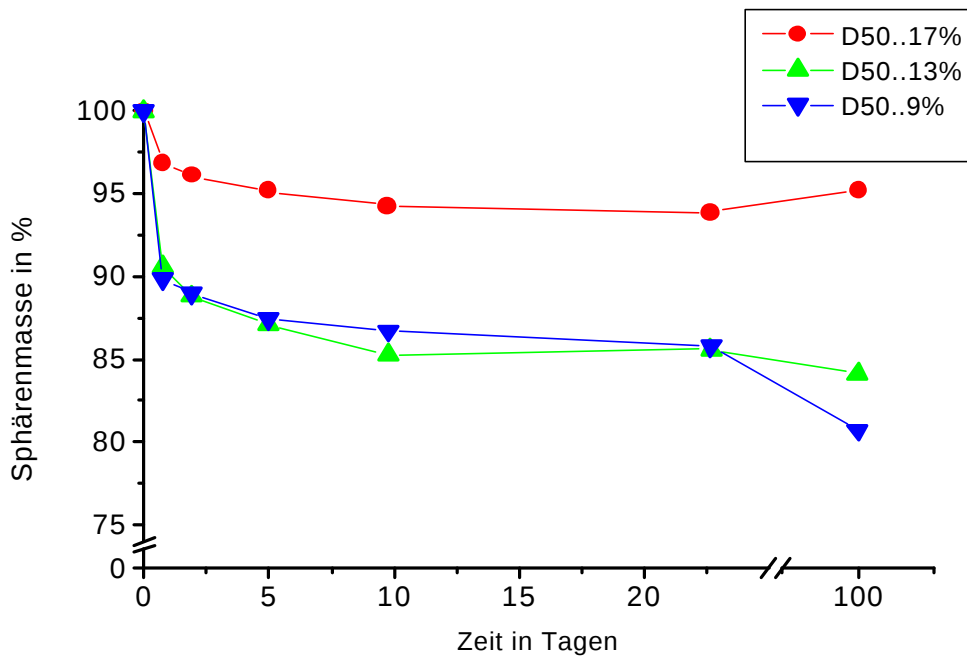


Abb. 18 Massenverlust der mit D-50 beladenen PDLLA-Mikrosphären der Partikelfraktion von 300-710 μm während des Freisetzungsexperiments in PBS-Puffer bei 37°C unter Sink-Bedingungen.

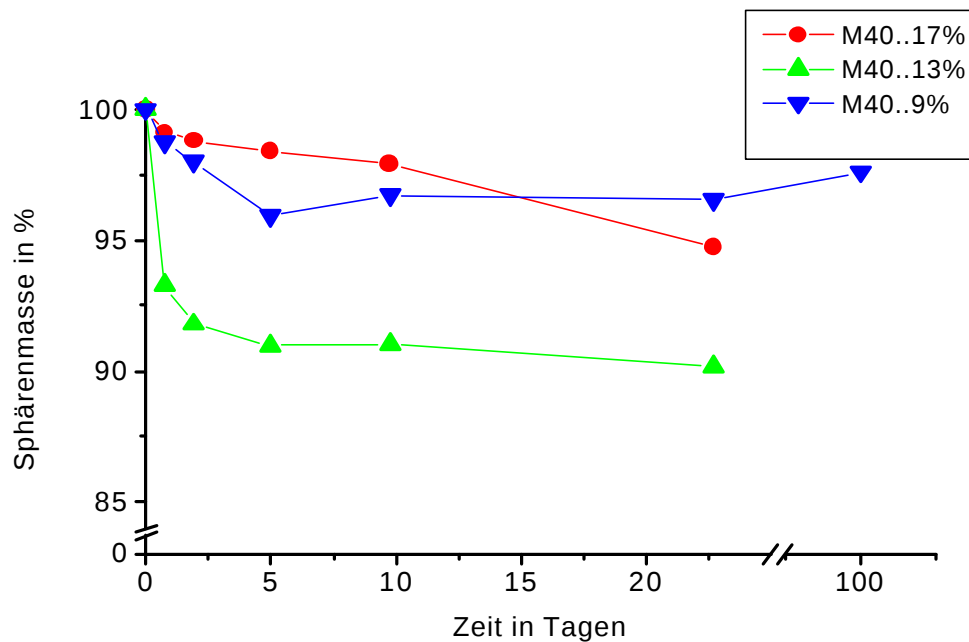


Abb. 19 Massenverlust der mit M-40 beladenen PDLLA-Mikrosphären der Partikelfraktion von 300-710 μm während des Freisetzungsexperiments in PBS-Puffer bei 37°C unter Sink-Bedingungen.

Der Massenverlust der mit D-50 beladenen PDLLA-Mikrosphären während der ersten drei Wochen im Freisetzungsmedium beträgt für den 9 und 13 %-Ansatz jeweils 14 % , für den 17 %-Ansatz beträgt er 6 %. M-40 beladene PDLLA-Mikrosphären zeigen während der ersten drei Wochen im Freisetzungsmedium einen Massenverlust von minimal 3 % für den 9 %-Ansatz und maximal 9 % für den 13 %-Ansatz. Ein 100-Tage-Wert für den Massenverlust der mit M-40 beladenen PDLLA-Mikrosphären des 13- und 17 %-Ansatzes kann nicht bestimmt werden, da der Abbau der polymeren Matrix bereits so weit fortgeschritten ist, dass anstelle der Sphären nur noch viskose, zähen Massen vorgefunden werden.

Der Massenverlust kann anhand von zwei Effekten beschrieben werden. Einerseits findet eine Freisetzung der Modells substanz aus den Mikrosphären in die PBS-Puffer-Lösung statt, andererseits führt die Diffusion von niedermolekularen, wasserlöslichen Degradationsprodukten der Hydrolyse des Polylactids aus den Sphären in die PBS-Puffer-Lösung zu einer Verringerung der Sphärenmasse.

Die Erosion beschreibt den Massenverlust der Sphären, der allein durch Diffusion von Degradationsprodukten des PDLLA aus den Sphären in das Freisetzungsmedium hervorgerufen wird. Für eine Beurteilung der Erosion der Mikrosphären wird der durch Wirkstofffreisetzung bedingte Massenverlust berücksichtigt und zu der jeweils gemessenen Masse addiert (Abb. 20).

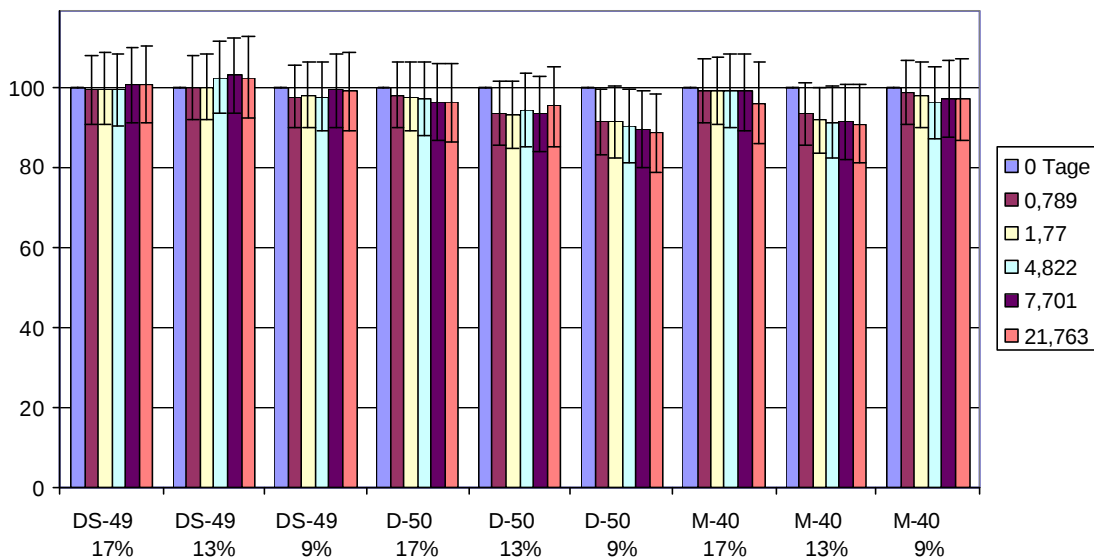


Abb. 20 Reine Erosion der PDLLA-Mikrosphären der Partikelfraktion von 300-710 μm während der ersten drei Wochen in PBS-Puffer bei 37°C unter Sink-Bedingungen, wobei die jeweils freigesetzte Menge an Modellschubstanz zu der Sphärenmasse addiert wurde.

Der Massenverlust der PDLLA-Mikrosphären, welcher allein durch Erosion hervorgerufen wird, kann während der ersten drei Wochen in PBS-Puffer vernachlässigt werden. Wird der Fehlerbereich der gravimetrischen Massenbestimmung von ca. 7 % und der Fehlerbereich bei der UV-spektroskopischen Bestimmung der jeweils freigesetzten Modellschubstanz berücksichtigt, so findet während der ersten drei Wochen wenig bis keine Erosion statt. Der Massenverlust der Mikrosphären kann allein mit der Freisetzung der jeweiligen Modellschubstanz aus den Sphären in das Freisetzungsmedium begründet werden. Das Degradationsverhalten, also die hydrolytische Spaltung der Polymerkette und die damit einhergehende zeitliche Abnahme des

Molekulargewichts, ist in Abb. 21 prozentual für die mit DS-49 beladenen Sphären gezeigt.

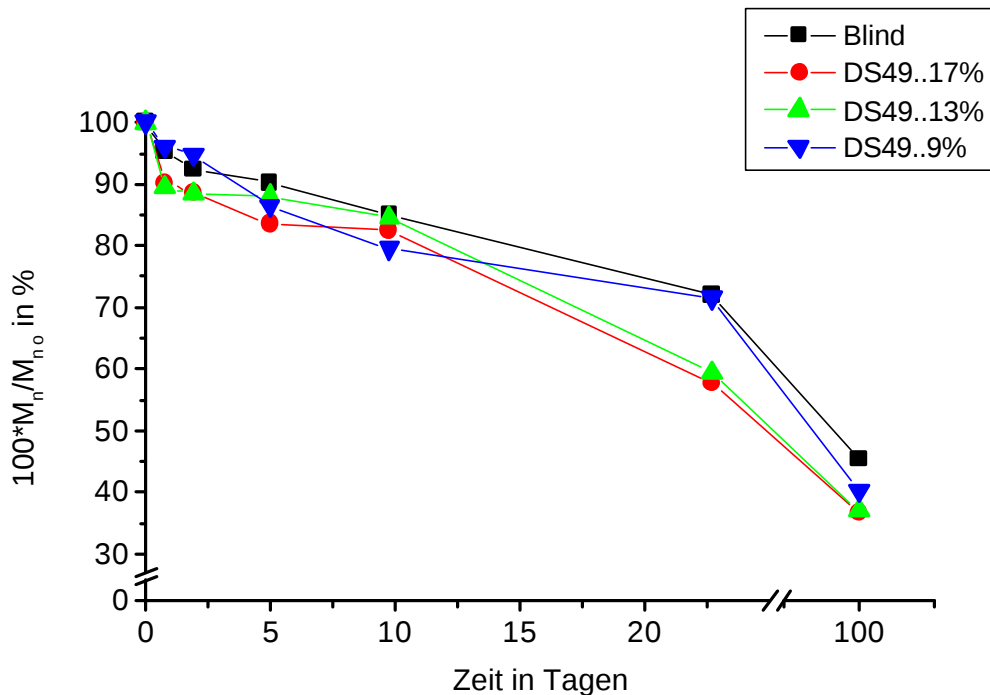


Abb. 21 Degradationsverhalten der mit DS-49 beladenen PDLLA-Mikrosphären der Partikelfraktion von 300-710 μm während des Freisetzungsexperiments in PBS-Puffer bei 37°C unter Sink-Bedingungen.

Die Degradation von unbeladenen Mikrosphären dient als Blindprobe. Das Abbauverhalten der drei mit DS-49 beladenen Mikrosphären zeigt einen ähnlichen Verlauf wie die Blindprobe wobei die Abbaugeschwindigkeit der mit DS-49 beladenen Mikrosphären etwas größer ist. Nach 100 Tagen Verweilzeit im PBS-Puffer wird ein Molekulargewicht von weniger als 40 % des anfänglichen Molekulargewichts von $M_n = 100000$ gefunden. Die Degradation der PDLLA-Ketten der mit D-50 bzw. M-40 beladenen Mikrosphären ist in Abb. 22 und Abb. 23 gezeigt.

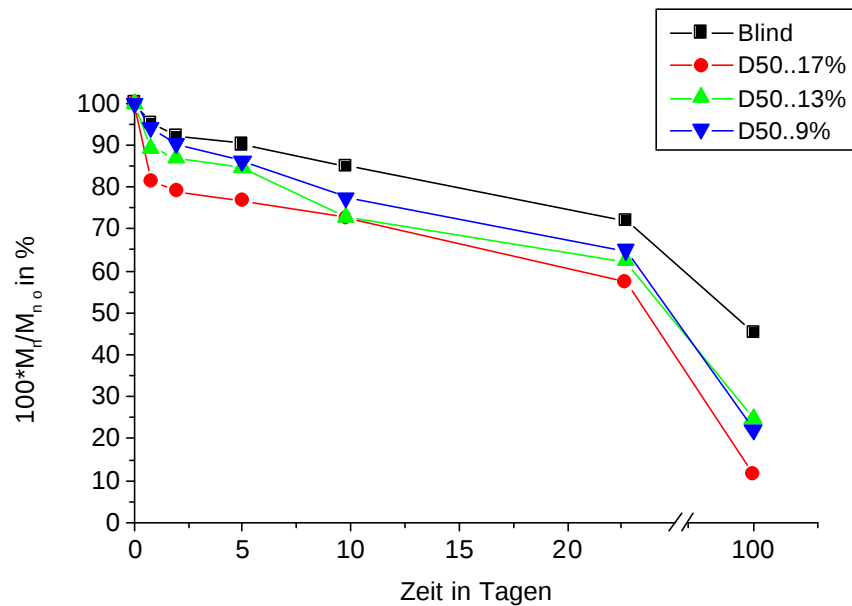


Abb. 22 Degradationsverhalten der mit D-50 beladenen PDLLA-Mikrosphären der Partikelfraktion von 300-710 μm während des Freisetzungsexperiments in PBS-Puffer bei 37°C unter Sink-Bedingungen.

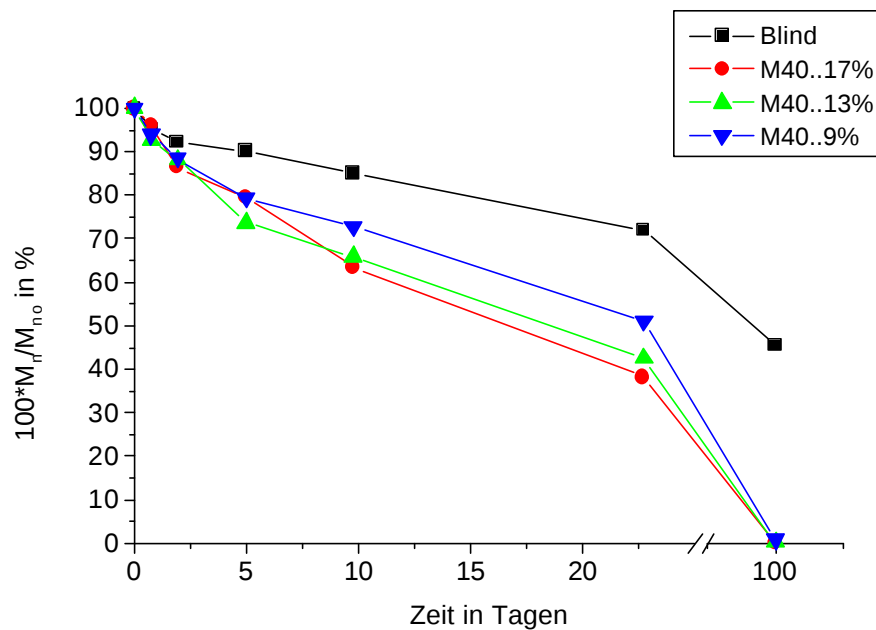


Abb. 23 Degradationsverhalten der mit M-40 beladenen PDLLA-Mikrosphären der Partikelfraktion von 300-710 μm während des Freisetzungsexperiments in PBS-Puffer bei 37°C unter Sink-Bedingungen.

Nach 100 Tagen Verweilzeit im PBS-Puffer sinkt das Molekulargewicht der mit D-50 beladenen Mikrosphären auf 25 % des anfänglichen Molekulargewichts. M-40 beladene Mikrosphären degradieren im gleichen Zeitraum noch stärker als die mit D-50 bzw. DS-49 beladenen Mikrosphären und weisen nach 100 Tagen Verweilzeit in PBS-Puffer weniger als 1 % des anfänglichen Molekulargewichts auf.

DS-49, D-50 und M-40 beladene Mikrosphären unterscheiden sich in ihrer Oberflächenbeschaffenheit. Während DS-49 beladene Mikrosphären eine hohe Anzahl an Poren pro Sphären zeigen, besitzen M-40 beladene Mikrosphären eine glatte Oberfläche. Die Anzahl und Größe der Poren nimmt in der Reihenfolge DS-49, D-50, M-40 ab. In DS-49 beladene Mikrosphären kann der Puffer ungehindert durch die Poren eindringen. D-50 beladene Mikrosphären besitzen kleinere Poren als DS-49 beladene Mikrosphären. Je kleiner die Poren sind, umso geringer ist die Quellung. M-40 beladene Mikrosphären können kein Lösungsmittel über Poren aufnehmen. Es findet eine Diffusion von Lösungsmittelmolekülen durch die Polymermatrix statt. Während der Degradation der PDLLA-Ketten entstehen Carbonsäurefunktionen und damit Protonen, welche wiederum den Abbau katalysieren^{22,24,25}. Das Degradationsverhalten der mit DS-49, D-50 bzw. M-40 beladenen Mikrosphären der Partikelfraktion von 300–710 µm kann mit Hilfe der Autokatalyse erklärt werden.

Die Anwesenheit des PBS-Puffers in den mit DS-49 beladenen Mikrosphären wirkt durch Abpufferung der entstandenen Protonen der Autokatalyse der Hydrolyse der PDLLA-Ketten entgegen. Bei D-50 beladenen PDLLA-Mikrosphären ist der Austausch mit dem Puffer wegen der geringen Anzahl und aufgrund der kleineren Poren stark behindert. In M-40 beladene Sphären kann der Puffer nicht eindringen. Wassermoleküle diffundieren durch die Polymermatrix und führen zu einem ungepufferten Polymerabbau.

In einer weiteren Untersuchung wurde DSC-analytisch die zeitliche Änderung der Glasübergangstemperatur T_g der PDLLA-Mikrosphären während des Freisetzungsexperiments verfolgt. In Abb. 24 ist die Änderung der Glastemperatur für unbeladene PDLLA-Mikrosphären der Partikelfraktion von 300-710 µm gezeigt.

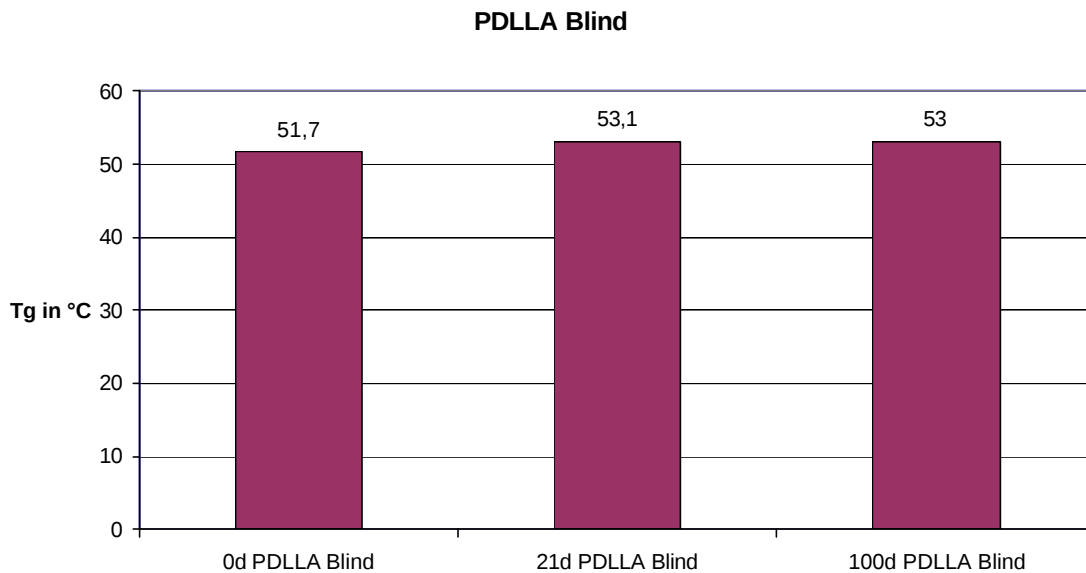


Abb. 24 Glasübergangstemperaturen T_g ermittelt aus der zweiten Aufheizkurve der DSC-Messung für unbeladene PDLLA-Mikrosphären der Partikelfraktion 300-710 μm während der Verweilzeit in PBS-Puffer bei 37°C unter Sink-Bedingungen.

Die unbeladenen Sphären besitzen eine Glasübergangstemperatur von 51,7°C. Nach 21 Tagen bzw. 100 Tagen werden Werte von 53,1°C und 53,0°C erhalten. Die Messung der Glasübergangstemperatur für unbehandeltes, rohes PDLLA ergibt einen Wert von 56,2°C. Während der Herstellung der Mikrosphären nach der Lösungsmittel-Evaporationsmethode kommen die Sphären in Kontakt mit Wasser. Spuren von Wasser, die auch durch einen Trocknungsprozess im Vakuumexsiccator nicht entfernt wurden, üben einen Weichmachungseffekt auf PDLLA aus, der zu einer Erniedrigung von T_g führt. Schwankungen von ca. 5°C in T_g können auf Spuren von Wasser in den Mikrosphären zurückgeführt werden. Über einen Zeitraum von 100 Tagen bei 37°C in PBS-Puffer bleibt T_g unter Berücksichtigung einer Fehlerbreite von 5°C für unbeladene PDLLA Mikrosphären konstant.

In Abb. 25 ist der Verlauf der Glastemperatur für die DS-49 beladenen Mikrosphären zu sehen. Diese schwanken zwischen 48,1°C für den 17% Ansatz bei 0 Tagen und 54,0 °C für den 13 % Ansatz bei 0 Tagen.

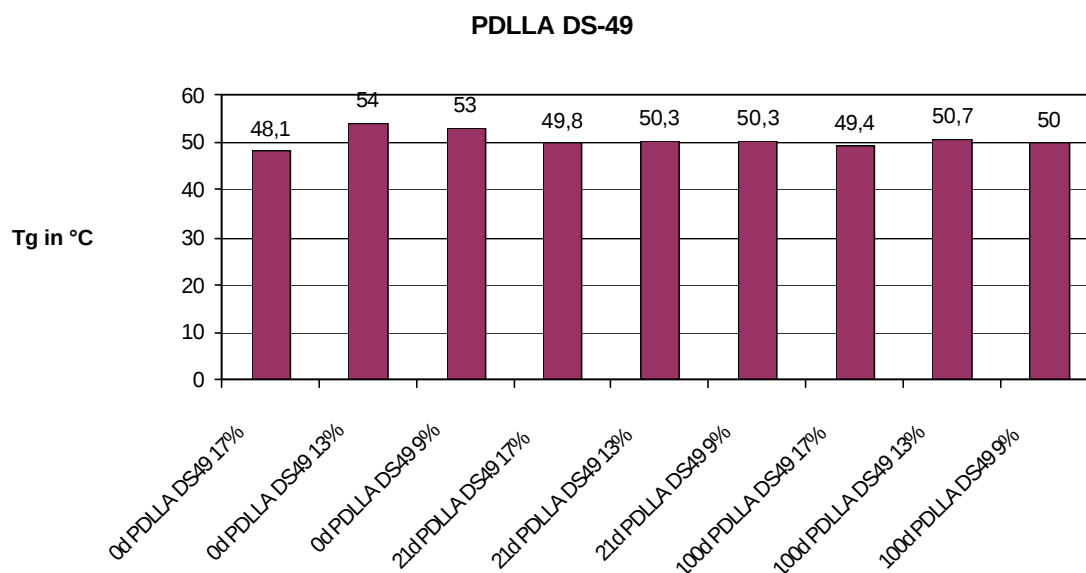


Abb. 25 Glasübergangstemperaturen T_g ermittelt aus der zweiten Aufheizkurve der DSC-Messung für DS-49 beladene PDLLA-Mikrosphären der Partikelfraktion 300-710 μm während des Freisetzungsexperiments in PBS-Puffer bei 37°C unter Sink-Bedingungen.

Wie auch bei den unbeladenen Mikrosphären können die Glasübergangstemperaturen bei den mit DS-49 beladenen PDLLA-Mikrosphären als konstant angesehen werden, wenn Schwankungen aufgrund des durch Wasserrückstände in den Mikrosphären hervorgerufenen Weichmachungseffekts berücksichtigt werden. Die Degradation der Polymerkette hat nach 100 Tagen noch keinen Einfluss auf den Erweichungspunkt. In Abb. 26 und Abb. 27 sind jeweils die Änderungen der Glasübergangstemperaturen für D-50 und M-40 beladene Mikrosphären gezeigt.

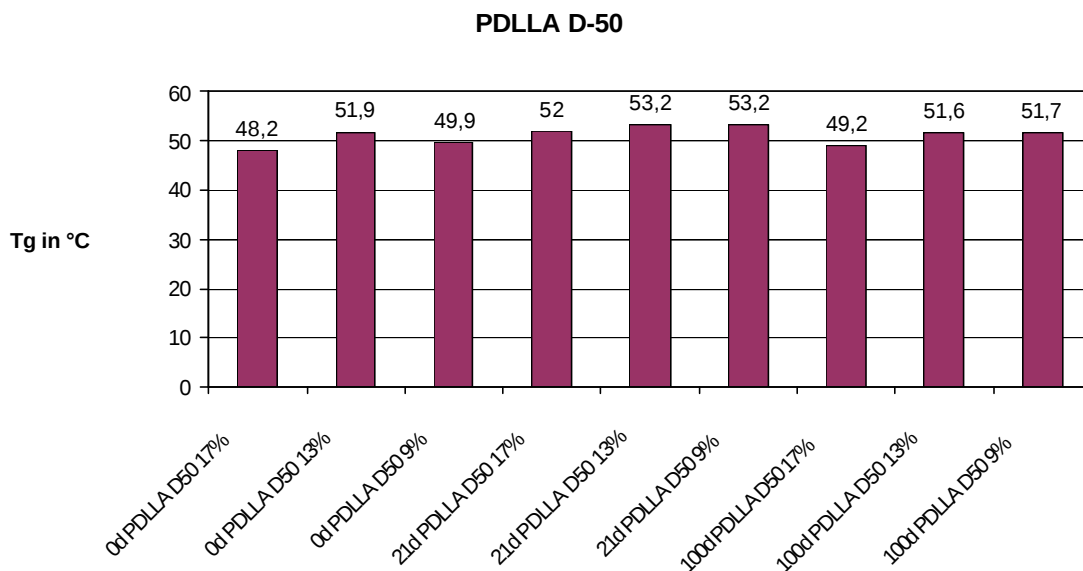


Abb. 26 Glasübergangstemperaturen Tg ermittelt aus der zweiten Aufheizkurve der DSC-Messung für D-50 beladene PDLLA-Mikrosphären der Partikelfraktion 300-710 µm während des Freisetzungsexperiments in PBS-Puffer bei 37°C unter Sink-Bedingungen.

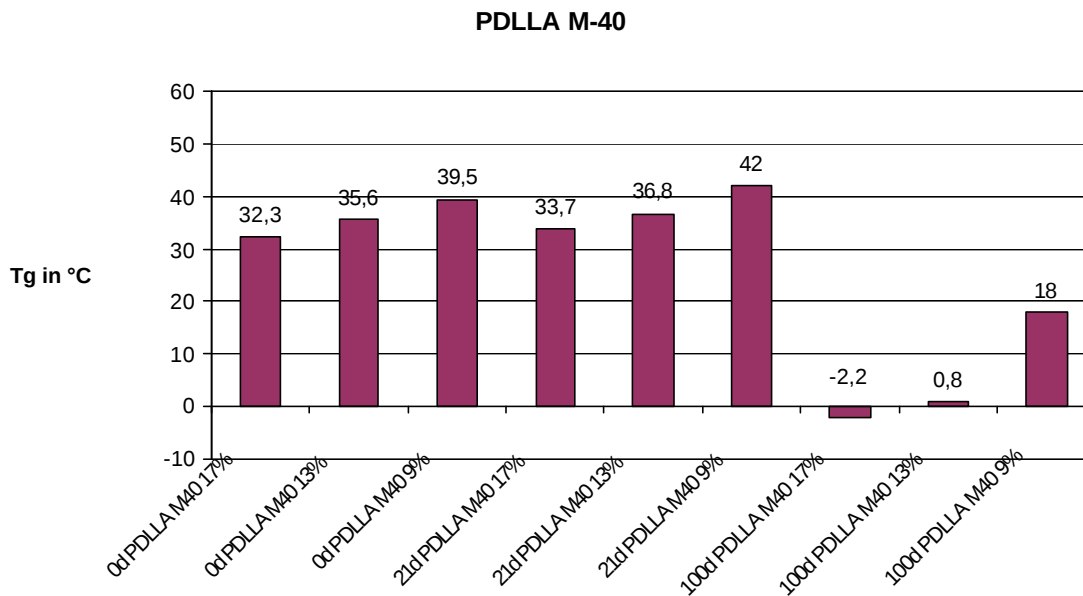


Abb. 27 Glasübergangstemperaturen Tg ermittelt aus der zweiten Aufheizkurve der DSC-Messung für M-40 beladene PDLLA-Mikrosphären der Partikelfraktion 300-710 µm während des Freisetzungsexperiments in PBS-Puffer bei 37°C unter Sink-Bedingungen.

Wie aus Abb. 26 zu entnehmen ist, schwanken die Glasübergangstemperaturen der mit D-50 beladenen PDLLA-Mikrosphären zwischen 48,2°C für den 17%-Ansatz bei

0 Tagen, 53,2°C für den 13 % und 9%-Ansatz bei 21 Tagen. Wie man aus Abb. 22 entnehmen kann, ist die PDLLA-Degradation der mit D-50 beladenen Sphären nach 100 Tagen Verweilzeit in PBS-Puffer für alle Ansätze bereits zu mehr als 70% fortgeschritten, wobei sich die Degradation der Polymerkette nach 100 Tagen noch nicht in einer messbaren Änderung von Tg bemerkbar macht. Der stabile Tg macht sich im Erosionsverhalten bemerkbar. Wie in Abb. 17 und Abb. 18 zu sehen ist, bleibt die Masse der mit DS-49 und D-50 beladenen Mikrosphären nach beendeter Freisetzung noch 80 Tage lang nahezu konstant.

Für M-40 beladene Mikrosphären ändert sich Tg für den jeweiligen Ansatz während der ersten drei Wochen nicht. Allerdings übt die Beladungshöhe der mit M-40 beladenen Mikrosphären einen Einfluss auf Tg aus. Dies kann auf einen Weichmachungseffekt der Modellsubstanz zurückgeführt werden, der für die hochbeladenen Mikrosphären des 17%-Ansatzes Tg von etwa 33°C, für den 13%-Ansatz Tg von etwa 36°C und für den 9%-Ansatz einen Wert von etwa 41°C ergibt. Nach 100 Tagen Verweilzeit der mit M-40 beladenen Mikrosphären in PBS-Puffer fällt Tg dann weit ab und erreicht für den 17%-Ansatz -2,2°C, für den 13%-Ansatz 0,8°C und für den 9%-Ansatz 18,0°C. Im Falle des 9%-Ansatzes werden nach 100 Tagen noch stark agglomerierte Sphären gefunden. Für die anderen beiden Ansätze werden entsprechend dem detektierten Tg viskose, zähe Massen gefunden. Die Degradation der PDLLA-Ketten bei M-40 beladenen Mikrosphären zeigt nach 100 Tagen Verweilzeit in PBS-Puffer einen 99 %igen Abbau.

Die Beweglichkeit der PDLLA-Ketten, welche von der Polymerkettenlänge abhängig ist, macht sich im Tg bemerkbar⁸⁴. Die Degradation des Polymers führt zu einer Kettenverkürzung. Nach 100 Tagen Verweilzeit in PBS-Puffer sind die Polymerketten für die mit M-40 beladenen Mikrosphären so stark verkürzt, dass es zu einer Zunahme der Beweglichkeit der Polymerketten kommt. Die Zunahme der Kettenbeweglichkeit führt zu einer Erniedrigung der Glasübergangstemperatur bei den mit M-40 beladenen Mikrosphären. Bei DS-49 und D-50 beladenen Mikrosphären sind die Polymerketten nach 100 Tagen Verweilzeit in PBS-Puffer noch lang und unbeweglich genug und haben keinen Einfluss auf Tg.

Kinetische Betrachtung

Da in den ersten drei Wochen, in denen die Freisetzung der Modellsubstanzen stattfindet, die Erosion der Mikrosphären vernachlässigbar ist und die Glasübergangstemperaturen während der Freisetzungszeit keine Änderung erfahren, wird eine diffusionskontrollierte Freisetzung nach Higuchi angenommen, nach der die freigesetzte relative Substanzmenge M/M_o proportional zur Wurzel der Zeit ist^{82, 85}. Die Steigung k , der Ordinatenabschnitt a und der quadratische Korrelationskoeffizient R^2 der linearen Regression werden für alle Freisetzungen nach Gl.2 bestimmt.

$$\frac{M}{M_o} = k\sqrt{t} + a \quad \text{Gl.2}$$

Die kinetische Betrachtung der Freisetzung von DS-49 aus PDLLA-Mikrosphären ist in Tab. 8 gezeigt.

Tab. 8 Achsenabschnitt a , Steigung k und quadratischer Korrelationskoeffizient R^2 aus Gl.2 für die Freisetzung von DS-49 aus PDLLA-Mikrosphären in PBS-Puffer bei 37°C unter Sink-Bedingungen in Abhängigkeit von der theoretischen Beladung und Partikelgröße.

DS-49 PDLLA	Theoretische Beladung			
Partikelfraktion	Parameter	17%	13%	9%
100-300 µm	$k \text{ in } d^{-1/2}$	0,58	0,48	0,44
	a	0,020	0,021	0,035
	R^2	0,9822	0,9913	0,9680
300-710 µm	$k \text{ in } d^{-1/2}$	0,43	0,40	0,26
	a	-0,015	-0,048	-0,034
	R^2	0,9822	0,9414	0,9225

Die Korrelationskoeffizienten schwanken zwischen 0,9225 für den 9 %-Ansatz der Partikelfraktion von 300-710 µm und 0,9913 für den 13 %-Ansatz mit der Partikelfraktion von 100-300 µm. Die Steigung k kann als ein Maß für die Freisetzungsrates interpretiert werden und zeigt zwei Tendenzen. Erstens ergibt sich eine bereits erwähnte Abhängigkeit der Freisetzungsgeschwindigkeit bezüglich der Partikelgröße, wobei aus den kleineren Sphären DS-49 schneller ins

Freisetzungsmedium freigesetzt wird als aus großen. Zweitens nimmt die Freisetzungsgeschwindigkeit mit steigender Beladung zu.

Die Achsenabschnitte liegen zwischen -0,048 für den 13 %-Ansatz der Partikelfraktion 300-710 μm und 0,035 für den 9 %-Ansatz der Partikelfraktion 100-300 μm . Damit das Freisetzungsverhalten von DS-49 aus PDLLA-Mikrosphären mit einer diffusionskontrollierten Freisetzung nach Higuchi beschrieben werden kann, muss bei der linearen Regression ein Achsenabschnitt von $a = 0$ gefunden werden. Unter Berücksichtigung von Messfehlern bei der UV-spektroskopischen Bestimmung der Modellsubstanz von bis zu 7 % lassen sich die Abweichungen der Achsenabschnitte von $a = 0$ erklären, und es kann von einer diffusionsgesteuerten Freisetzung von DS-49 aus PDLLA-Mikrosphären in PBS-Puffer ausgegangen werden. Die Ergebnisse der Regressionsanalyse für die Freisetzung von D-50 aus PDLLA-Mikrosphären sind in Tab. 9 dargestellt.

Tab. 9 Achsenabschnitt a , Steigung k und quadratischer Korrelationskoeffizient R^2 aus Gl.2 für die Freisetzung von D-50 aus PDLLA-Mikrosphären in PBS-Puffer bei 37°C unter Sink-Bedingungen in Abhängigkeit von der theoretischen Beladung und Partikelgröße.

D-50 PDLLA Partikelfraktion	Theoretische Beladung			
	Parameter	17%	13%	9%
100-300 μm	$k \text{ in } d^{-1/2}$	0,55	0,33	0,30
	a	0,024	0,015	-0,046
	R^2	0,9721	0,9899	0,9655
300-710 μm	$k \text{ in } d^{-1/2}$	0,55	0,35	0,63
	a	0,009	-0,008	-0,0018
	R^2	0,9955	0,9955	0,9999
710-1000 μm	$k \text{ in } d^{-1/2}$	0,50	0,38	0,70
	a	0,013	-0,011	0,046
	R^2	0,9889	0,9961	0,9389

Die Korrelationskoeffizienten schwanken zwischen 0,9389 für den 9 %-Ansatz mit der Partikelfraktion von 710-1000 μm und 0,9999 % für den 9 %-Ansatz mit der Partikelfraktion von 300-710 μm .

Auffallend sind die Steigungen der Regressionsgeraden des 9 %-Ansatzes, da hier für die 100-300 μm Sphären mit 0,30 $d^{-1/2}$ der kleinste und für die 710-1000 μm

Mikrosphären mit $0,70 \text{ d}^{-1/2}$ der höchste Wert gefunden wird. Dieses Freisetzungsverhalten von D-50 aus PDLLA-Mikrosphären wurde bereits mit der hohen Anzahl an Poren pro Sphären bei den 710-1000 μm Sphären erklärt.

Die aus der Regressionsanalyse erhaltenen Achsenabschnitte a bei der Freisetzung von D-50 aus PDLLA-Mikrosphären schwanken zwischen -0,046 für den 9 %-Ansatz mit der Partikelfraktion 100-300 μm und 0,046 für den 9 %-Ansatz der Partikelfraktion von 710-1000 μm . Die relative Freisetzungsrates von D-50 aus PDLLA-Mikrosphären der Partikelfraktion von 100-300 μm des 9 %-Ansatzes in Abb. 11 ist langsam abfallend. Die glatte Oberfläche und die Abwesenheit von Poren führt zu einer verzögerten Freisetzung, die sich in einem schwachen *lag*-Effekt bemerkbar macht. Außerdem erklärt die Berücksichtigung von Meßfehlern bei der UV-spektroskopischen Bestimmung der Modellschubstanz von bis zu 6 % ein abweichendes Verhalten von einem Achsenabschnitt $a = 0$. Mit diesen Erklärungen für $a \neq 0$ kann auch hier von einer diffusionskontrollierten Freisetzung ausgegangen werden.

Die Regressionsanalyse unter Annahme einer Diffusionskontrolle der Freisetzung von M-40 aus PDLLA-Mikrosphären ergibt für alle Kurven negative Achsenabschnitte, wie in Abb. 28 an einem Fallbeispiel gezeigt wird.

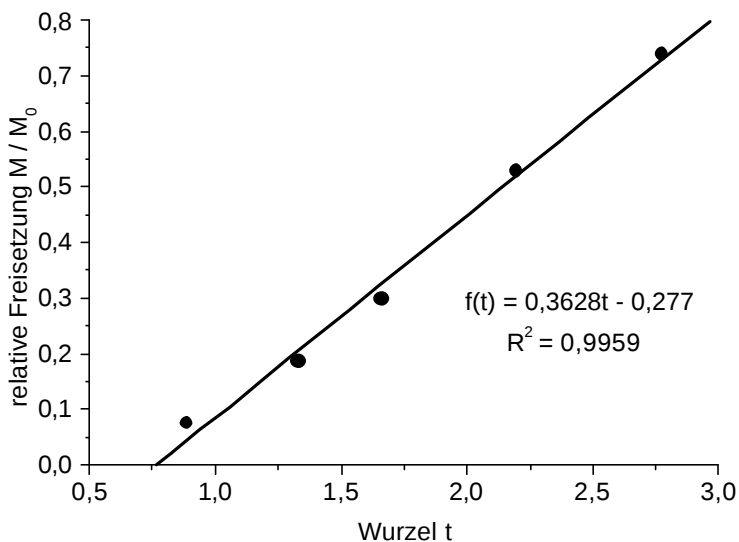


Abb. 28 Fallbeispiel für die Regressionsanalyse der Freisetzung von M-40 aus PDLLA-Mikrosphären für den 17%-Ansatz mit der Partikelfraktion von 300-710 μm . Die Regressionsgerade schneidet die Ordinate bei -0,277.

Negative Achsenabschnitte werden durch einen *lag*-Effekt verursacht, der gerade bei der Freisetzung hydrophober Substanzen in ein wässriges Medium beobachtet wird^{33,86}. Dabei wird eine zeitlich verzögerte Freisetzung hervorgerufen. In Tab.10 sind die Ergebnisse der linearen Regression für die Freisetzung von M-40 dargelegt.

Tab. 10 Achsenabschnitt *a*, Steigung *k* und quadratischer Korrelationskoeffizient R^2 aus Gl.2 für die Freisetzung von M40 aus PDLLA-Mikrosphären in PBS-Puffer bei 37°C unter Sink-Bedingungen in Abhängigkeit von der theoretischen Beladung und Partikelgröße.

M-40 PDLLA	Theoretische Beladung			
Partikelfraktion	Parameter	17%	13%	9%
100-300 µm	$k \text{ in } d^{-1/2}$	0,40	0,37	0,37
	<i>a</i>	-0,272	-0,244	-0,234
	R^2	0,9906	0,9969	0,9963
300-710 µm	$k \text{ in } d^{-1/2}$	0,36	0,33	0,37
	<i>a</i>	-0,277	-0,189	-0,246
	R^2	0,9919	0,9993	0,9915

Die Korrelationskoeffizienten ergeben Werte zwischen 0,9906 für den 17 %-Ansatz der Partikelfraktion von 100-300 µm und 0,9993 für den 13 %-Ansatz der Partikelfraktion 300-710 µm der mit M-40 beladenen Mikrosphären. Die *lag*-Zeiten wurden gemäß

$$t_{lag} = \left(\frac{a}{k} \right)^2 \quad \text{Gl.3}$$

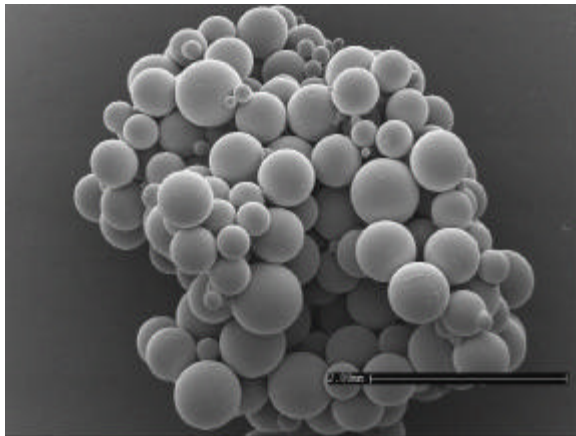
berechnet und sind in Tab. 11 zusammengefasst.

Tab. 11 *Lag*-Zeiten in Tagen für die Freisetzung von M-40 aus PDLLA-Mikrosphären die nach Gl.3 berechnet wurden.

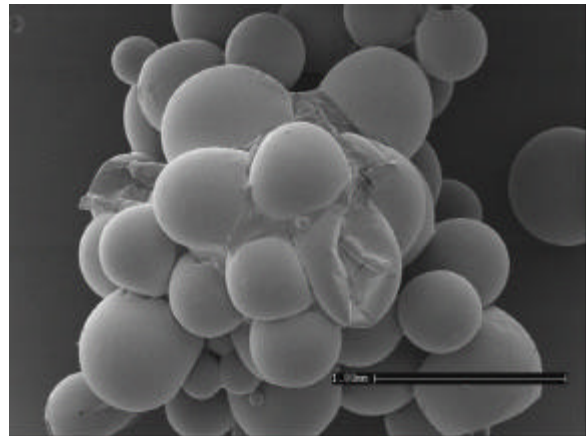
$t_{lag} \text{ in } d$	Theoretische Beladung		
Partikelfraktion	17%	13%	9%
100-300 µm	0,47	0,44	0,34
300-710 µm	0,58	0,57	0,42

Es sind zwei Tendenzen erkennbar. Mit steigender theoretischer Beladung und steigendem Durchmesser der Sphären nimmt die *lag*-Zeit zu. Das unterschiedliche Oberflächen/Volumen-Verhältnis kann für die kürzeren *lag*-Zeiten der kleineren Sphären verantwortlich gemacht werden, da diese schneller Wasser aufnehmen als die großen. Die hohe Beladung der PDLLA-Sphären mit einer hydrophoben Substanz wirkt einer Quellung entgegen. Die berechneten *lag*-Zeiten korrelieren gut mit den in Abb. 15 gezeigten praktischen Beladungen, die mit zunehmender theoretischer Beladung und mit steigender Partikelgröße eine zunehmende praktische Beladung aufweisen.

Bei einer Betrachtung der Steigungen ist zu sehen, dass sie sehr dicht beisammen liegen. Die Inkorporation von M-40 in PDLLA-Mikrosphären führt zu Glasübergangstemperaturen nahe 37°C. Die Freisetzung von M-40 aus PDLLA-Mikrosphären findet bei 37°C statt und liegt im Bereich der Glasübergangstemperatur der PDLLA-Sphären. Die Sphären neigen dazu, Agglomerate zu bilden. In Abb. 29 sind solche Agglomerate für den 9 %-Ansatz nach 12 h und nach 19 Tagen gezeigt.



a) nach 12 Stunden
 μ -Balken = 2.00 mm



b) nach 19 Tagen
 μ -Balken = 1.00 mm

Abb. 29 Agglomerate von M-40 beladenen PDLLA- Mikrosphären des 9 %-Ansatzes mit der Partikelfraktion von 300-710 μ m nach 12 h (a) und nach 21 Tagen (b) in PBS-Puffer bei 37°C unter Sink-Bedingungen.

Durch Zufuhr leichter mechanischer Energie lässt sich die Agglomeration wieder rückgängig machen, was aber mit zunehmender Verweilzeit im Freisetzungsmedium schwieriger wird. Durch eine Agglomeration der Mikrosphären wird die vom Freisetzungsmedium zugängliche Oberfläche verringert. Die gebildeten Agglomerate aus M-40 beladenen Mikrosphären können die Modellsubstanz nur über die dem Lösungsmittel zugängliche Oberfläche freisetzen. Wegen der Agglomeration der Sphären ist bei der Freisetzung von M-40 aus den Agglomeraten in PBS-Puffer keine deutliche Abhängigkeit von der Sphären-Teilchengröße zu beobachten. Unter Berücksichtigung des *lag*-Effekts kann auch bei der Freisetzung von M-40 aus PDLLA-Mikrosphären in PBS-Puffer von einer diffusionsgesteuerten Freisetzung ausgegangen werden.

3.3 Freisetungsverhalten der Modellsubstanzen auf Basis unterschiedlich substituierter Benzophenone aus Poly-(D,L-lactid)-co-PEO-co-poly-(D,L-lactid)-Mikrosphären

Die Freisetzung der unterschiedlich hydrophil/hydrophoben Modellsubstanzen DS-49, D-50 und M-40 aus Poly-(D,L-lactid)-co-PEO-co-poly-(D,L-lactid)-Mikrosphären (ABA-Mikrosphären) wurde in gleicher Weise untersucht, wie die Freisetzungen der Modellsubstanzen aus PDLLA-Mikrosphären.

3.3.1 Freisetzung von 2,2'-Dihydroxy-4,4'-dimethoxybenzophenon-5,5'-dinatriumsulfonat (Uvinul DS-49™)

Die relativen Freisetzungen der hydrophilen Modellsubstanz DS-49 sind in Abb. 30 zusammen mit den entsprechenden relativen Freisetzungsraten gezeigt.

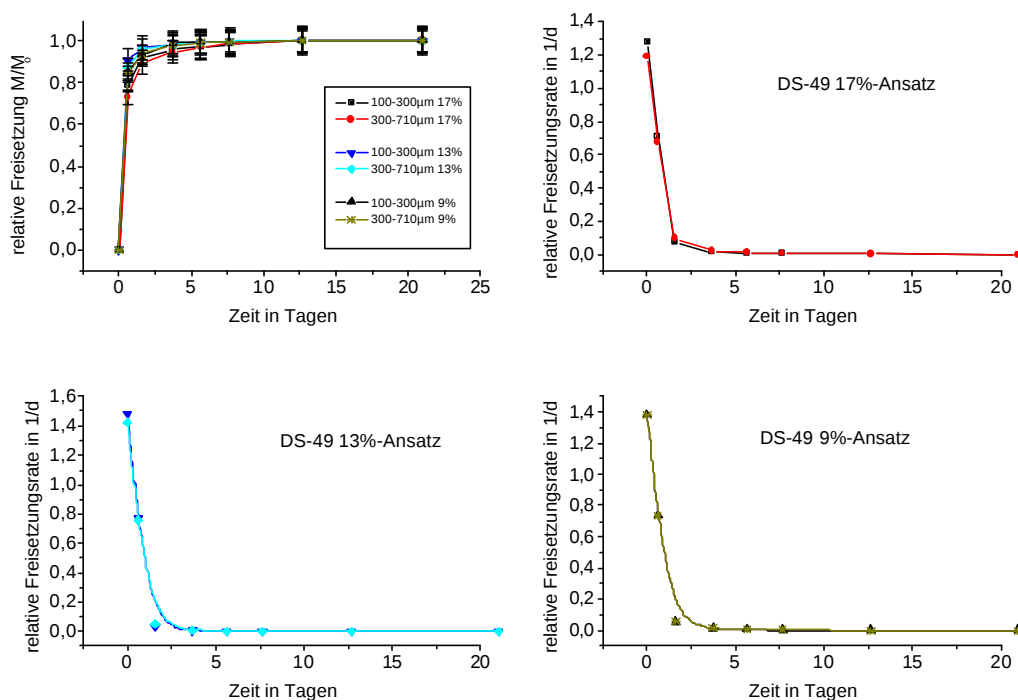


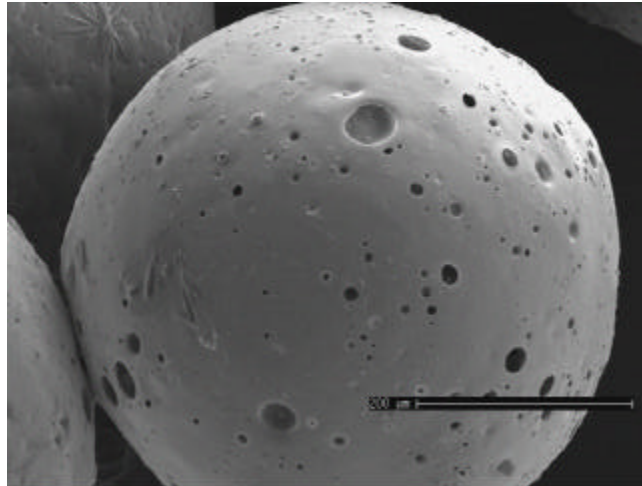
Abb. 30 Relative, kumulative Freisetzung von DS-49 aus ABA-Mikrosphären in Abhängigkeit von ihrer Beladung und Partikelgröße bei 37°C in PBS-Puffer unter Sink-Bedingungen und entsprechende relative Freisetzungsraten.

Die Freisetzungsraten zeigen für alle Partikelfractionen eine schnelle zeitliche Abnahme, was auf einen *burst*-Effekt hindeutet. Im Gegensatz zur Freisetzung von DS-49 aus den PDLLA-Sphären kann bei der Freisetzung von DS-49 aus ABA-Mikrosphären keine Ausbildung eines Maximums für die Partikelfraction 300-710 μm gefunden werden. Der hydrophile PEO-Block ermöglicht ein schnelleres Eindringen von Wasser in die ABA-Sphären im Vergleich zu PDLLA-Mikrosphären. Durch eine höhere Wasseraufnahme der Matrix können innerhalb kurzer Zeit große Mengen an Wirkstoff gelöst und freigesetzt werden^{80,81}. In Tab. 12 sind die anfänglichen relativen Freisetzungsraten aus Abb. 30 zusammengefasst.

Tab. 12 Anfängliche relative Freisetzungsraten f_0 zur Zeit $t=0$ für die Freisetzung von DS-49 aus ABA-Mikrosphären in Abhängigkeit von ihrer Partikelgröße und theoretischen Beladung.

DS-49 ABA f_0 in d^{-1}	Theoretische Beladung		
Partikelfraction	17%	13%	9%
100-300 μm	1,274	1,477	1,381
300-710 μm	1,191	1,422	1,379

Die anfänglichen relativen Freisetzungsraten zeigen keine ausgeprägte Abhängigkeit von der Partikelgröße und der theoretischen Beladung. Im Vergleich zur Freisetzung von DS-49 aus PDLLA-Sphären werden bei der Freisetzung von DS-49 aus ABA-Mikrosphären in PBS-Puffer höhere Raten gefunden, was durch eine stärkere Quellung des ABA-Polymers im Vergleich zu PDLLA begründet werden kann. In Abb. 31 ist eine mit DS-49 beladene ABA-Mikrosphäre des 13 %-Ansatzes der Partikelfraction von 300-710 μm gezeigt



µ-Balken = 200 µm

Abb. 31 REM-Aufnahme einer einzelnen mit DS-49 beladenen ABA-Mikrosphäre der Partikelfraktion 300-710 µm des 13 %-Ansatzes.

DS-49 beladene ABA-Mikrosphären zeigen eine porenreiche Oberfläche. Wegen der hydrophilen Natur von DS-49 liegt die Modellschubstanz suspendiert in den Mikrosphären vor. Während der Freisetzung von DS-49 aus ABA-Mikrosphären in PBS-Puffer dringt Wasser in die Poren und Kanäle ein und löst die in den Sphären befindlichen DS-49 Partikel auf. Die Freisetzung der hydrophilen Modellschubstanz aus ABA-Mikrosphären zeigt den gleichen Freisetzungsmechanismus wie die Freisetzung von DS-49 aus PDLLA-Mikrosphären.

Die praktischen und virtuellen Beladungen der mit DS-49 beladenen ABA-Mikrosphären sind in Abb. 32 graphisch dargestellt.

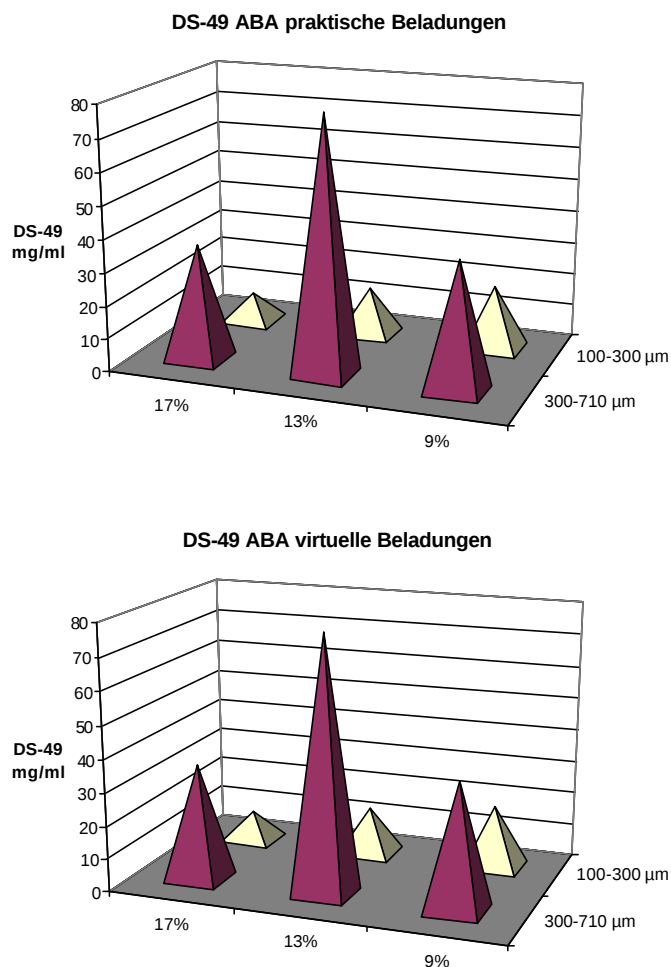


Abb. 32 Praktische und virtuelle Beladungen der mit DS-49 beladenen ABA-Mikrosphären. Die virtuelle Beladung gibt die bis zum 19. Tag freigesetzte Menge an. Die Werte sind in Milligramm angegeben und beziehen sich auf jeweils ein Gramm eingesetzter Mikrosphären.

Die Werte der praktischen Beladungen der mit DS-49 beladenen ABA-Mikrosphären zeigen jeweils vergleichbare Werte mit den virtuellen Beladungen, was für eine vollständige Freisetzung der inkorporierten Substanz spricht. In Tab. 13 sind die theoretischen, praktischen und virtuellen Beladungen der mit DS-49 beladenen ABA-Mikrosphären zusammen mit den Beladungs- und Freisetzungseffektivitäten einander gegenübergestellt.

Tab. 13 Vergleich der theoretischen, praktischen und virtuellen Beladungen sowie entsprechender Beladungs- und Freisetzungseffektivitäten der mit DS-49 beladenen ABA-Mikrosphären bezogen auf jeweils 1 g Sphären.

DS 49		100-300 µm		300-710 µm	
ABA		in mg/g	in %	in mg/g	in %
Theor. Beladung	9%	91	Beladungs- effektivität	91	Beladungs- effektivität
13%		130		130	
17%		167		167	
Prakt. Beladung	9%	19,	21	39	43
13%		15	12	78	60
17%		9	5	35	21
			Freisetzungs- effektivität		Freisetzungs- effektivität
Virtuelle Beladung	9%	19	100	38	97
13%		15	100	78	100
17%		9	100	35	100

Die praktischen Beladungen der mit DS-49 beladenen ABA-Mikrosphären fallen für die Partikelfraktion von 100-300 µm geringer aus als die der 300-710 µm Sphären. Die geringeren praktischen Beladungen der kleinen Sphären im Vergleich zu den großen Sphären können, wie bei den mit DS-49 beladenen PDLLA-Mikrosphären, durch eine Diffusion der Modellschubstanz in die wässrige, kontinuierliche Phase während der Herstellung der Mikrosphären nach der Lösungsmittel-Evaporationsmethode erklärt werden. Wegen des größeren Oberflächen/Volumen-Verhältnisses der 100-300 µm Sphären im Vergleich zu den 300-710 µm Sphären kann aus den kleinen ABA-Sphären mehr DS-49 in die kontinuierliche Phase diffundieren als aus den großen Sphären. Daher zeigen kleine Sphären geringere praktische Beladungen als große Sphären. Wegen der hydrophilen Natur von DS-49 werden analog der Betrachtungen zu den mit DS-49 beladenen PDLLA-Mikrosphären niedrige Beladungseffektivitäten und bei der Freisetzung der Modellschubstanz in PBS-Puffer hohe Freisetzungseffektivitäten bei DS-49 beladenen ABA-Mikrosphären gefunden.

3.3.2 Freisetzung von 2,2',4,4'-Tetrahydroxybenzophenon (Uvinul D-50™)

In Abb. 33 ist das Freisetzungsverhalten von D-50 aus ABA-Mikrosphären in Abhängigkeit von der theoretischen Beladung und der Partikelgröße sowie die entsprechenden relativen Freisetzungsraten gezeigt.

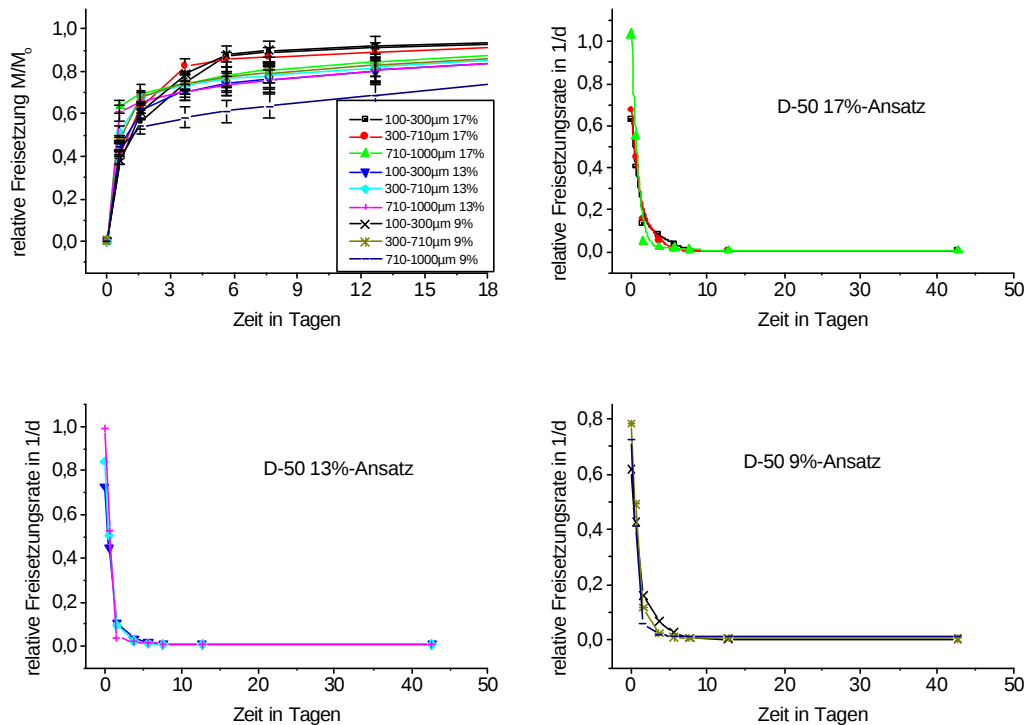


Abb. 33 Relative, kumulative Freisetzung von D-50 aus ABA-Mikrosphären in Abhängigkeit von ihrer Beladung und Partikelgröße bei 37°C in PBS-Puffer unter Sink-Bedingungen und entsprechende relative Freisetzungsraten.

Die relativen Freisetzungsraten fallen für alle Freisetzung von D-50 aus ABA-Mikrosphären in PBS-Puffer schnell ab. Die anfänglichen Freisetzungsraten sind in Tab. 14 zusammengestellt.

Tab. 14 Anfängliche relative Freisetzungsraten f_0 zur Zeit $t=0$ für die Freisetzung von D-50 aus ABA-Mikrosphären in Abhängigkeit von ihrer Partikelgröße und theoretischen Beladung.

D-50 ABA f_0 in d^{-1}	Theoretische Beladung		
Partikelfraktion	17%	13%	9%
100-300 μm	0,629	0,726	0,616
300-710 μm	0,673	0,842	0,784
710-1000 μm	1,031	0,990	0,723

Für den 17- und 13%-Ansatz werden mit $1,031 d^{-1}$ und $0,990 d^{-1}$ die höchsten anfänglichen Freisetzungsraten für die Partikelfraktion von 710-1000 μm gefunden. Die niedrigsten anfänglichen Freisetzungsraten werden für alle Ansätze bei der Partikelfraktion 100-300 μm gefunden. Somit zeigen die mit D-50 beladenen ABA-Mikrosphären ein ähnliches Verhalten wie die entsprechenden PDLLA-Mikrosphären, wo auch die Tendenz beobachtet wird, dass kleine Sphären langsamer freisetzen als große. In Abb 34 sind REM-Aufnahmen einzelner D-50 beladener Sphären des 17 %-Ansatzes gezeigt.

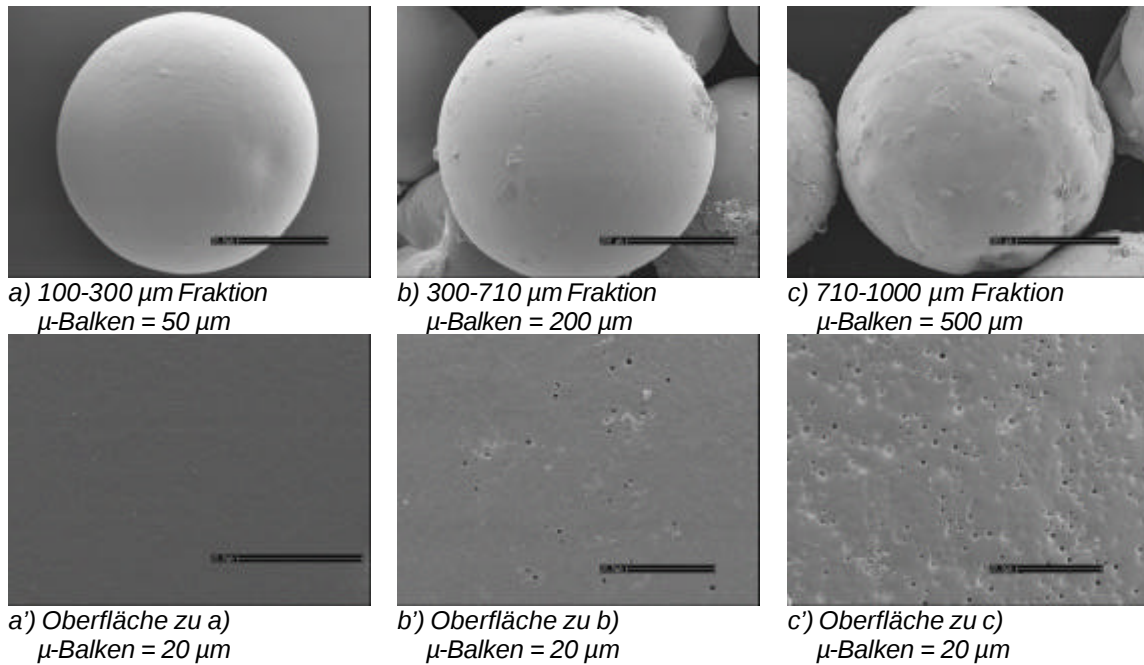


Abb 34 REM-Aufnahmen einzelner Sphären der Partikelfraktion 100-300 µm (a), 300-710 µm (b) und 710-1000 µm (c) des 17%-Ansatzes der mit D-50 beladenen ABA-Mikrosphären und jeweils dazugehöriger Oberflächenanschnitt.

Die Sphären zeigen eine recht einheitliche Oberflächenbeschaffenheit. Eine Betrachtung mit höherer Auflösung ergibt, dass die Sphären der Partikelfraktion von 300-710 µm und 710-1000 µm mit Poren versehen sind. Die Anzahl der Poren pro Sphären nimmt mit steigendem Radius zu. Da durch die Poren und Kanäle der Partikelfraktionen 300-710 µm und 710-1000 µm eine Diffusion der inkorporierten Stoffe wegen einer höheren Wasseraufnahme der Matrix schneller stattfinden kann als bei den Sphären der 100-300 µm Fraktion, die eine glatte homogene Oberfläche besitzen, kann das Freisetungsverhalten von D-50 aus den ABA-Sphären erklärt werden. Analoge Betrachtungen wurden bereits zu den mit D-50 beladenen PDLLA-Mikrosphären dargestellt. Die praktischen und virtuellen Beladungen der mit D-50 beladenen ABA-Mikrosphären sind in Abb. 35 gezeigt.

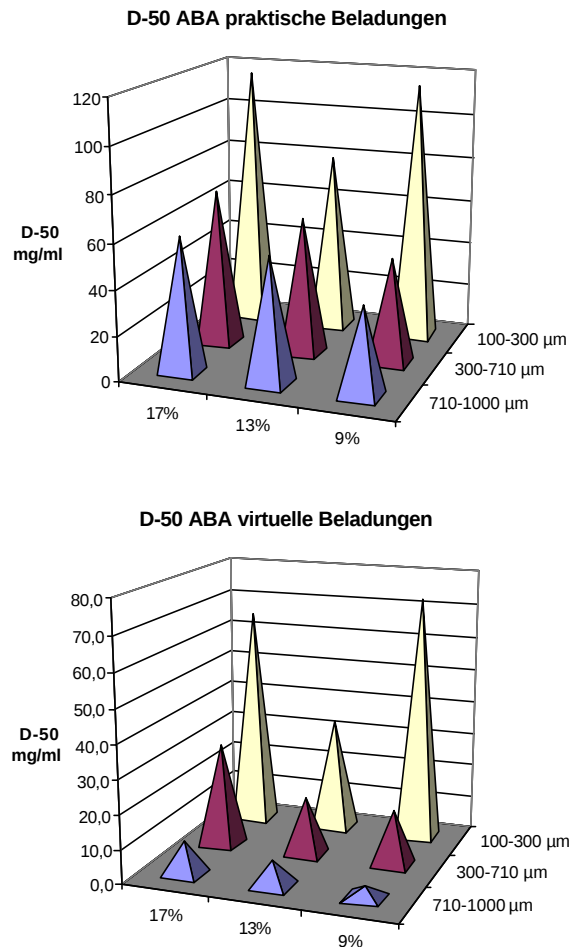


Abb. 35 Praktische und virtuelle Beladungen der mit D-50 beladenen ABA-Mikrosphären. Die virtuelle Beladung gibt die bis zum 19. Tag freigesetzte Menge an. Die Werte sind in Milligramm angegeben und beziehen sich auf jeweils ein Gramm eingesetzter Mikrosphären.

Die Partikelfraktion 100-300 µm weist die höchsten praktischen Beladungen auf. Mit zunehmendem Radius der Sphären sinkt die praktische Beladung. Bei der virtuellen Beladung können die gleichen Tendenzen festgestellt werden wie bei der praktischen Beladung. In Tab. 15 sind praktische, theoretische und virtuelle Beladungen einander gegenübergestellt.

Tab. 15 Vergleich der theoretischen, praktischen und virtuellen Beladungen sowie entsprechender Beladungs- und Freisetzungseffektivitäten der mit D-50 beladenen ABA-Mikrosphären bezogen auf jeweils 1 g Sphären.

D-50 ABA		100-300 µm		300-710 µm		710-1000 µm	
		in mg/g	in %	in mg/g	in %	in mg/g	in %
Theor. Beladung	9%	91	Beladungs- effektivität	91	Beladungs - effektivität	91	Beladungs- effektivität
	13%	130		130		130	
	17%	167		167		167	
Prakt. Beladung	9%	115	126	47	52	39	43
	13%	80	62	61	47	56	43
	17%	116	69	70	42	60	36
			Freisetzung- effektivität		Freisetzung- effektivität		Freisetzung- effektivität
Virtuelle Beladung	9 %	73	63	16	34	3	8
	13%	34	43	18	30	8	14
	17%	65	56	31	44	10	17

Die Beladungseffektivität des 9 %-Ansatzes mit der Partikelfraktion 100-300 µm ergibt mit 126 % einen höheren Wert für die praktische Beladung als die theoretische Beladung zulässt. Für die Herstellung der mit D-50 beladenen ABA-Mikrosphären nach der Lösungsmittel-Evaporationsmethode wurde analog der Herstellung von D-50 beladenen PDLLA-Mikrosphären verfahren. Die Betrachtungen bezüglich der praktischen Beladung, welche zu D-50 beladenen PDLLA-Mikrosphären aufgeführt wurden, gelten auch bei den D-50 beladenen ABA-Mikrosphären.

3.3.3 Freisetzung von 2-Hydroxy-4-methoxybenzophenon (Uvinul M-40™)

Das Freisetzungsverhalten von M-40 aus den ABA-Mikrosphären ist zusammen mit den entsprechenden relativen Freisetzungsraten in Abb. 36 dargestellt.

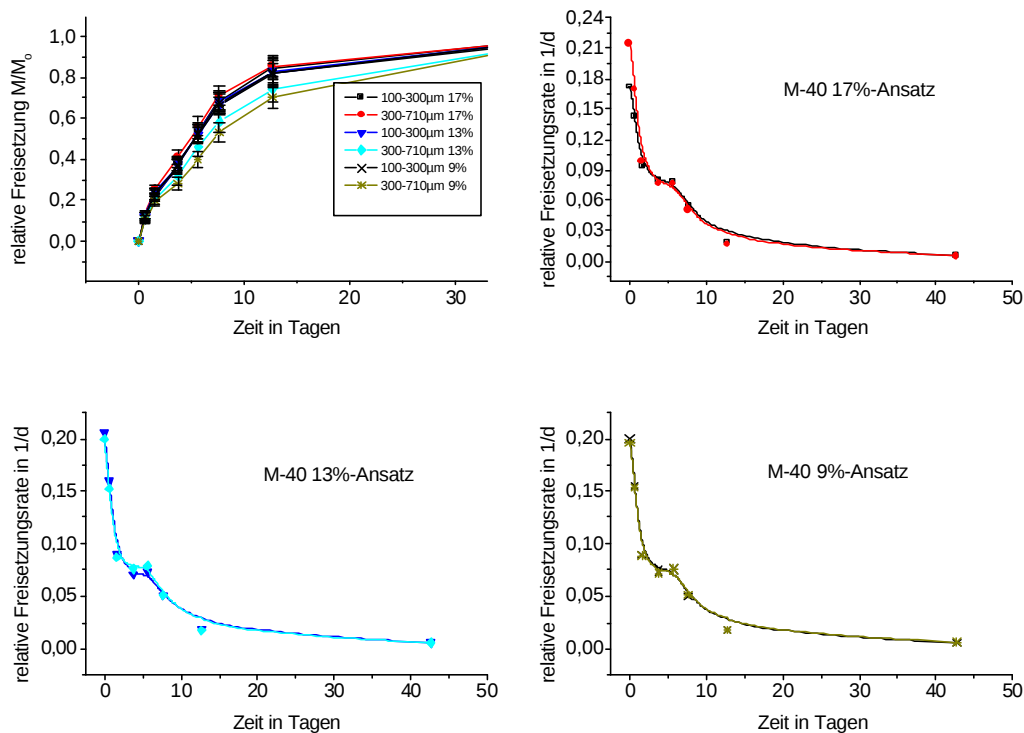


Abb. 36 Relative, kumulative Freisetzung von M-40 aus ABA-Mikrosphären in Abhängigkeit von ihrer Beladung und Partikelgröße bei 37°C in PBS-Puffer unter Sink-Bedingungen.

Die relativen Freisetzungskurven für die Freisetzung von M-40 aus ABA-Mikrosphären in PBS-Puffer unterscheiden sich wenig und liegen alle in einem engen Bereich. Die relativen Freisetzungsraten weisen für alle Experimente eine „Schulter“ auf. Im Gegensatz zu der Freisetzung von M-40 aus PDLLA-Mikrosphären findet bei der Freisetzung aus den ABA-Mikrosphären eine zeitliche Abnahme der relativen Freisetzungsrates statt, die nach etwa 5 Tagen zur Ausbildung der Schulter führt. Die anfänglichen relativen Freisetzungsraten sind in Tab. 16 dargestellt.

Tab. 16 Anfängliche relative Freisetzungsraten f_0 zur Zeit $t = 0$ d für die Freisetzung von M-40 aus ABA-Mikrosphären in Abhängigkeit von ihrer Partikelgröße und theoretischen Beladung.

M-40 ABA f_0 in d ⁻¹	Theoretische Beladung		
Partikelfraktion	17%	13%	9%
100-300 µm	0,172	0,205	0,200
300-710 µm	0,215	0,200	0,196

Ähnlich der Freisetzung von M-40 aus den PDLLA-Mikrosphären in PBS-Puffer liegen auch die anfänglichen relativen Freisetzungsraten für die Freisetzung von M-40 aus ABA-Mikrosphären in PBS-Puffer in einem engen Bereich um 0,2 d⁻¹, wobei der hydrophile PEO-Block schnellere Freisetzungsraten bewirkt als bei den PDLLA-Mikrosphären. Abb. 37 zeigt die praktischen und virtuellen Beladungen der M-40 beladenen ABA-Mikrosphären.

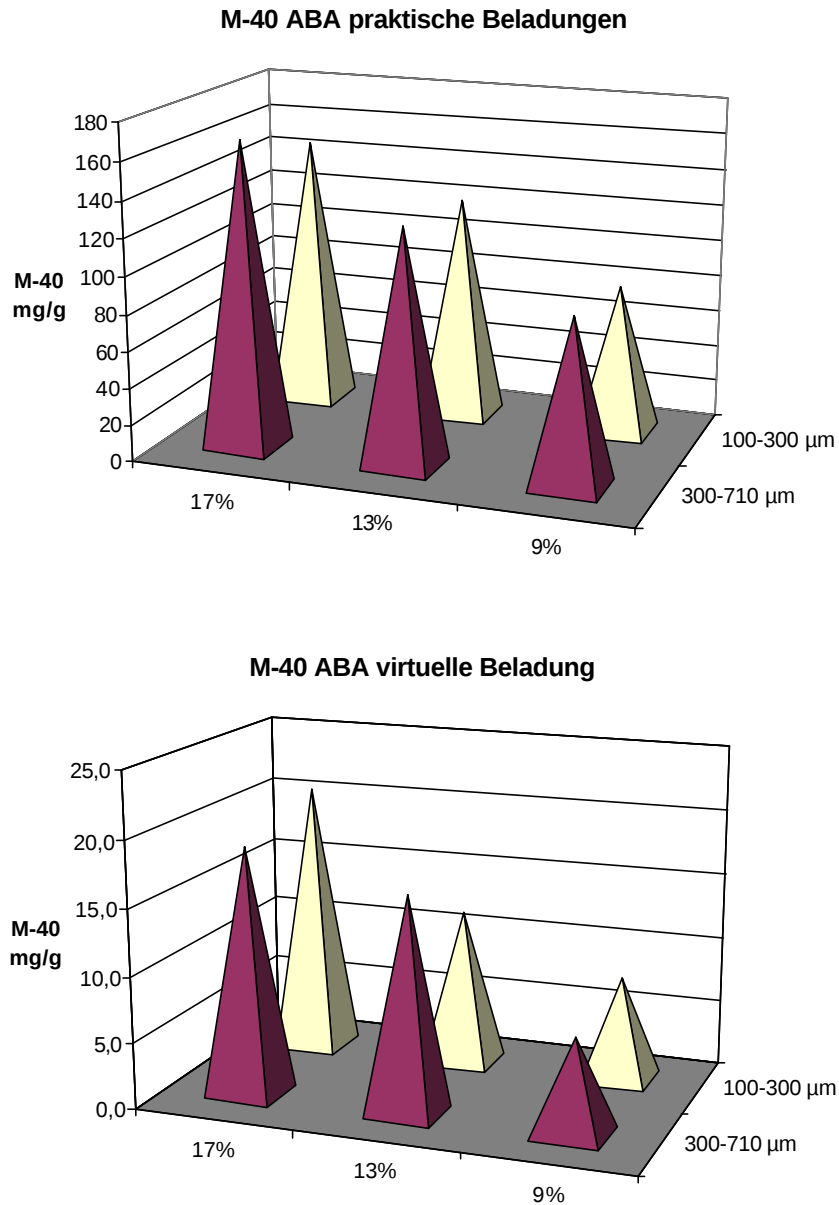


Abb. 37 Praktische und virtuelle Beladungen der mit M-40 beladenen ABA-Mikrosphären. Die virtuelle Beladung gibt die bis zum 19. Tag freigesetzte Menge an. Die Werte sind in Milligramm angegeben und beziehen sich auf jeweils ein Gramm eingesetzter Mikrosphären.

Es fällt auf, dass die praktischen Beladungen der mit M-40 beladenen ABA-Mikrosphären mit steigender theoretischer Beladung und steigendem Radius der Sphären zunehmen. Eine ähnliche Tendenz ist für die virtuelle Beladung zu beobachten.

Für den 17 %igen Ansatz mit der Partikelfraktion von 300-710 µm wird mit 166 mg/g Sphären die höchste praktische Beladung gefunden, wie aus Tab. 17 zu entnehmen ist.

Tab. 17 Vergleich der theoretischen, praktischen und virtuellen Beladungen sowie entsprechender Beladungs- und Freisetzungseffektivitäten der mit M-40 beladenen ABA-Mikrosphären bezogen auf jeweils 1 g Sphären.

M 40 ABA		100-300 µm		300-710 µm	
		in mg/g	in %	in mg/g	in %
Theor. Beladung	9%	91	Beladungs- effektivität	91	Beladungs- effektivität
	13%	130		130	
	17%	167		167	
Prakt. Beladung	9%	81	89	90	99
	13%	122	94	128	98
	17%	148	89	166	99
		Freisetzungs- effektivität		Freisetzungs- effektivität	
Virtuelle Beladung	9%	8	10	7	8
	13%	12	10	16	13
	17%	21	14	19	11

Die Beladungseffektivitäten der M-40 beladenen ABA-Mikrosphären für den untersuchten Bereich nehmen ebenfalls mit steigendem Radius der Sphären zu. Wegen der hydrophoben Natur der Modellschubstanz werden, wie auch bei den PDLLA-Mikrosphären, hohe praktische und geringe virtuelle Beladungen gefunden. Die Betrachtungen, die zu M-40 beladenen PDLLA-Mikrosphären aufgeführt wurden, gelten auch bei den M-40 beladenen ABA-Mikrosphären.

3.3.4 Abbauverhalten von Poly-(D,L-lactid)-co-PEO-co-poly-(D,L-lactid)- Mikrosphären in Abhängigkeit von den inkorporierten Modellsubstanzen

In Abb. 38 ist der Massenverlust der mit DS-49 beladenen ABA-Mikrosphären im Vergleich zur unbeladenen Probe während der Verweilzeit von 100 Tagen in PBS-Puffer bei 37°C unter Sink-Bedingungen gezeigt.

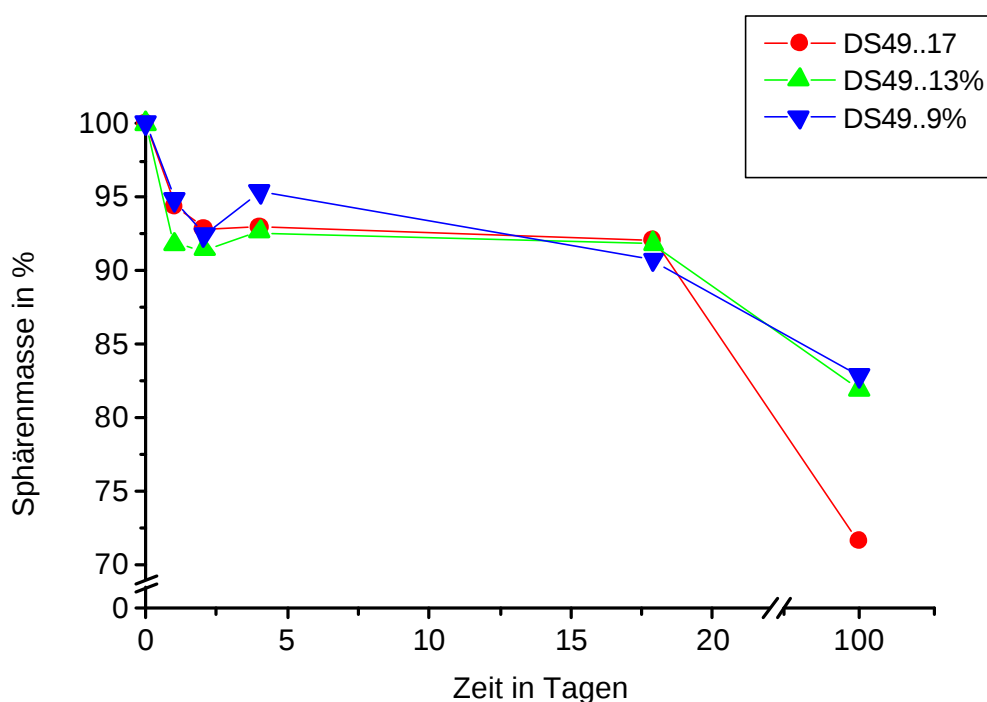


Abb. 38 Massenverlust der mit DS-49 beladenen ABA-Mikrosphären der Partikelfraktion von 300-710 µm während des Freisetzungsexperiments in PBS-Puffer bei 37°C unter Sink-Bedingungen.

Innerhalb von 18 Tagen im FreisetzungsmEDIUM findet ein geringer Massenverlust der mit DS-49 beladenen ABA-Mikrosphären statt. Die Mikrosphären des 17 und 13 %-Ansatzes verlieren 8 % und die des 9 %-Ansatzes verlieren 9 % ihrer Masse. Nach 100 Tagen haben die Mikrosphären des 17 %-Ansatzes 28 %, die des 13 %-Ansatzes 18 % und die des 9 %-Ansatzes 17 % ihrer Masse verloren. Der Massenverlust während der ersten 18 Tage kann mit der Freisetzung der Modellsubstanz wie folgt erklärt werden.

Im Gegensatz zu den DS-49 beladenen PDLLA-Mikrosphären zeigen die DS-49 beladenen ABA-Mikrosphären nach 100 Tagen einen deutlichen Massenverlust. Die Diffusion von niedermolekularen, wasserlöslichen Degradationsprodukten der Hydrolyse der Polylactid-Blöcke des ABA-Polymers aus den Sphären in den PBS-Puffer haben zu dem Massenverlust geführt. Wegen der größeren Wasseraufnahme des ABA-Polymers im Vergleich zum PDLLA^{87, 88} während der Verweilzeit in PBS-Puffer findet in den ABA-Sphären ein stärkerer Abbau statt als in den PDLLA-Sphären, die nach 100 Tagen Verweilzeit in PBS-Puffer noch keine Erosion zeigen. In Abb. 39 wird der Massenverlust der mit D-50 beladenen ABA-Mikrosphären dargestellt.

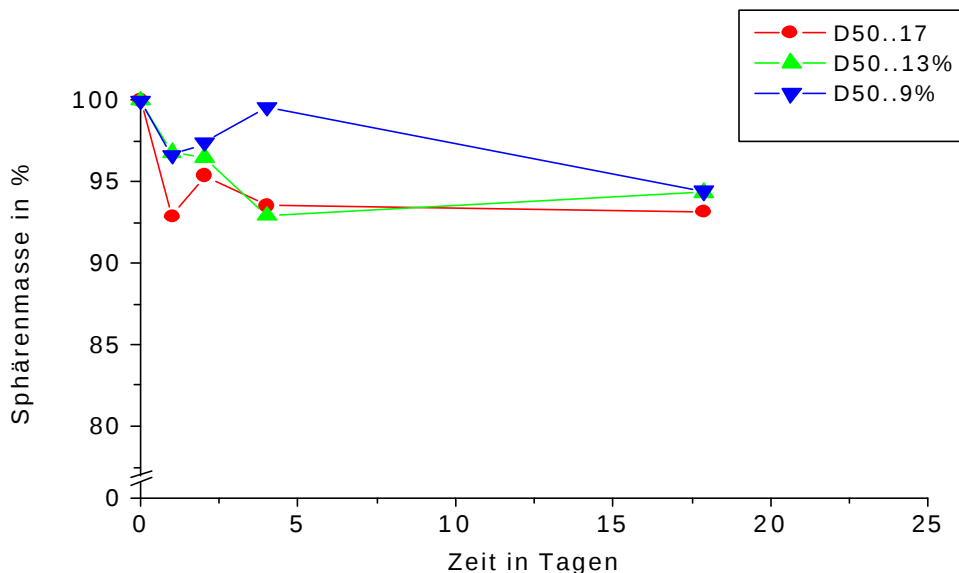


Abb. 39 Massenverlust der mit D-50 beladenen ABA-Mikrosphären der Partikelfraktion von 300-710 μm während des Freisetzungsexperiments in PBS-Puffer bei 37°C unter Sink-Bedingungen.

Der Massenverlust der mit D-50 beladenen ABA-Mikrosphären während der ersten 18 Tage im Freisetzungsmittel beträgt 7 % für den 17 %-Ansatz und jeweils 6 % für den 13 und 9 %-Ansatz. Die 100 Tage-Werte für den Massenverlust der D-50 beladenen ABA-Mikrosphären können nicht bestimmt werden, da der Abbau der polymeren Matrix nach 100 Tagen so weit fortgeschritten ist, dass keine Sphären mehr, sondern nur noch viskose Massen vorgefunden werden. In Abb. 40 ist der Massenverlust der mit M-40 beladenen ABA-Mikrosphären gezeigt.

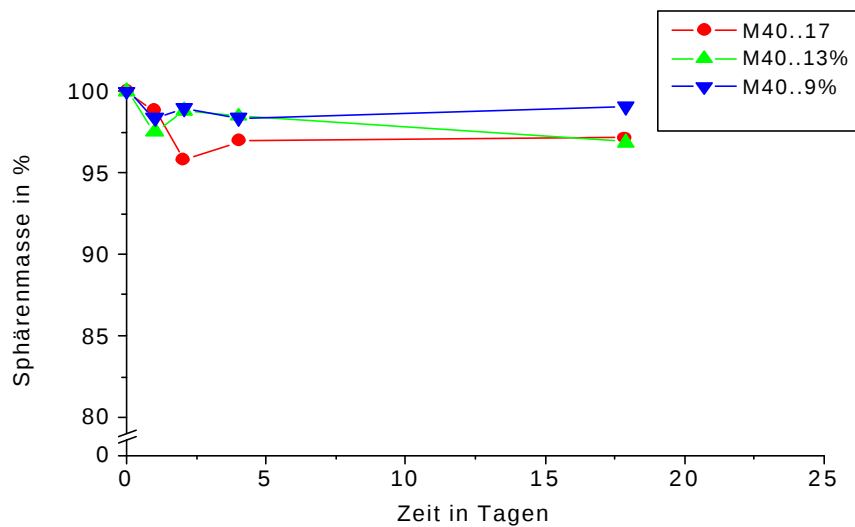


Abb. 40 Massenverlust der mit M-40 beladenen ABA-Mikrosphären der Partikelfraktion von 300-710 μm während des Freisetzungsexperiments in PBS-Puffer bei 37°C unter Sink-Bedingungen.

Nach 18 Tagen Verweilzeit der Sphären in PBS-Puffer verlieren die M-40 beladenen ABA-Mikrosphären des 17 und 13 %-Ansatzes 3 % ihrer Masse und die Mikrosphären des 9 %-Ansatzes 1 % ihrer Masse. Wie auch bei den D-50 beladenen ABA-Mikrosphären kann kein 100 Tage-Wert für den Massenverlust bestimmt werden. Die Mikrosphären sind nach 100 Tagen Verweilzeit in PBS-Puffer so weit abgebaut, dass nur noch viskose, zähe Massen vergefunden werden.

Für die Beurteilung der Erosion der Mikrosphären, also die durch Hydrolyse hervorgerufene Gewichtsabnahme der Sphären, wird der durch Wirkstofffreisetzung bedingte Massenverlust berücksichtigt und zu der jeweils gemessenen Masse addiert (Abb.41).

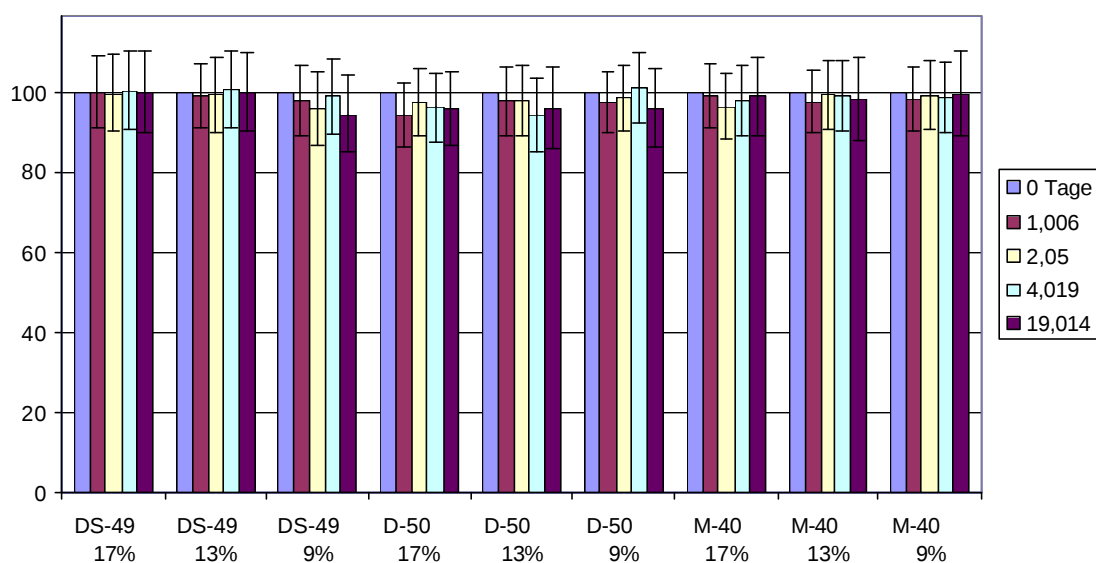
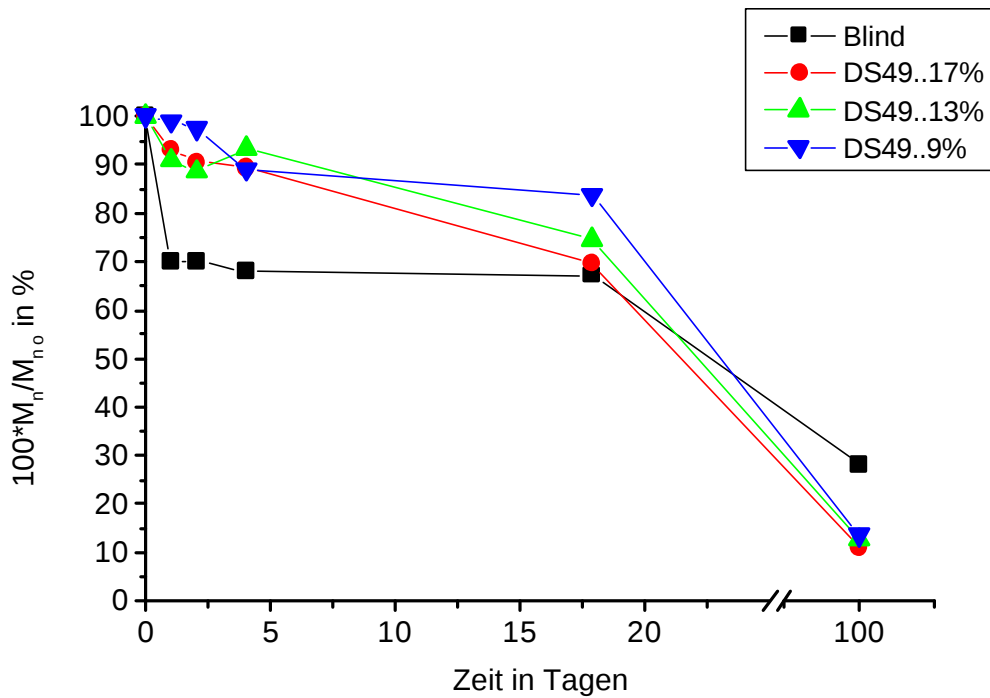


Abb. 41 Reine Erosion der ABA-Mikrosphären der Partikelfraktion von 300-710 μm während der ersten drei Wochen in PBS-Puffer bei 37°C unter Sink-Bedingungen, wobei die jeweils freigesetzte Menge an Modellsubstanz zu der Sphärenmasse addiert wurde.

Der abgeschätzte Fehlerbereich von 7 % für die Massenbestimmung und der Fehler bei der UV-spektroskopischen Bestimmung der jeweils freigesetzten Modellsubstanz ist bei der Darstellung der Erosion in Abb. 41 berücksichtigt worden. Der Massenverlust der ABA-Mikrosphären, welcher allein durch Erosion hervorgerufen wird, kann während der ersten 19 Tage im Freisetzungsmedium vernachlässigt werden. Der Massenverlust der ABA-Mikrosphären während der ersten 19 Tage im Freisetzungsmedium kann mit der jeweiligen Freisetzung der Modellsubstanz erklärt werden.

Die Degradation des ABA-Triblockcopolymer in Gegenwart von DS-49 ist in Abb. 42 gezeigt.



.Abb. 42 Degradationsverhalten der mit DS-49 beladenen ABA-Mikrosphären der Partikelfraktion von 300-710 μm während des Freisetzungsexperiments in PBS-Puffer bei 37°C unter Sink-Bedingungen.

Die DS-49 beladenen ABA-Sphären bauen während der ersten 19 Tage langsamer ab als die Blindprobe. Nach 19 Tagen im Freisetzungsexperiment zeigen die beladenen Sphären einen Molekulargewichtsabbau von maximal 30 % für den 17 %-Ansatz und minimal 16% für den 9 %-Ansatz.

Die Degradation des ABA-Triblockcopolymers in Gegenwart von D-50 ist in Abb. 43 gezeigt.

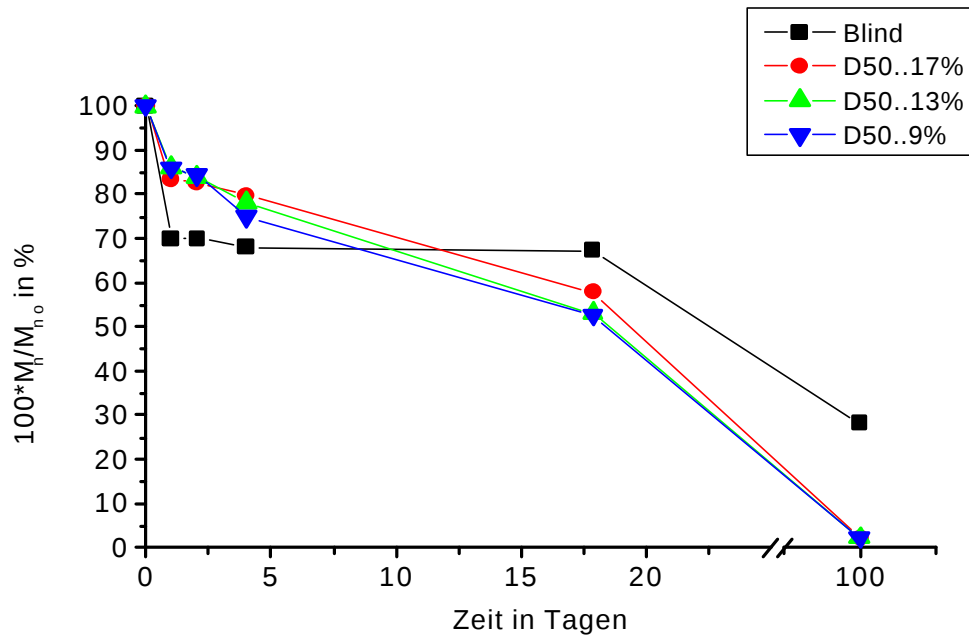


Abb. 43 Degradationsverhalten der mit D-50 beladenen ABA-Mikrosphären der Partikelfraktion von 300-710 μm während des Freisetzungsexperiments in PBS-Puffer bei 37°C unter Sink-Bedingungen.

Der Abbau verläuft bei den D-50 beladenen ABA-Mikrosphären schneller als bei den DS-49 beladenen Sphären. Nach 18 Tagen hat das Molekulargewicht in allen drei Fällen um mehr als 40 % abgenommen; damit ist der Abbau höher als der der Blindprobe, die nach 18 Tagen einen Molekulargewichtsabbau von 33 % zeigt. In Abb. 44 ist der Abbau in Gegenwart der hydrophoben Modellschubstanz M-40 dargestellt.

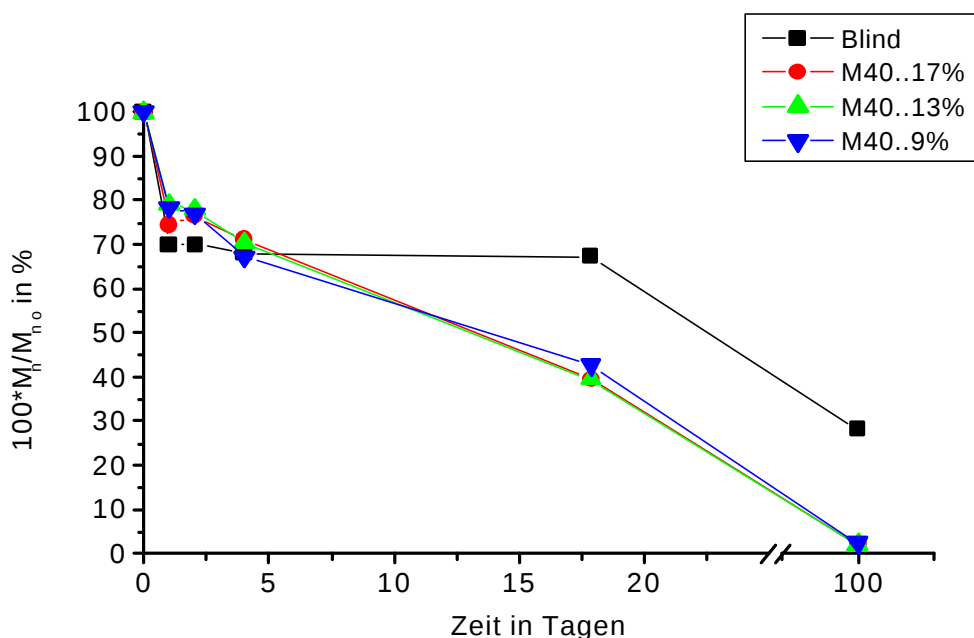


Abb. 44 Degradationsverhalten der mit M-40 beladenen ABA-Mikrosphären der Partikelfraktion von 300-710 μm während des Freisetzungsexperiments in PBS-Puffer bei 37°C unter Sink-Bedingungen.

Die Degradation des ABA-Polymers verläuft sehr gleichmäßig für alle drei Ansätze der mit M-40 beladenen Mikrosphären und zeigt kaum Unterschiede in Abhängigkeit von der theoretischen Beladung. Nach 19 Tagen wird ein minimaler Rückgang des Molekulargewichtes von 57 % für den 9 %-Ansatz beobachtet und ein maximaler Rückgang von 60 % für den 13 %-Ansatz.

Das Degradationsverhalten der ABA-Mikrosphären in Gegenwart der verschiedenen Modellsubstanzen ist mit dem der PDLLA-Mikrosphären vergleichbar. Der schnellste Abbau findet statt, wenn die hydrophobe Modellsubstanz inkorporiert ist und der langsamste, wenn die hydrophile Substanz freigesetzt wird. DS-49 beladene ABA-Mikrosphären sind sehr porenreich. D-50 beladene ABA-Mikrosphären zeigen auch noch Poren, welche aber kleiner und weniger dicht auf der Sphärenoberfläche verteilt sind als bei den DS-49 beladenen ABA-Mikrosphären. M-40 beladene ABA-Mikrosphären besitzen eine glatte Oberfläche. In Analogie zu der Betrachtung des Degradationsverhaltens der mit den unterschiedlich hydrophil/hydrophoben Modellsubstanzen beladenen PDLLA-Mikrosphären kann mit Hilfe der Autokatalyse der Hydrolyse des ABA-Polymers das Degradationsverhalten erklärt werden. Der

Puffer kann ungehindert durch die Poren der DS-49 beladenen ABA-Mikrosphären eindringen und die bei der Hydrolyse entstehenden, auf die Degradation katalytisch wirkenden Protonen, abpuffern. Wegen der kleinen Poren der D-50 beladenen ABA-Mikrosphären ist der Austausch mit dem Puffer stark behindert und in M-40 beladenen ABA-Mikrosphären kann der Puffer nicht in die Sphären eindringen, da keine Poren vorhanden sind. Durch das Polymerbulk eindringende Wassermoleküle führen zu einem ungepufferten Polymerabbau bei den M-40 beladenen ABA-Mikrosphären.

Das thermische Verhalten der ABA-Mikrosphären wurde ebenfalls untersucht. PEO 2000 besitzt $T_m = 50\text{ °C}$ ⁸⁹. Die Anbindung sehr kurzer Polylactid Sequenzen an den PEO-2000 Block, die eine kleinere Kettenlänge als die des PEO-Blocks besitzen, führt zu einer Erniedrigung von T_m des PEO-Blocks⁸⁹. Bei der Anbindung von Polylactidsequenzen mit gleicher Kettenlänge wie der PEO-Block kann kein T_m mehr für den PEO-Block detektiert werden, was mit einer geringeren Kristallisierbarkeit des ABA-Triblockcopolymeres im Vergleich zum PEO begründet werden kann⁸⁹. ABA-Triblockcopolymeres, die aus D,L-Lactid und PEO hergestellt werden besitzen keinen Schmelzpunkt, da die Sequenzen von D- und L-Lactyl-Einheiten nicht kristallisieren⁶⁸. Der PEO-Block ist viel zu klein um im Triblockcopolymer ausreichend große DSC-analytisch messbare Domänen kristalliner Bereiche auszubilden.

Poly-(D,L-lactid) mit einem Molekulargewicht von 100000 besitzt $T_g = 52\text{ °C}$. Das verwendete ABA-Triblockcopolymer besitzt ebenfalls ein Molekulargewicht von $M_n = 100000$, und es wird $T_g = 48\text{ °C}$ gefunden. Die langen Polylactidblöcke bestimmen das thermische Verhalten, wobei der PEO-Block einen geringen Weichmachungseffekt auf die PDLLA-Blöcke ausübt. T_g des PEO-Blocks im ABA-Triblockcopolymer kann wegen der zu geringen Kettenlänge des PEO's nicht detektiert werden. Die DSC-analytisch bestimmten Glastemperaturen des ABA-Triblockcopolymeres können dem Polylactidblock zugeordnet werden.

In Abb. 45 ist die Änderung der Glas temperatur der Polylactidblöcke während der Verweilzeit in PBS-Puffer bei 37 °C unter Sink-Bedingungen für unbeladene ABA-Mikrosphären gezeigt.

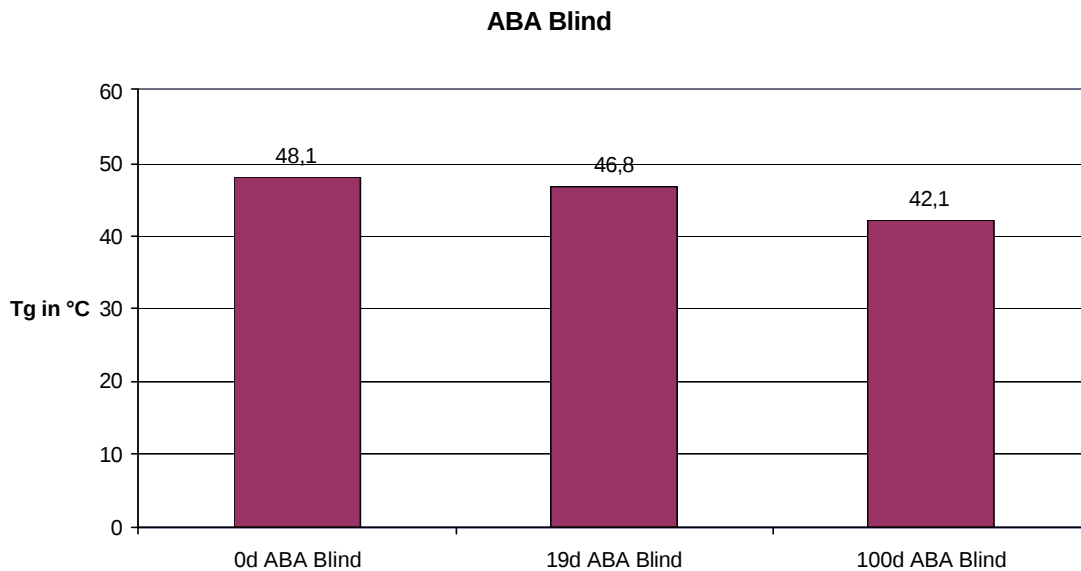


Abb. 45 Glasübergangstemperaturen T_g der Polylactidblöcke ermittelt aus der zweiten Aufheizkurve der DSC-Messung für unbeladene ABA-Mikrosphären der Partikelfraktion 300-710 μm während der Verweilzeit in PBS-Puffer bei 37°C unter Sink-Bedingungen.

Die Polylactid-Glasübergangstemperatur des ABA-Polymers kann für einen Zeitraum von 19 Tagen unter Berücksichtigung der bei der DSC-Messung auftretenden Schwankungen von etwa 5°C als konstant angesehen werden. Obwohl die Blindprobe nach 18 Tagen eine Degradation des Molekulargewichts von 33 % zeigt (vergleiche Abb. 42), wirkt sich dieser Abbau noch nicht auf T_g aus. Nach 100 Tagen beträgt dieser Wert 42,1°C.

Der hydrophile PEO-Block führt dazu, dass im Vergleich zu den PDLLA-Sphären mehr Wasser aufgenommen werden kann, was eine schnellere hydrolytische Degradation im Vergleich zu den unbeladenen PDLLA-Mikrosphären begünstigt.

In Gegenwart von DS-49 wirkt sich der Kettenabbau kaum auf Tg aus, wie in Abb. 46 zu erkennen ist.

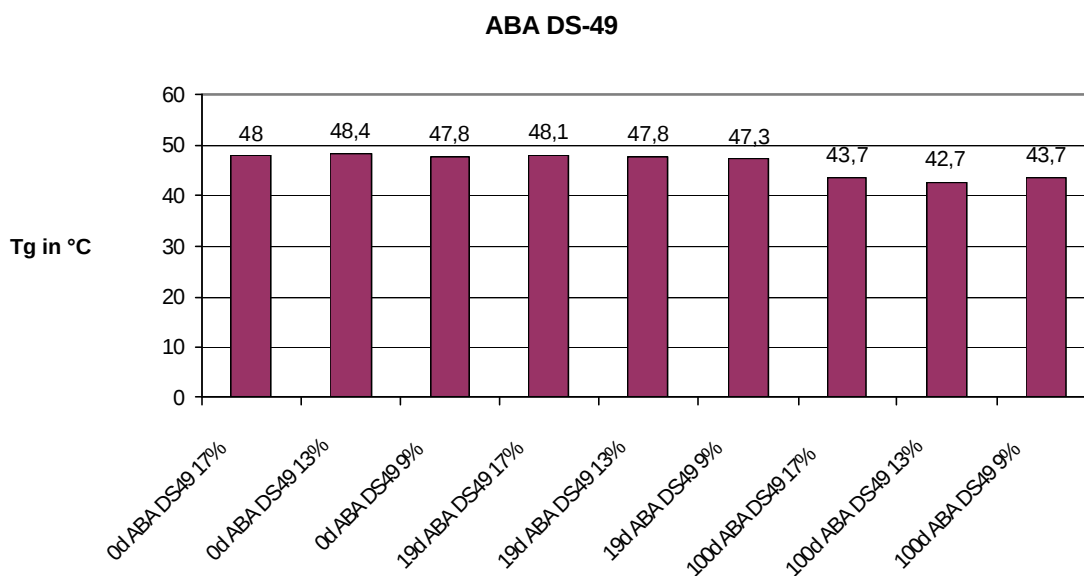


Abb. 46 Glasübergangstemperaturen Tg der Polylactidblöcke ermittelt aus der zweiten Aufheizkurve der DSC-Messung für DS-49 beladene ABA-Mikrosphären der Partikelfraktion 300-710 μm während des Freisetzungsexperiments in PBS-Puffer bei 37°C unter Sink-Bedingungen.

Während der ersten 19 Tage schwanken die gemessenen Polylactid-Glasübergangstemperaturen zwischen 47,3°C und 48,4°C und können als konstant angesehen werden. Nach 100 Tagen Verweilzeit in PBS-Puffer ist ein leichter Rückgang auf maximal 43,7°C für den 17 und 9 %-Ansatz und minimal 42,7°C für den 13 % Ansatz zu verzeichnen. Somit hat die Höhe der theoretischen Beladung in diesem Bereich keinen Einfluss auf Tg. In Abb. 47 ist der Verlauf der Glasübergangstemperatur der Polylactidblöcke für die D-50 beladenen ABA-Mikrosphären gezeigt.

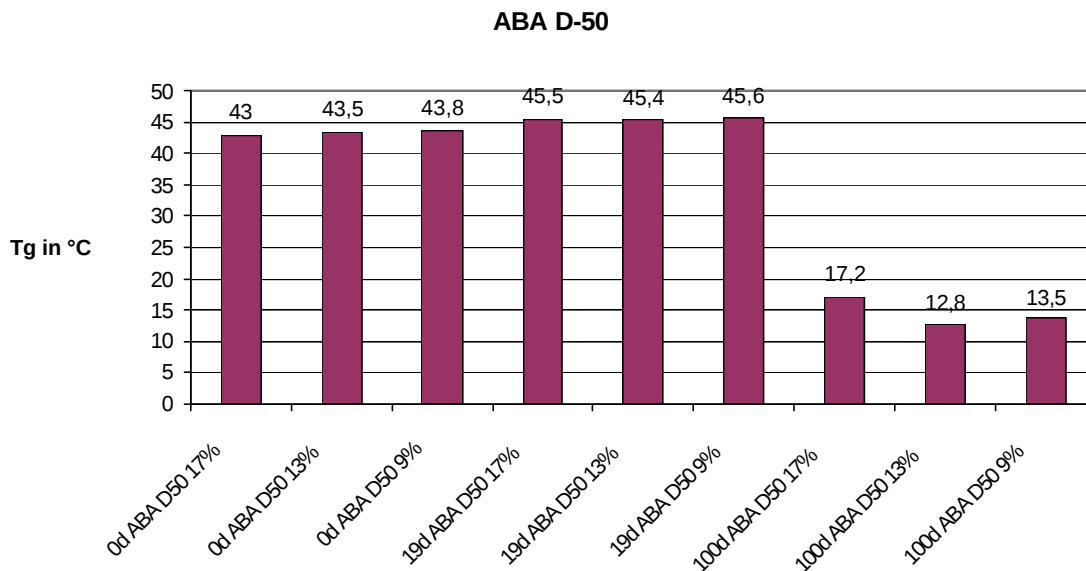


Abb. 47 Glasübergangstemperaturen T_g der Polylactidblöcke ermittelt aus der zweiten Aufheizkurve der DSC-Messung für D-50 beladene ABA-Mikrosphären der Partikelfraktion 300-710 μm während des Freisetzungsexperiments in PBS-Puffer bei 37°C unter Sink-Bedingungen.

T_g kann für die ersten 19 Tage ebenfalls als konstant angesehen werden. Er schwankt zwischen 43,0 und 45,6°C. Nach 100 Tagen in PBS-Puffer wird eine Abnahme von T_g beobachtet. Für den 17 %-Ansatz wird ein Wert von 17,2°C, für den 13 %-Ansatz 12,8°C und für den 9 %-Ansatz 13,5°C gefunden. Die Auswirkung von M-40 auf die Glasübergangstemperatur der Polylactidblöcke der ABA-Mikrosphären ist in Abb. 48 gezeigt.

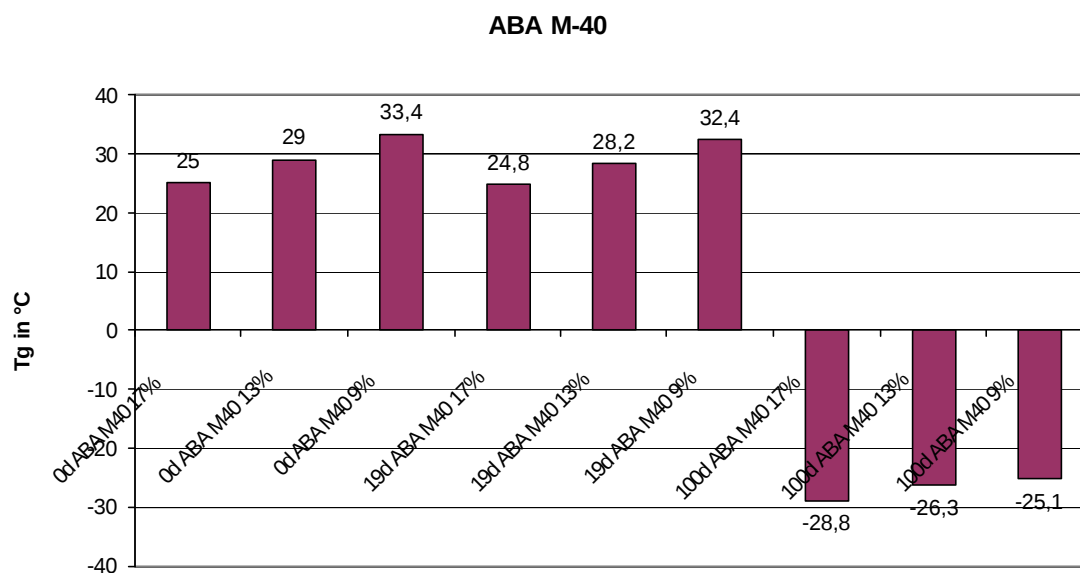


Abb. 48 Glasübergangstemperaturen T_g der Polylactidblöcke ermittelt aus der zweiten Aufheizkurve der DSC Messung für M-40 beladene ABA-Mikrosphären der Partikelfraktion 300-710 μm während des Freisetzungsexperiments in PBS-Puffer bei 37°C unter Sink-Bedingungen.

Die Höhe der theoretischen Beladung hat auch hier, ähnlich wie bei den mit M-40 beladenen PDLLA-Mikrosphären, einen Einfluss auf T_g der Polylactidblöcke. Es fällt auf, dass eine Erhöhung der Beladung zu einer Erniedrigung des T_g führt. Für den 17 %-Ansatz wird T_g von 25°C gefunden (Blindprobe $T_g = 48,1^\circ\text{C}$). Der 13 %-Ansatz ergibt T_g von 29,0°C und der 9 %-Ansatz liegt bei 33,4°C. Die Glasübergangstemperaturen der Polylactidblöcke liegen deutlich unter T_g der Polylactidblöcke der Blindprobe, was wie bei den mit M-40 beladenen PDLLA-Mikrosphären auf einen Weichmachereffekt der Modellschubstanz zurückgeführt werden kann. Die Polylactid-Glasübergangstemperatur ändert sich während der ersten 19 Tage im Freisetzungsexperiment nicht, obwohl das Molekulargewicht für alle Ansätze um mehr als 57 % abgenommen hat. Nach 100 Tagen ist das Polymer weitgehend abgebaut und es finden sich Glasübergangstemperaturen von -28,8°C, -26,3°C und -25,1°C jeweils für den 17, 13 und 9 %-Ansatz. Die durch Degradation der Polylactidblöcke bewirkte Zunahme der Kettenbeweglichkeit führt zu der Erniedrigung der Polylactid-Glasübergangstemperatur.

Da in den ersten drei Wochen der Freisetzung Erosion vernachlässigbar ist und die Glasübergangstemperaturen keine Änderung erfahren, wird eine diffusionskontrollierte Freisetzung nach Higuchi angenommen, nach der die freigesetzte relative Substanzmenge proportional zur Wurzel der Zeit ist³² (Gl.2). In Tab. 18 sind die Ergebnisse der linearen Regressionsanalyse dargestellt.

Tab. 18 Achsenabschnitt a , Steigung k und quadratischer Korrelationskoeffizient R^2 aus Gl.2 für die Freisetzung von DS-49 aus ABA-Mikrosphären in PBS-Puffer bei 37°C unter Sink-Bedingungen in Abhängigkeit von der theoretischen Beladung und Partikelgröße.

DS-49 ABA Partikelfraktion	Theoretische Beladung			
	Parameter	17%	13%	9%
100-300 μm	$k \text{ in } d^{-1/2}$	0,75	0,80	0,77
	a	0,054	0,077	0,067
	R^2	0,9379	0,8936	0,9101
300-710 μm	$k \text{ in } d^{-1/2}$	0,72	0,79	0,77
	a	0,045	0,069	0,066
	R^2	0,9518	0,9106	0,9137

Die Korrelationskoeffizienten schwanken im Bereich von 0,8936 für den 13 %-Ansatz mit der Partikelfraktion 100-300 μm und 0,9518 für den 17 %-Ansatz mit der Partikelfraktion 300-710 μm . Der hydrophile PEO-Anteil führt zu einer stärkeren Quellung des Polymers und damit zu einer schnelleren Freisetzung von DS-49 aus ABA-Mikrosphären als die Freisetzung von DS-49 aus PDLLA-Mikrosphären. Die relativen Freisetzungsraten für die Freisetzung von DS-49 aus ABA-Mikrosphären in PBS-Puffer (Abb. 30) zeigen einen schnellen zeitlichen Rückgang, was mit einem *burst*-Effekt interpretiert wurde. Die bei der linearen Regression erhaltenen Achsenabschnitte schwanken zwischen 0,045 für den 17 %-Ansatz der 300-710 μm Fraktion und 0,077 für den 13 %-Ansatz der 100-300 μm Fraktion. Unter Berücksichtigung von Messfehlern bei der UV-spektroskopischen Bestimmung der Modellsubstanz von 7 % lassen sich die Abweichungen der Achsenabschnitte von $a = 0$ erklären. Allerdings weisen die teils geringen Korrelationskoeffizienten darauf hin, dass es zu Abweichungen vom rein diffusionsgesteuerten Verhalten kommt. Die Quellung des Polymers wirkt sich auf den Radius der Sphären, die Polymerdichte

und damit auch auf den Diffusionskoeffizienten aus. Die mit der Quellung verbundene Erhöhung des Diffusionskoeffizienten führt damit zu einer schnellen Freisetzung der inkorporierten Modellsubstanz.

Die Ergebnisse der linearen Regression für die Freisetzung von D-50 aus den ABA-Mikrosphären ist in Tab. 19 gezeigt.

Tab. 19 Achsenabschnitt a , Steigung k und quadratischer Korrelationskoeffizient R^2 aus Gl.2 für die Freisetzung von D-50 aus ABA-Mikrosphären in PBS-Puffer bei 37°C unter Sink-Bedingungen in Abhängigkeit von der theoretischen Beladung und Partikelgröße.

D-50 ABA	Theoretische Beladung			
Partikelfraktion	Parameter	17%	13%	9%
100-300 μm	$k \text{ in } d^{-1/2}$	0,39	0,49	0,48
	a	0,036	0,017	0,0004
	R^2	0,9827	0,9857	0,9999
300-710 μm	$k \text{ in } d^{-1/2}$	0,43	0,55	0,54
	a	0,037	0,024	0,015
	R^2	0,9820	0,9753	0,9899
710-1000 μm	$k \text{ in } d^{-1/2}$	0,58	0,55	0,44
	a	0,050	0,049	0,027
	R^2	0,9120	0,9048	0,9524

Die Korrelationskoeffizienten liegen in einem Bereich von minimal 0,9048 für den 13 %-Ansatz der Partikelfraktion 710-1000 μm und maximal 0,9999 für den 9 %-Ansatz der Partikelfraktion 100-300 μm . Die Achsenabschnitte liegen in einem Bereich von minimal 0,0004 für den 9 %-Ansatz der Partikelfraktion von 100-300 μm und maximal 0,050 für den 17 %-Ansatz der Partikelfraktion 710-1000 μm . Unter Berücksichtigung der Messfehler, die bei der UV-spektroskopischen Bestimmung der Modellsubstanz entstehen, kann von einer diffusionsgesteuerten Freisetzung ausgegangen werden. Die Steigungen aus Tab. 19 ergeben für die Partikelfraktionen von 100-300 μm kleinere Werte als für die Partikelfraktion von 300-710 μm . Dieses Phänomen einer langsameren Freisetzung von D-50 aus kleinen Sphären im Vergleich zur Freisetzung von D-50 aus großen Sphären wurde bereits mit der hohen Anzahl an Poren pro Sphären bei großen Sphären erklärt.

In Tab. 20 ist das Ergebnis der linearen Regression für die Freisetzung von M-40 aus den ABA-Mikrosphären gezeigt.

Tab. 20 Achsenabschnitt a , Steigung k und quadratischer Korrelationskoeffizient R^2 aus Gl.2 für die Freisetzung von M-40 aus ABA-Mikrosphären in PBS-Puffer bei 37°C unter Sink-Bedingungen in Abhängigkeit von der theoretischen Beladung und Partikelgröße.

M-40 ABA	Theoretische Beladung			
Partikelfraktion	Parameter	17%	13%	9%
100-300 μm	$k \text{ in } d^{-1/2}$	0,26	0,24	0,25
	a	-0,113	-0,071	-0,083
	R^2	0,9911	0,9919	0,9890
300-710 μm	$k \text{ in } d^{-1/2}$	0,27	0,25	0,24
	a	-0,082	-0,087	-0,078
	R^2	0,9938	0,9850	0,9887

Die berechneten Korrelationskoeffizienten liegen in einem engen Bereich von minimal 0,9850 für den 13 %-Ansatz mit der Partikelfraktion 300-710 μm und 0,9938 für den 17 %-Ansatz der Partikelfraktion 300-710 μm .

Die Achsenabschnitte ergeben Werte von minimal -0,113 für den 17 %-Ansatz mit der Partikelfraktion von 100-300 μm und maximal -0,071 für den 13 %-Ansatz der Partikelfraktion 100-300 μm . Da alle gefundenen Achsenabschnitte negative Werte zeigen, kann von einem *lag*-Effekt ausgegangen werden. Die *lag*-Zeiten wurden nach Gl.3 berechnet und sind in Tab. 21 zusammengefasst.

Tab. 21 *Lag*-Zeiten in Tagen der Freisetzungsexperimente von M-40 aus ABA-Mikrosphären, die aus der linearen Regression für die Auftragung der relativen freigesetzten Masse gegen Wurzel t erhalten und nach Gl.3 berechnet wurden.

<i>Lag</i> -Zeiten in d Partikelfraktion	Theoretische Beladung		
	17%	13%	9%
100-300 μm	0,18	0,09	0,11
300-710 μm	0,10	0,11	0,10

Die *lag*-Zeiten liegen sehr dicht bei einander um 0,1 d. Da die *lag*-Zeiten aus den relativen Freisetzungskurven von M-40 aus ABA-Mikrosphären in PBS-Puffer berechnet wurden, wirkt sich der Messfehler, der bei der UV-spektroskopischen Bestimmung von M-40 gemacht wurde, auf die Berechnung der *lag*-Zeiten aus. Eine Interpretation kann hinsichtlich der Abhängigkeit der *lag*-Zeiten von der Partikelgröße oder der theoretischen Beladung nicht erfolgen. Bei der Betrachtung der aus der linearen Regression erhaltenen Steigungen aus Tab. 20 für die Freisetzung von M-40 aus ABA-Mikrosphären in PBS-Puffer ist zu sehen, dass die Werte sehr dicht um 0,25 bei einander liegen. Die Polylactid-Glasübergangstemperaturen sind bei den M-40 beladenen Sphären durch einen Weichmachereffekt der Modellschubstanz stark erniedrigt und liegen alle unter der Freisetzungstemperatur von 37°C. Die ABA-Sphären besitzen, wie die PDLLA-Mikrosphären, die Neigung, Agglomerate zu bilden, die bei den ABA-Sphären allerdings wegen der geringeren Tg-Werte stärker ausgeprägt ist, wie in Abb. 49 gezeigt wird.

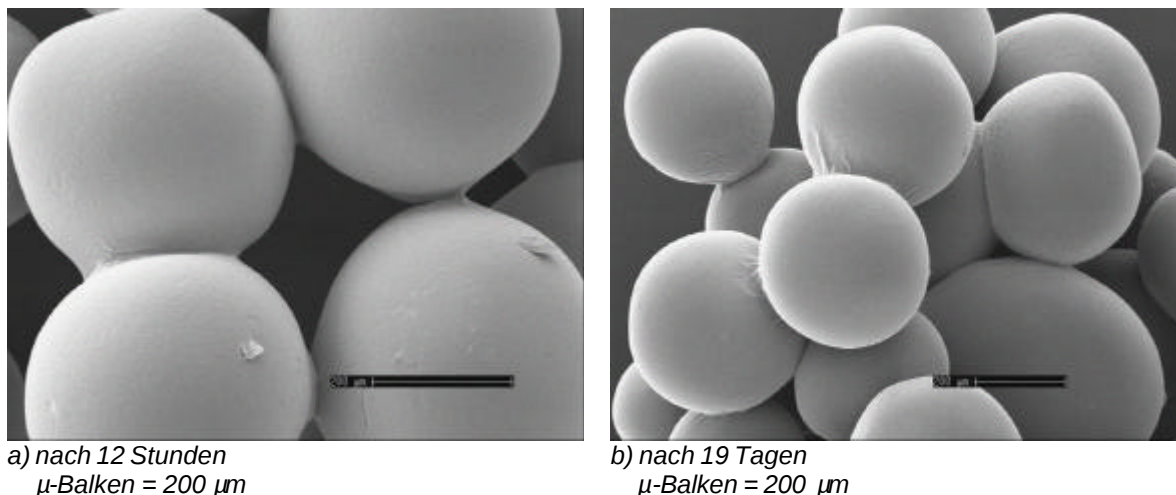


Abb. 49 Agglomerate von M-40 beladenen ABA- Mikrosphären des 9 %- Ansatzes mit der Partikelfraktion von 300-710 μ m nach 12 h (a) und nach 19 Tagen (b) in PBS-Puffer bei 37°C unter Sink-Bedingungen.

Die dem Freisetzungsmedium zugängliche Oberfläche wird durch die Agglomeration der Sphären verringert. Da die berechneten Steigungen keine Abhängigkeit von der Partikelfraktion der M-40 beladenen ABA-Mikrosphären zeigen, kann daraus geschlossen werden, dass die Freisetzung von M-40 aus ABA-Sphären-Agglomeraten stattfindet, die eine ähnliche Oberflächengröße aufweisen. Durch die Bildung von Agglomeraten der mit M-40 beladenen ABA-Mikrosphären, weisen die Sphären der unterschiedlichen Partikelfractionen nach Agglomeration ein ähnliches Oberflächen/Volumen-Verhältnis auf.

Unter Berücksichtigung des *lag*-Effekts, der zu negativen Achsenabschnitten führt, kann für die Freisetzung von M-40 aus ABA-Mikrosphären in PBS-Puffer von einer diffusionsgesteuerten Freisetzung ausgegangen werden. Die Auswirkung der polymeren Matrix auf die Beladungseffektivität, die anfängliche Freisetzungsrates und die aus der linearen Regression erhaltene Steigung wurden genauer untersucht.

In Tab. 22 sind die Quotienten aus der jeweiligen praktischen Beladung der ABA-Mikrosphären und der praktischen Beladung der PDLLA-Mikrosphären für die jeweilige Modellsubstanz, Partikelfraktion und theoretische Beladung gegenübergestellt.

Tab. 22 Quotienten aus der praktischen Beladung der ABA-Mikrosphären und der praktischen Beladung der PDLLA-Mikrosphären in Abhängigkeit von der theoretischen Beladung und der Partikelgrößenverteilung.

Quotient ABA/PDLLA (prakt. Beladung)	Theoretische Beladung		
	17%	13%	9%
DS-49			
100-300 µm	0,32	0,46	0,59
300-710 µm	0,46	0,87	0,62
D-50			
100-300 µm	0,85	0,47	0,42
300-710 µm	1,52	1,07	0,90
710-1000 µm	1,27	1,29	0,97
M-40			
100-300 µm	1,34	1,77	1,38
300-710 µm	1,07	1,03	1,28

Auffällig ist, dass mit DS-49 beladene Mikrosphären praktische Beladungsquotienten kleiner 1 ergeben und die Werte für die mit M-40 beladenen Sphären größer 1 sind. Somit ist die Beladungseffektivität bei der Inkorporation der hydrophilen Modellsubstanz für die PDLLA-Mikrosphären höher als für ABA-Mikrosphären, wobei die Inkorporation der hydrophoben Modellsubstanz zu höheren Beladungseffektivitäten bei den ABA-Mikrosphären führt.

Während der Herstellung von DS-49 beladenen Mikrosphären nach der o/w Lösungsmittel-Evaporationsmethode liegt die Modellsubstanz suspendiert in den Ölphasentröpfchen vor, die wiederum die disperse Phase in der kontinuierlichen wässrigen Phase bilden. Durch die Evaporation des Reaktors wird das organische Lösungsmittel aus der Ölphase entfernt und die Sphären erhärten. Die in der dispersen Phase vorliegenden DS-49 Partikel werden vom Wasser der kontinuierlichen Phase ausgewaschen. Dabei dringt Wasser in die Sphären ein und es entstehen Poren und Kanäle in den Mikrosphären. Da ABA-Mikrosphären stärker quellen als PDLLA-Mikrosphären, wird aus ABA-Mikrosphären mehr DS-49 ausgewaschen als aus PDLLA-Mikrosphären; eine Quellung der Sphären führt zu

einer Aufweitung der Poren und Kanäle. Die Bildung von Poren und Kanälen und eine stärkere Quellung von ABA-Mikrosphären im Vergleich zu PDLLA-Mikrosphären führt zu niedrigeren praktischen Beladungen mit DS-49 für ABA-Mikrosphären als für PDLLA-Mikrosphären. M-40 beladene Mikrosphären zeigen ein gegenteiliges Verhalten bezüglich der praktischen Beladungsquotienten. Während der Herstellung von M-40 beladenen Mikrosphären stellt die Ölphase eine Lösung von Polymer und M-40 in Dichlormethan dar. M-40 beladene Mikrosphären bilden keine Poren aus. In die Sphären kann während der Dispergierung kein Wasser eindringen. Einerseits verhindert die hydrophobe Natur von M-40 das Eindringen von Wasser in die Mikrosphären, andererseits kann wegen der homogenen Verteilung der Modellsubstanz in den Mikrosphären kein Poren und Kanalsystem gebildet werden. Während der Evaporation erhärten die Sphären, da das Lösungsmittel aus den Sphären entfernt wird. Wegen der hydrophileren Natur des ABA-Polymers im Vergleich zum PDLLA und damit der geringeren Wechselwirkung zwischen Polymer und hydrophoben Lösungsmittel erhärten ABA-Sphären schneller als PDLLA-Sphären. Eine schnellere Inkorporation der Modellsubstanz führt bei ABA-Mikrosphären zu höheren praktischen Beladungen als bei PDLLA-Mikrosphären, da die Diffusion der Modellsubstanz aus den erhärteten Sphären langsamer ist als bei lösungsmittelhaltigen Sphären. Eine schnellere Erhärtung während der Evaporation der ABA-Mikrosphären im Vergleich zu PDLLA-Mikrosphären findet auch bei DS-49 beladenen Sphären statt, hat aber keine Auswirkung auf die praktische Beladung, da das Poren- und Kanalsystem die praktische Beladung bei DS-49 beladenen Mikrosphären bestimmt.

Die Beladungsquotienten der D-50 Mikrosphären ergeben sowohl für die Partikelfractionen 100-300 μm als auch für die 9 %-Ansätze eine höhere Beladungseffektivität für die PDLLA-Sphären. D-50 beladene Mikrosphären zeigen für die verschiedenen Partikelfractionen große Unterschiede in der Anzahl der Poren pro Sphären. Die Anzahl der Poren pro Sphären nimmt mit steigendem Radius der Mikrosphären zu.

Mit den anfänglichen relativen Freisetzungsraten f_0 und den Steigungen k der ABA- und PDLLA-Mikrosphären, welche man aus der linearen Regression der relativen freigesetzten Masse gegen Wurzel t erhält, wurde analoge Rechnung durchgeführt wie mit den praktischen Beladungen. Die Quotienten aus der jeweiligen anfänglichen Freisetzungsrates bzw. Steigung der ABA-Mikrosphären und anfänglichen Freisetzungsrates bzw. Steigung der PDLLA-Mikrosphären sind in Tab. 23 und Tab. 24 für die jeweilige Modellschubstanz, Partikelfraktion und theoretischer Beladung zusammengestellt.

Tab. 23 Quotienten aus anfänglicher Freisetzungsrates $f_{0\text{ ABA}}$ der ABA-Mikrosphären und anfänglicher Freisetzungsrates $f_{0\text{ PDLLA}}$ der PDLLA-Mikrosphären in Abhängigkeit von der theoretischen Beladung und der Partikelgrößenverteilung.

Quotient ABA/PDLLA (anfängl. Freisetzungsrates)	Theoretische Beladung		
	17%	13%	9%
DS-49			
100-300 μm	1,68	2,34	2,27
300-710 μm	2,93	5,33	7,49
D-50			
100-300 μm	0,86	1,68	2,88
300-710 μm	1,01	2,30	1,12
710-1000 μm	1,64	2,54	0,71
M-40			
100-300 μm	1,43	1,85	1,52
300-710 μm	2,26	1,48	2,04

Tab. 24 Quotienten aus der Steigung k_{ABA} der ABA-Mikrosphären und der Steigung k_{PDLLA} der PDLLA-Mikrosphären, welche aus der linearen Regression der relativen freigesetzten Masse gegen Wurzel t erhalten wurden, in Abhängigkeit von der theoretischen Beladung und der Partikelgrößenverteilung.

Quotient ABA/PDLLA (Steigung)	Theoretische Beladung		
	17%	13%	9%
DS-49			
100-300 μm	1,29	1,67	1,75
300-710 μm	1,67	1,98	2,96
D-50			
100-300 μm	0,71	1,48	1,60
300-710 μm	0,78	0,57	0,86
710-1000 μm	1,16	1,45	0,63
M-40			
100-300 μm	0,65	0,65	0,67
300-710 μm	0,75	0,76	0,65

Der Vergleich der anfänglichen relativen Freisetzungsraten f_0 ergibt in zwei Fällen höhere Werte für die PDLLA-Mikrosphären, die beide bei der Freisetzung von D-50 gefunden werden. Die Mikrosphären der 100-300 μm Fraktion des 17%-Ansatzes und die Sphären der 710-1000 μm Fraktion des 9 %-Ansatzes zeigen eine höhere relative Freisetzungsraten für PDLLA. Dabei nimmt der Freisetzungsratenquotient für den 17%-Ansatz mit steigendem Radius zu und für den 9%-Ansatz ab.

Die relativen Freisetzungsratenquotienten der DS-49 beladenen Mikrosphären zeigen die Tendenz, mit steigendem Radius und abnehmender theoretischer Beladung zuzunehmen. Für die mit M-40 beladenen Mikrosphären kann keine Tendenz einer Veränderung in Abhängigkeit von Sphärengröße oder theoretischer Beladung festgestellt werden.

Die aus der linearen Regression der Auftragung der relativen freigesetzten Masse gegen Wurzel t erhaltenen Steigungen können als ein Maß für die Freisetzungsgeschwindigkeit angesehen werden. Die Steigungen sind für eine Interpretation des Freisetungsverhaltens aussagekräftiger als die anfängliche Freisetzungsrates, da sie aus mehreren Datenpunkten einer Freisetzungskurve berechnet wird. Eine durch einen *lag*-Effekt verursachte zeitlich verzögerte Freisetzung macht sich in der Steigung nicht bemerkbar.

Die in Tab. 24 gezeigten Steigungsquotienten ergeben für die DS-49 beladenen Mikrosphären Werte größer 1, was einer schnelleren Freisetzung aus den ABA-Mikrosphären entspricht und mit den relativen Freisetzungsratesquotienten im Einklang steht. Die Freisetzung von DS-49 aus den Mikrosphären in PBS-Puffer findet durch ein schnelles Eindringen von Wasser durch die Poren und die damit verbundene Ausspülung von DS-49 statt. ABA-Sphären quellen stärker als PDLLA-Sphären. Die mit einer Quellung verbundene Weitung der Poren führt bei den ABA-Sphären zu einer schnelleren Freisetzung von DS-49 als bei den PDLLA-Mikrosphären.

Die D-50 beladenen Mikrosphären ergeben bei dem Vergleich von PDLLA und ABA-Sphären unter Berücksichtigung der Steigungsquotienten ein Bild zugunsten einer schnelleren Freisetzung von D-50 aus PDLLA-Sphären. Bei der Betrachtung der relativen anfänglichen Freisetzungsratesquotienten ergeben sich zwei Werte kleiner 1 und in 5 Fällen werden höhere Freisetzungsrates der Modellsubstanz aus PDLLA-Sphären gefunden. Die Freisetzung von D-50 wird von der Anzahl der Poren auf der Sphärenoberfläche bestimmt. Bei großen Sphären wird eine höhere Anzahl der Poren pro Sphären gefunden als bei kleinen, was dazu führt, dass die zu den großen Sphären zugehörigen Freisetzungsrates gleiche oder auch höhere Werte aufweisen als kleine. Bei den D-50 beladenen PDLLA-Mikrosphären ist die unterschiedliche Anzahl der Poren pro Sphären zwischen den kleinen und großen Sphären am stärksten beim 9 %-Ansatz ausgeprägt, was sich in einer kleinen Steigung von $0,3 \text{ d}^{-1}$ für die 100-300 μm Fraktion und einer großen Steigung von $0,7 \text{ d}^{-1}$ für die 710-1000 μm Fraktion zeigt. Die Steigungen des 9 %-Ansatzes der ABA-Mikrosphären ergeben für die 100-300 μm -Fraktion $0,48 \text{ d}^{-1}$ und $0,44 \text{ d}^{-1}$ für die 300-710 μm -Fraktion. Bei den D-50 beladenen ABA-Mikrosphären ist die unterschiedliche Anzahl der Poren zwischen den kleinen und großen Sphären am stärksten für den 17 %-Ansatz ausgeprägt, was zu einer Steigung von $0,39 \text{ d}^{-1}$ für die 100-300 μm Fraktion und

einer größeren Steigung von $0,58 \text{ d}^{-1}$ für die 710-1000 μm Fraktion führt. Die Steigungen des 17 %-Ansatzes der PDLLA-Mikrosphären ergeben für die 100-300 μm -Fraktion $0,55 \text{ d}^{-1}$ und $0,50 \text{ d}^{-1}$ für die 300-710 μm -Fraktion. Der unterschiedliche Verlauf der Steigungen für den 9 und 17 %-Ansatz führt bei der Berechnung der Steigungsquotienten zu gegenläufigen Werten.

M-40 beladene Mikrosphären ergeben bezüglich der Betrachtung über die Steigungsquotienten ein völlig anderes Bild als bei Betrachtung der relativen Freisetzungsratenquotienten. Das Verhältnis der Steigungen zeigt für alle Experimente eine schnellere Freisetzung von M-40 aus PDLLA-Mikrosphären, wogegen der anfängliche relative Freisetzungsratenquotient eine schnellere Freisetzung für ABA-Sphären zeigt. Die Diffusion niedermolekularer Substanzen erfolgt in einer glasig, erstarrten Matrix deutlich langsamer als in Polymeren oberhalb der Glas temperatur^{90,91}. Die Messung der Polylactid-Glasübergangstemperaturen der Partikelfraktion von 300-710 μm ergibt für beide Polymere eine Erniedrigung des T_g , die abhängig von der Beladung ist. Dabei liegen die Polylactid- T_g -Werte der ABA-Mikrosphären zwischen $25,0$ und $33,4^\circ\text{C}$ und die der PDLLA-Mikrosphären zwischen $32,3$ und $39,5^\circ\text{C}$. Die Glasübergangstemperaturen der Polylactidblöcke der ABA-Mikrosphären befinden sich somit deutlich unterhalb der Freisetzungstemperatur von 37°C . Aus Tab. 22 kann entnommen werden, dass die ABA-Mikrosphären der Partikelfraktion 100-300 μm höhere praktische Beladungen zeigen und daher vermutlich eine deutlichere T_g -Erniedrigung erfahren haben als die PDLLA-Mikrosphären. Dies spricht dafür, dass die Diffusion in den ABA-Mikrosphären schneller verläuft und zu höheren Freisetzungen für ABA-Polymere führt. Diese Beobachtung kann zu Beginn der Freisetzung bei der Betrachtung der anfänglichen Freisetzungsratenquotienten gemacht werden. Die T_g -Erniedrigung führt auch dazu, dass eine Agglomeration der Sphären stattfindet, die mit der Zeit stärker wird. Dieses Phänomen ist bei den ABA-Mikrosphären stärker ausgeprägt als bei den PDLLA-Mikrosphären. Eine Agglomeration verringert die dem Freisetzungsmedium zugängliche Oberfläche und damit die Freisetzungsrates. Die Agglomerisation führt bei den ABA-Mikrosphären zu einer größeren Verringerung der Oberfläche als bei den PDLLA-Mikrosphären.

Nach erfolgter Agglomeration findet die Freisetzung von M-40 aus ABA-Mikrosphären in PBS-Puffer langsamer statt als die Freisetzung von M-40 aus

PDLLA-Mikrosphären. Da die Steigung aus mehreren Messpunkten berechnet worden ist, wird die Agglomeration der Sphären in der Steigung berücksichtigt. Aus diesem Grund wird bei den Steigungsquotienten eine schnellere Freisetzung von M-40 aus PDLLA-Mikrosphären gefunden als bei den anfänglichen Freisetzungsratenquotienten. Die anfänglichen Freisetzungsratenquotienten beziehen sich auf die Freisetzung von M-40 aus den Mikrosphären zu Beginn des Experiments, als die Sphären noch nicht agglomeriert vorlagen und eine schnellere Freisetzung von M-40 aus den ABA-Mikrosphären als aus den PDLLA-Mikrosphären in PBS-Puffer gefunden wird.

3.4 Freisetzung von Ascorbinsäure aus Poly(D,L-lactid)-Mikrosphären und Poly-(D,L-lactid)-co-PEO-co-poly-(D,L-lactid)-Mikrosphären

Milchsäure ist eine im Auge vorkommende Verbindung. Im Kaninchenauge werden zum Beispiel Konzentrationen von 12.0 mmol/l im Glaskörper, 9.9 mmol/l im Kammerwasser oder 10.3 mmol/l im Plasma gefunden⁹⁵. Somit liegt die Verwendung von Polymeren auf Basis von Polylactid nahe. Zur Behandlung der PVR wurden Ascorbinsäure beladene Mikrosphären aus Poly(D,L-lactid) und Poly-(D,L-lactid)-co-PEO-co-poly-(D,L-lactid) nach der o/w-Lösungsmittel-Evaporationsmethode hergestellt. Dabei wurde eine PEO-Einheit mit einem mittleren Molekulargewicht von 2000 ausgesucht, welches zwar nicht abbaubar, aber in dieser Größenordnung bioeliminierbar ist^{92,93,94}. Die Mikrosphären werden während der Vitrektomie zusammen mit dem Tamponademedium direkt ins Auge verabreicht. Daher müssen die Sphären in einem bestimmten Größenintervall liegen. Sie dürfen eine Maximalgröße nicht überschreiten, da sie sonst die Kanüle nicht mehr passieren können. Partikel im Größenbereich $< 1 \mu\text{m}$ müssen entfernt werden, da sie im Auge phagozytiert werden können. Daher wurden die Sphären über Mikrosiebe fraktioniert, um eine Größe zwischen 200 und 800 μm einzustellen.

In Abb. 50 sind die Partikelgrößenverteilungen der jeweiligen Gesamtfraktion und der isolierten Fraktion der mit Ascorbinsäure beladenen PDLLA- und ABA-Mikrosphären gezeigt.

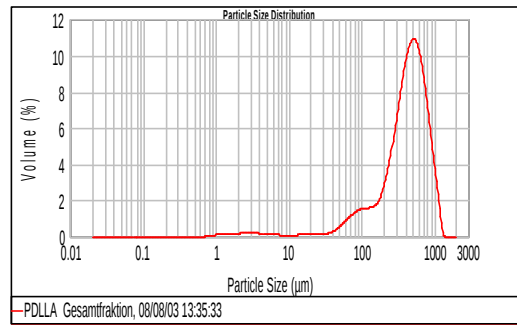
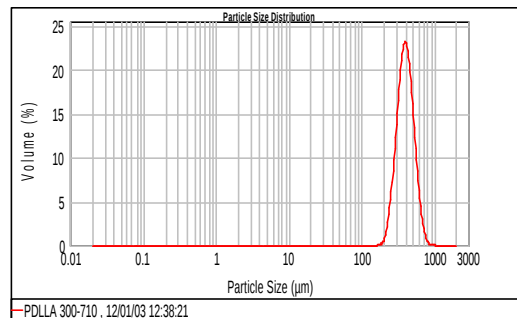
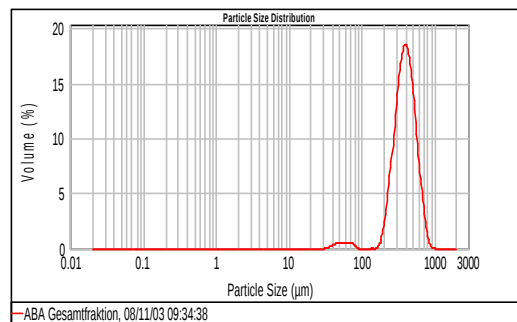
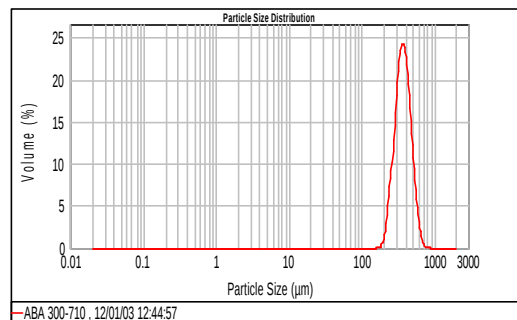
*PDLLA Gesamtfraction**PDLLA isolierte Fraction**ABA Gesamtfraction**ABA isolierte Fraction*

Abb. 50 Partikelgrößenverteilungen der Gesamtfraction und der über Mikrosiebe isolierten Fraction der Ascorbinsäure beladenen PDLLA- und ABA-Mikrosphären.

Durch Verwendung der Mikrosiebe kann die gewünschte Partikelgrößenverteilung aus der jeweiligen Gesamtfraction gewonnen werden.

3.4.1 *In vitro* Simulation der Freisetzungsbedingungen für Ascorbinsäure im Auge

Zur Behandlung der PVR soll im Kammerwasser des Auges eine optimale proliferationshemmende Ascorbinsäurekonzentration von 1,5 mmol/l eingestellt werden. Diese soll anschließend über die im Tamponademedium verabreichten Ascorbinsäure beladenen Mikrosphären über zwei Wochen aufrechterhalten werden. Als Modellanordnung wurde die in Abb. 51 gezeigte Versuchsanordnung gewählt. 5 ml einer wässrigen, PBS gepufferten 1,5 mmolaren Ascorbinsäurelösung wurden mit 2 ml Silikonöl überschichtet. Die auf das Silikonöl gegebenen Sphären sinken schnell ab und liegen dann an der Phasengrenzfläche vor.

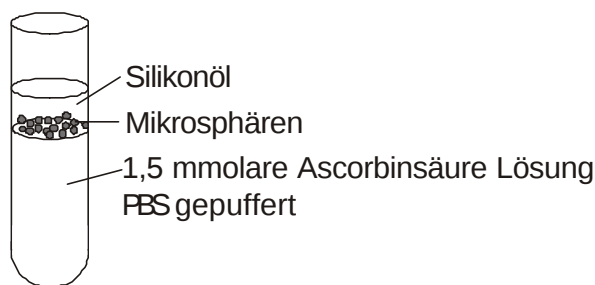


Abb. 51 Versuchsanordnung für die Freisetzung von Ascorbinsäure aus PDLLA- bzw. ABA-Mikrosphären. Die Mikrosphären liegen an der Phasengrenzfläche von Silikonöl und PBS-gepufferter 1,5 mmolarer Ascorbinsäurelösung vor.

Ascorbinsäure unterliegt im wässrigen Milieu einem Abbau. Die Gleichgewichtskonzentrationen von Ascorbinsäure und Dehydroascorbinsäure hängen vom verfügbaren Sauerstoff ab. Ist ausreichend Sauerstoff vorhanden, so ist die reduzierte Form mit der Endiolstruktureinheit an C-2 und C-3 instabil und unterliegt bei physiologischem pH-Wert vollständiger Oxidation zu Dehydroascorbinsäure^{95,96}. Der Abbau von Dehydroascorbinsäure in wässriger Lösung erfolgt über einen irreversiblen Schritt unter Hydrolyse des Lactonringes zu 2,3-Dioxo-L-gulonsäure⁹⁷. Über den Zerfall der 2,3-Dioxo-L-gulonsäure wird in Literatur kontrovers diskutiert. Kanfer et al. berichten, dass Dehydroascorbinsäure zu L-Lyxonsäure und L-Xylonsäure umgesetzt wird⁶⁰. Andererseits wird von Jung et al. und Sapper et al. berichtet, dass die gebildete 2,3-Dioxo-L-gulonsäure unter

Decarboxylierung zu 3,4,5-Trihydroxy-2-oxo-L-valeraldehyd umgesetzt wird. Letztere Verbindung wird anschließend zu L-Erythroascorbinsäure oxidiert, wobei gleichzeitig Dehydro-L-ascorbinsäure zu L-Ascorbinsäure reduziert wird^{58,59,60,98,96}. Eine wässrige Ascorbinsäurelösung stellt ein komplexes Redoxsystem dar. Der Abbau der Ascorbinsäure kann indirekt UV-spektroskopisch verfolgt werden, indem die UV-Absorption der Ascorbat-Monoanionen bei 265 nm zeitlich verfolgt wird.

Zunächst wurde die in Abb. 51 gezeigte Versuchsanordnung ohne Mikrosphären gewählt, um den Abbau der Ascorbinsäure zu beobachten. In Abb. 52 ist die Abnahme der Ascorbinsäurekonzentration einer 1,5 mM Lösung mit und ohne überschichteter Ölphase gezeigt. Die Versuche wurden bei 37°C in lichtundurchlässigen Gefäßen durchgeführt, um die auf den Abbau katalytisch wirkende UV-Strahlung auszuschalten und um für die anschließend stattfindenden Freisetzungsversuche konstante Bedingungen zu schaffen.

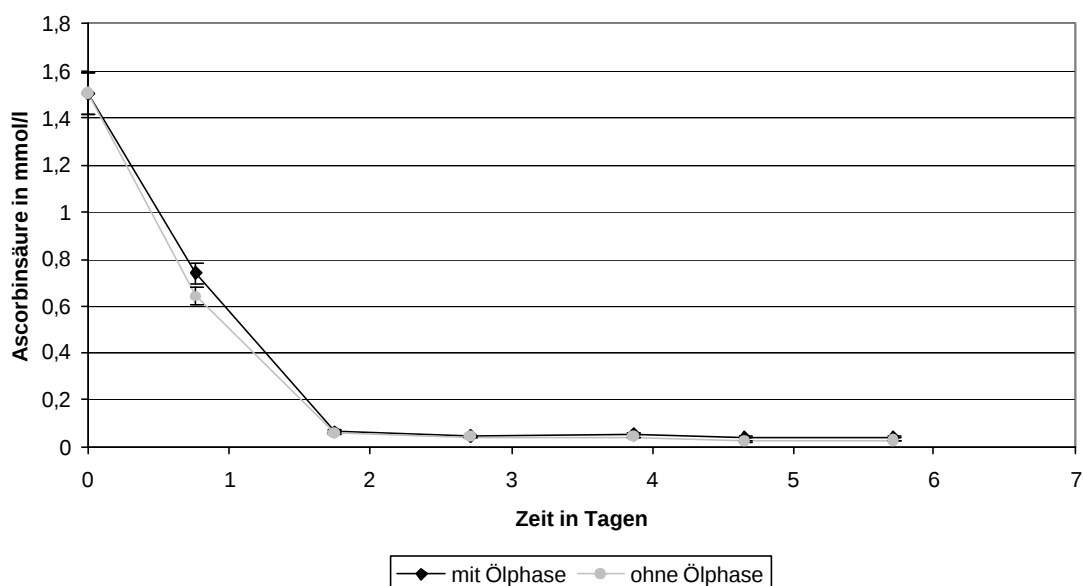


Abb. 52 Ascorbinsäureabbau einer 1,5 mmolaren Lösung mit und ohne Silikonölphase (Sil-Oil 5000® adato) in PBS-Puffer bei 37°C. Die Experimente wurden in lichtundurchlässigen Gefäßen durchgeführt.

Die Ascorbinsäurekonzentration in beiden Experimenten sinkt nach 1,7 Tagen auf therapeutisch unwirksame Konzentrationen ab⁹⁹. Die Silikonölphase mit ihrer hohen Permeabilität für Sauerstoff¹⁰⁰ hat auf die Oxidation der Ascorbinsäure kaum Einfluss. Weitere Experimente wurden mit Ascorbinsäure beladenen Mikrosphären durchgeführt.

So wurden Ascorbinsäure beladene PDLLA-Mikrosphären direkt in die 1,5 mmolare wässrige Ascorbinsäurelösung gegeben, ohne Überschichtung der wässrigen Lösung mit Silikonöl (Experiment a). Pro 24 h wurden 240 µl Proben der wässrigen Ascorbinsäurelösung entnommen und durch die gleiche Menge frischen PBS-Puffers ersetzt. Die Ascorbinsäurekonzentration der entnommenen Proben wurde jeweils direkt nach Entnahme aus dem Reaktionsgefäß UV-spektroskopisch bestimmt.

In zwei weiteren Experimenten wurden jeweils sich in ihrer Viskosität unterscheidende Silikonöltamponaden verwendet (Experiment b: niedrigviskoses Öl, Experiment c: hochviskoses Öl). Die 1,5 mmolare wässrige Ascorbinsäurelösung wurde mit 2 ml Silikonöltamponade überschichtet. Die PDLLA-Mikrosphären wurden auf das Silikonöl gegeben und sinken bis an die Phasengrenze von Silikonöl und wässriger Ascorbinsäurelösung. Die an der Phasengrenze befindlichen Ascorbinsäure beladenen PDLLA-Mikrosphären können Ascorbinsäure in die wässrige Phase freisetzen. In Abb. 53 ist der jeweilige Konzentrationsverlauf der wässrigen Ascorbinsäurelösung für die Experimente a,b und c dargestellt.

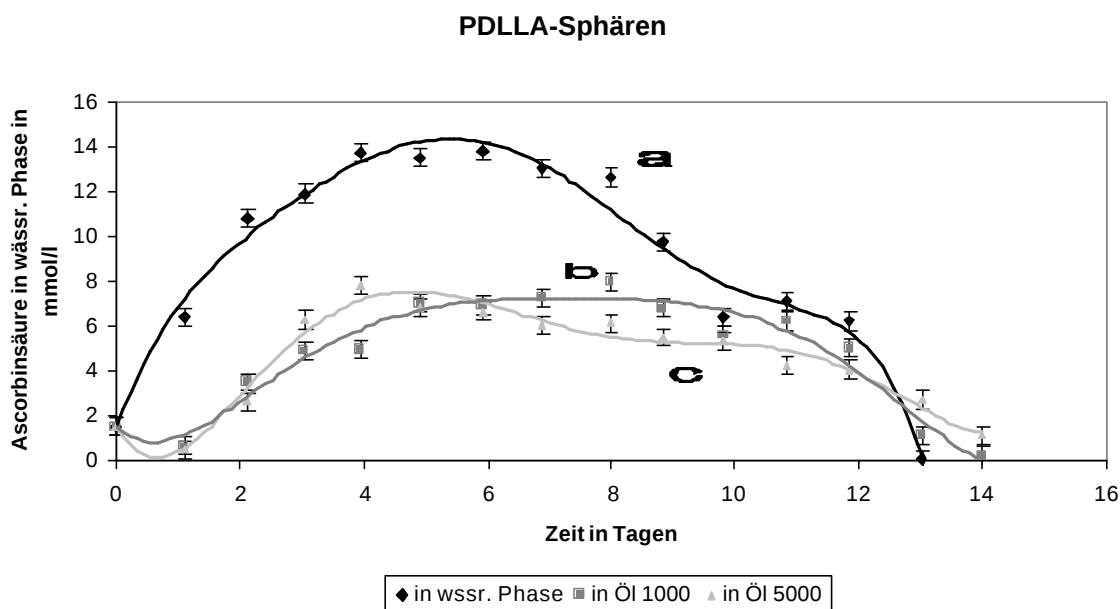


Abb. 53 Freisetzung von Ascorbinsäure aus PDLLA-Mikrosphären in eine 1,5 mM PBS-gepufferte Ascorbinsäurelösung bei 37°C, wobei die Sphären a) direkt in die wässrige Phase ohne Überschichtung der wässrigen Phase mit Silikonöl, b) in eine die wässrige Phase überschichtende niedrig-viskose Silikonölphase Sil-Oil 1000® (adato) und c) in eine die wässrige Phase überschichtende hoch-viskose Silikonölphase Sil-Oil 5000® (adato) gegeben wurden. Die Kurven geben den zeitlichen Konzentrationsverlauf in der wässrigen Phase wieder. Die Versuche wurden in lichtundurchlässigen Gefäßen durchgeführt.

Durch Zugabe der Ascorbinsäure beladenen PDLLA- Mikrosphären in die 1,5 mmolare Ascorbinsäurelösung wird ein Ascorbinsäureanstieg beobachtet, der nach 5,9 Tagen einen Maximalwert von 13,8 mmol/l erreicht. Nach 13 Tagen wird nur noch eine therapeutisch unwirksame Ascorbinsäurekonzentration von 0,1 mmol/l detektiert. Zu Beginn des Experiments ist die Freisetzungsrates von Ascorbinsäure aus den PDLLA-Sphären in die 1,5 mmolare Ascorbinsäurelösung höher als die Abbaurates von Ascorbinsäure. Daher nimmt die Konzentration der Ascorbinsäure zu. Im Maximum der Ascorbinsäurekonzentration sind Freisetzungsrates und Abbaurates gleich hoch. Im weiteren zeitlichen Verlauf nimmt die Freisetzungsrates ab und wird kleiner als die Abbaurates, was zur Folge hat, dass die Ascorbinsäurekonzentration in der wässrigen Phase abnimmt. In Abb. 54 sind REM-Aufnahmen einer Ascorbinsäure

beladenen PDLLA-Mikrosphäre und ein Querschnitt einer Ascorbinsäure beladenen PDLLA-Mikrosphäre gezeigt.

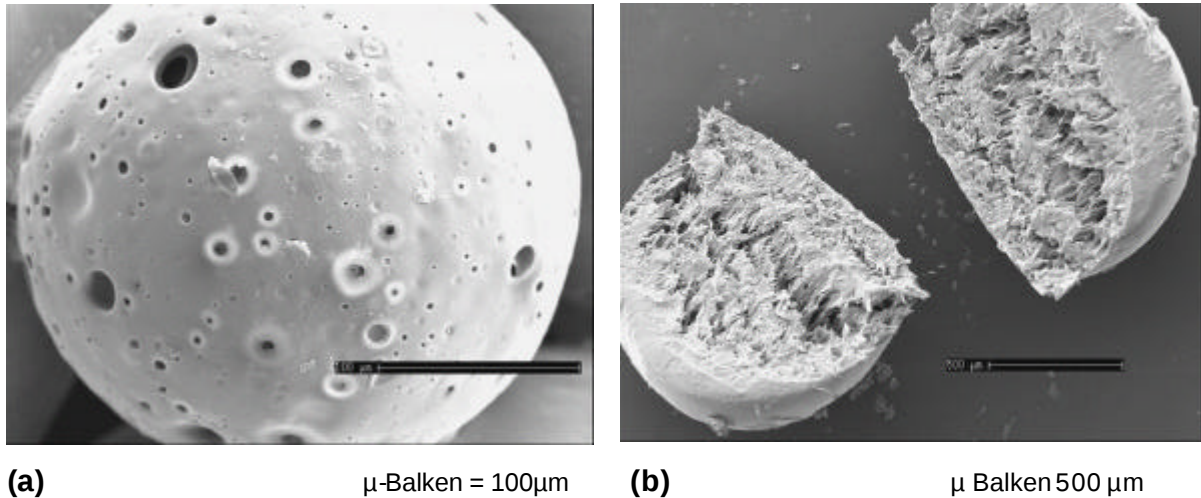


Abb. 54 REM-Aufnahmen einer mit Ascorbinsäure beladenen PDLLA-Mikrosphäre (a) und Querschnitt (b).

Ascorbinsäure beladene Mikrosphären zeigen eine porenreiche Oberfläche. Der Querschnitt zeigt eine schwammartige, von Kavitäten und Kanälen bestimmte Struktur im Inneren der Sphäre. Die Diffusion der Ascorbinsäure aus den Mikrosphären in die wässrige Phase erfolgt daher durch Poren und Kanäle.

Wird die 1,5 mmolare Ascorbinsäurelösung mit einer Silikonöltamponade überschichtet und die Ascorbinsäure beladenen PDLLA-Mikrosphären in die Ölphase gegeben, so sinken die Sphären an die Phasengrenzfläche zwischen Öl und wässriger Phase. Die Ascorbinsäurekonzentration in der wässrigen Phase nimmt zunächst ab. Nach 1,1 Tagen wird bei Verwendung des hochviskosen Öls-5000 eine Ascorbinsäurekonzentration von 0,51 mmol/l in der wässrigen Phase gemessen, welche bei der Verwendung des niedrigviskosen Öls-1000 nach dieser Zeit bei 0,65 mmol/l in der wässrigen Phase liegt. Das Silikonöl dringt vermutlich in die Poren der Mikrosphären ein. Eine spontane Freisetzung der Ascorbinsäure aus den an der Phasengrenzfläche befindlichen Mikrosphären wird durch das in den Poren befindliche Öl verhindert. Daher ist die Abbaurate der Ascorbinsäure in der wässrigen Phase zu Beginn des Experiments höher als die Freisetzungsrate von Ascorbinsäure

aus den Mikrosphären in die wässrige Phase. Die Folge ist eine Abnahme der Ascorbinsäurekonzentration in der wässrigen Phase. Nach 1,1 Tagen steigen die Konzentrationen an. Die Freisetzungsrates von Ascorbinsäure aus den an der Phasengrenzfläche befindlichen PDLLA-Mikrosphären in die wässrige Phase ist nach 1,1 Tagen höher als die Abbaurate der Ascorbinsäure zu 2,3-Dioxo-L-gulonsäure und weiteren Degradationsprodukten. Für das Öl-5000 wird nach 4 Tagen eine maximale Ascorbinsäurekonzentration von 7,8 mmol/l in der wässrigen Phase erreicht, welcher für das Öl-1000 nach 7,9 Tagen mit 8,0 mmol/l erreicht wird. Nach Erreichen der jeweiligen Maxima gehen die Ascorbinsäurekonzentrationen in der wässrigen Lösung langsam zurück. Für den Ansatz mit dem Öl-5000 wird nach 15 Tagen und für den Ansatz mit dem Öl-1000 nach 14 Tagen nur noch eine therapeutisch unwirksame Ascorbinsäurekonzentration in der wässrigen Phase gefunden.

Die erreichten Maxima der Ascorbinsäurekonzentrationsverläufe für die verwendeten Silikonöle unterscheiden sich kaum. Da Ascorbinsäure in Silikonöl unlöslich ist, kann eine Freisetzung der Ascorbinsäure aus den Mikrosphären in die wässrige Phase nur aus dem Bereich der Sphären erfolgen, die in der wässrigen Phase eintauchen. Die Poren sind vermutlich mit Silikonöl gefüllt, weshalb die Freisetzung der Ascorbinsäure aus den Sphären in die wässrige Phase nur durch die polymere Matrix der Mikrosphären stattfinden kann. Die beiden Konzentrationsverläufe der Ascorbinsäure in der wässrigen Phase zeigen keine großen Unterschiede für die verwendeten Silikonöle auf. Die dem wässrigen Freisetzungsmedium zugängliche Oberfläche der an der Phasengrenzfläche befindlichen Mikrosphären wird vom Öl-5000 gleichermaßen minimiert wie vom Öl-1000.

Da wegen der Unlöslichkeit von Ascorbinsäure in Silikonöl keine Diffusion von Ascorbinsäure aus den Sphären durch das Silikonöl in die wässrige Phase stattfinden kann, werden kaum Unterschiede im Ascorbinsäurekonzentrationsverlauf zwischen der Verwendung des hoch- und niedrigviskosen Öls gefunden.

Analoge Versuche wurden mit Ascorbinsäure beladenen ABA-Mikrosphären durchgeführt. In Abb. 55 ist der zeitliche Konzentrationsverlauf der Ascorbinsäure in der wässrigen Phase bei Verwendung der ABA-Mikrosphären gezeigt.

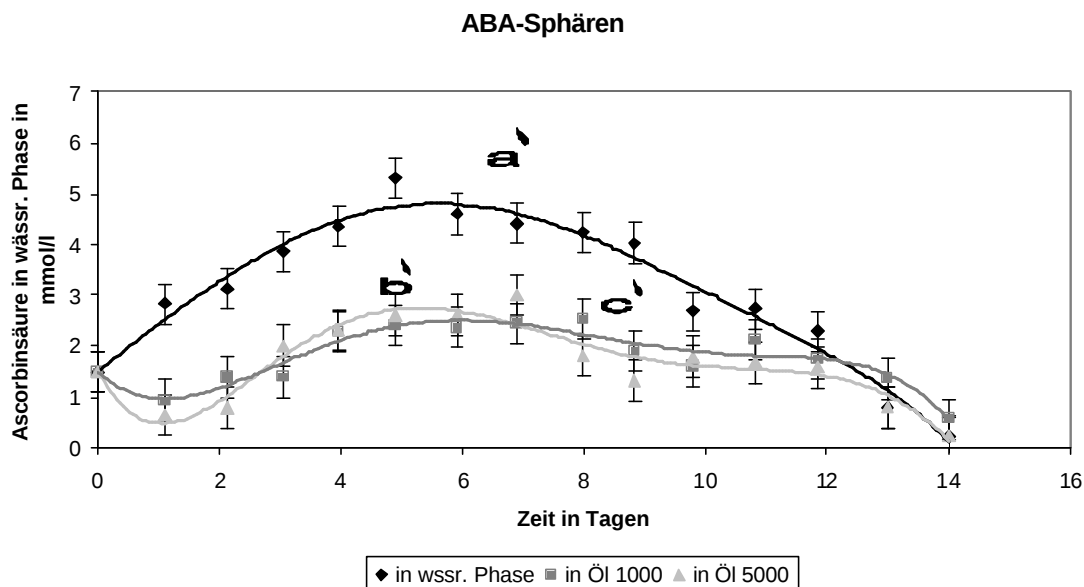


Abb. 55 Freisetzung von Ascorbinsäure aus ABA-Mikrosphären in eine 1,5 mM PBS-gepufferte Ascorbinsäurelösung bei 37°C, wobei die Sphären a') direkt in die wässrige Phase ohne Überschichtung der wässrigen Phase mit Silikonöl, b') in eine die wässrige Phase überschichtende niedrigviskose Silikonölphase Sil-Oil 1000® (adato) und c') in eine die wässrige Phase überschichtende hochviskose Silikonölphase Sil-Oil 5000® (adato) gegeben wurden. Die Kurven geben den zeitlichen Konzentrationsverlauf in der wässrigen Phase wieder. Die Versuche wurden in lichtundurchlässigen Gefäßen durchgeführt.

Die Zugabe von mit Ascorbinsäure beladenen ABA-Mikrosphären in die wässrige 1,5 mmolare Ascorbinsäurelösung führt wie bei der Verwendung der PDLLA-Mikrosphären zu einem schnellen Konzentrationsanstieg und hat nach 4,9 Tagen mit

5,3 mmol/l einen Maximalwert erreicht. Nach 14 Tagen wird nur noch eine therapeutisch unwirksame Ascorbinsäurekonzentration von 0,2 mmol/l in der wässrigen Phase detektiert. Bei der Überschichtung der wässrigen Phase mit Silikonöl und Platzierung der Sphären ins Öl sinken die ABA-Mikrosphären an die Phasengrenzfläche zwischen wässriger und Silikonöl-Phase. Zunächst geht die Ascorbinsäurekonzentration in der wässrigen Phase zurück, wobei nach 1,1 Tagen bei der Verwendung des hochviskosen Öls-5000 (Experiment c') 0,65 mmol/l und bei der Verwendung des niedrigviskosen Öls-1000 (Experiment b') 0,94 mmol/l gemessen wird. Ein anschließender Anstieg ergibt bei dem hochviskosen Öl-5000 nach 6,9 Tagen ein Maximalwert von 3,01 mmol/l und bei dem niedrigviskosen Öl-1000 nach 8,0 Tagen ein Maximum von 2,52 mmol/l. Anschließend nimmt die Konzentration langsam ab und erreicht nach 14 Tagen bei Verwendung des Öls-5000 und nach 15 Tagen bei Verwendung des Öls-1000 therapeutisch irrelevante Mengen an Ascorbinsäure in der wässrigen Phase. In Abb. 56 ist eine mit Ascorbinsäure beladene ABA-Mikrosphäre gezeigt.

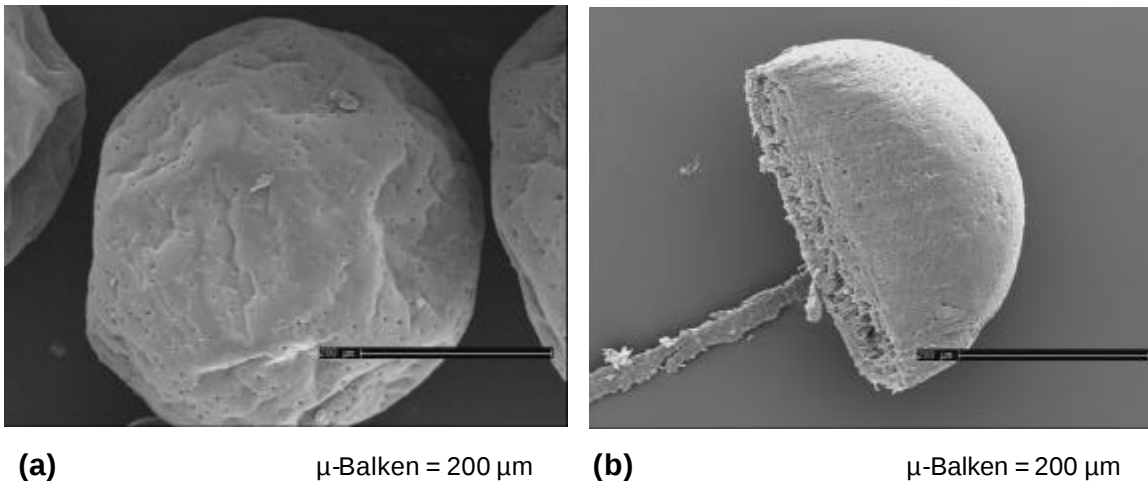


Abb. 56 REM-Aufnahmen einer mit Ascorbinsäure beladenen ABA-Mikrosphäre (a) und Querschnitt (b).

Die Oberfläche der mit Ascorbinsäure beladenen ABA-Mikrosphären erweist sich als porenreich. Der Querschnitt zeigt eine schwammartige, von Kavitäten und Kanälen bestimmte Struktur im Inneren der Sphäre. Werden die ABA-Mikrosphären in die 1,5 mmolare Ascorbinsäurelösung gegeben, so findet, wie bei der Verwendung der Ascorbinsäure beladenen PDLLA-Mikrosphären auch, die Diffusion des Wirkstoffs durch Poren und Kanäle statt. Der Freisetzungsmechanismus der Ascorbinsäure aus

ABA-Mikrosphären entspricht dabei dem der PDLLA-Mikrosphären. Durch Überschichtung der Ascorbinsäurelösung mit einer Silikonöltamponade und Zugabe der Ascorbinsäure beladenen ABA-Mikrosphären ins Silikonöl kann die Freisetzung der Ascorbinsäure aus den an der Phasengrenzfläche von Silikonöl und wässriger Phase sich ansiedelnden Sphären in die wässrige Phase herabgesetzt werden.

Die Freisetzung von Ascorbinsäure aus PDLLA- bzw. ABA-Mikrosphären in eine 1,5 mmolare Ascorbinsäurelösung bewirkt die Aufrechterhaltung eines Ascorbinsäurespiegels in der wässrigen Phase von über zwei Wochen. In den Mikrosphären wird die Ascorbinsäure vor einem Abbau zu 2,3-Dioxo-L-gulonsäure und weiteren Degradationsprodukten geschützt.

4 Wirkstofffreisetzung aus Nanosphären bei Stents für die Verhinderung von Restenose

Der Begriff Angioplastie ist in der Medizin eine gebräuchliche Bezeichnung für verschiedene Methoden zur Beseitigung von Gefäßeinengungen, sogenannten Gefäßstenosen, welche beispielsweise durch Arterienverkalkungen verursacht werden. Mit Hilfe folgender medizinischer Eingriffe kann eine Gefäßverengung behandelt werden:

Die Laserangioplastie ist ein Verfahren, bei der die Beseitigung der Verkalkungen in den Gefäßen mit Hilfe eines Lasers erfolgt. Dabei wird ein Laserkatheter an die Stelle der arteriosklerischen Plaques gebracht und durch Photoablation entfernt¹⁰¹. Die Gewebeabtragung entsteht durch einen lokalen thermischen Prozeß, der je nach der im bestrahlten Gewebe erzielten Temperatur und der Dauer der Temperatureinwirkung zur Karbonisierung oder Vaporisation des Gewebes führt.

Die Rotationsangioplastie ist eine Möglichkeit, Ablagerungen aus den Gefäßen mechanisch zu entfernen. Dabei wird ein Diamant besetzter Bohrkopf auf den flexiblen Antriebsschaft des Führungskatheters gesetzt, wobei die Plaques durch die schnelle Rotation entfernt werden¹⁰¹.

Die perkutane transluminale coronare Angioplastie (PTCA) ist ein Verfahren zur Weitung verengter Gefäße¹⁰¹. Dabei wird ein Ballonkatheter an die Engstelle im Gefäß gebracht und dort aufgebläht (9-21 bar). Dadurch wird das Material der stenoisierenden Plaques in die Gefäßwand gepresst. Für eine erfolgreiche Aufdehnung des Gefäßes muss der Vorgang meist mehrfach wiederholt werden. Nicht selten kommt es allerdings zu akuten Gefäßverschlüssen nach der Behandlung. In 30–50 % der Fälle entsteht nach einigen Monaten eine behandlungsbedürftige Restenose^{102,103}. Bei der PTCA oder zur Vorbeugung einer Restenose kann die Implantation einer Gefäßstütze zur mechanischen Stabilisierung der Gefäßwand erforderlich sein. Er fixiert Kalkfragmente in den Gefäßen und verbessert die Fließeigenschaften des Blutes im Gefäß. Außerdem bewirkt ein Stent einen Widerstand gegen Rückstellkräfte des aufgedehnten Gefäßabschnittes.

Mit der Entwicklung von Koronarstents verband sich Ende der 1980er Jahre die Hoffnung, nicht nur die Akutverschlüsse nach PTCA effektiv zu beherrschen¹⁰⁴, sondern auch die Restenoserate signifikant zu senken. Koronarstents senken das Restenoserisiko von 30-50% auf 25-35%¹⁰¹. Dabei konnte das Problem einer sogenannten In-Stent-Restenose bislang nicht gelöst werden. Restenosen nach PTCA entstehen durch elastische Rückstellmechanismen (recoil) und Umbauprozesse der Gefäßwand (remoulding). Die durch Rückstellkräfte verursachte Gefäßverengung kann durch die Stentimplantation weitestgehend verhindert werden. Die unkontrollierte Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen kann jedoch nicht verhindert werden, sondern wird im Gegenteil noch gefördert. Sie stellt eine Reaktion der Gefäßwand auf die Verletzung während PTCA oder Stentimplantation dar¹⁰⁵.

Durch Traumatisierung der Gefäßwand bei der PTCA oder Stentimplantation können sich glatte Muskelzellen ungebremst vermehren. Der Zellzyklus verläuft in verschiedenen Phasen. Es wird zwischen der Mitosephase (M-Phase) und der Interphase unterschieden. Die Interphase bildet den Zeitraum zwischen zwei Mitosen. Während der Interphase liegt die Erbsubstanz in den Zellkernen in fadenähnlichen Strukturen, dem Chromatin vor. Das Wachstum der Zellkerne während der Interphase wird in die sich an die Mitosephase anschließende G₁-Phase (Wachstumsphase 1), S-Phase (Synthesephase) und G₂-Phase (Wachstumsphase 2) unterteilt. Die G₁-Phase ist das Wachstumsstadium der Zelle. In diesem Zeitraum werden Ribonucleinsäuren und Proteine synthetisiert, und Tochterzellen wachsen zur Größe der Mutterzelle an. In der S-Phase wird durch Neubildung der Desoxyribonucleinsäure die Erbsubstanz verdoppelt. An die S-Phase schließt sich die postsynthetische Wachstumsphase (G₂-Phase) an. In ihr liegen die Chromatinfäden bereits verdoppelt vor. Der überwiegende Teil der Zellen hat die Teilungsaktivität eingestellt und befindet sich in der sogenannten G₀-Phase, das heißt bezüglich der Zellteilung in einer Ruhephase (G₀-Pool).

Die zu der Mitose gehörende Prophase schließt sich an die G₂-Phase an. Die in Form von Chromatinfäden vorliegende Erbsubstanz bildet sich durch Verdichten und Verkürzen zu Chromosomen aus. Jedes Chromosom besteht aus zwei Längsstrukturen, den Chromatiden. Weiterhin werden in dieser Phase sogenannte Spindelfasern gebildet, welche von einem Zellpol zum anderen verlaufen. Diese Fasern bilden gemeinsam den Spindelapparat.

Mit Hilfe der Kernspindel erfolgt später die Verteilung der Chromatiden. Die weitere Zellteilung vollzieht sich während der sich an die Prophase anschließenden Metaphase, Anaphase und Telophase.

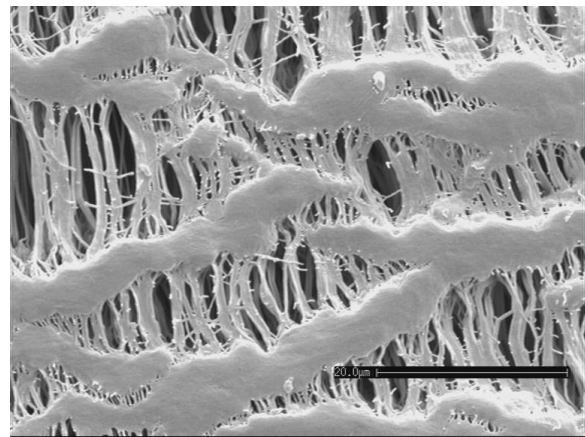
Zur Verhinderung des Zellwachstums und der Zellteilung werden in der Medizin sogenannte Zytostatika eingesetzt. Die im G_0 -Pool befindlichen Zellen sind weitestgehend resistent gegenüber allen Zytostatika. Eine Hemmung des Zellzyklus ist durch die Unterbrechung der Mitose möglich. Dies gelingt unter anderem durch die Störung des Spindelapparates. Zytostatika hemmen entweder den Aufbau oder die Desaggregation der Kernspindel und somit die Verteilung der Chromatiden. Der zytostatische Wirkstoff Paclitaxel unterbindet während der Prophase hauptsächlich die Entstehung von Kernspindeln und somit die spätere Verteilung der Chromatiden. Das Zellwachstum wird durch diesen Wirkstoff während der Mitose blockiert und die Zelle stirbt schließlich ab^{106,107}.

Während der vergangenen Jahre wurden verschiedene Therapieansätze zur Prävention einer In-Stent-Restenose mit systemischer Applikation von Substanzen mit zytostatischer Wirkung durchgeführt. In keiner dieser Studien konnte jedoch ein messbarer Effekt nachgewiesen werden, was höchstwahrscheinlich auf eine zu geringe Konzentration der applizierten Substanz zurückzuführen ist^{101,105}. Eine ideale Möglichkeit bietet die Applikation eines Medikaments zusammen mit einem Stent, welcher mit einem Wirkstofffreisetzungssystem ausgerüstet ist. Deshalb wurden spezielle Medikamente freisetzende Stents (*drug eluting stents DES*) entwickelt und in ersten klinischen Studien getestet, wobei die größten Erfahrungen zur Zeit für Paclitaxel vorliegen¹⁰¹. In Studien mit Paclitaxel zeigten sich Restenoserraten zwischen 0 % und 4 %¹⁰⁸. Auch im Langzeitverlauf zeichnet sich ab, dass mit Paclitaxel beschichtete Stents eine Restenosierung verhindern¹⁰⁹.

Im Rahmen dieser Arbeit soll gezeigt werden, dass eine ausreichend hohe Beladung eines Stents mit Wirkstoffen möglich ist, indem Dexamethason bzw. Paclitaxel beladene Nanosphären in die Poren einer den Stent ummantelnden e-PTFE-Schicht eingebracht werden. Der von der Fa. Angiomed zur Verfügung gestellte Stent ist sandwichartig zwischen zwei e-PTFE-Folien eingebettet (Abb. 57). Dabei sollen Nanosphären aus Poly(D,L-lactid-co-TMC)(90:10) in ihrer Größe so angepasst werden, dass sie in den Poren der e-PTFE-Folie verankert werden können.



μ Balken = 500 μ m



μ -Balken = 20 μ m

Abb. 57

links: REM Aufnahme eines zwischen zwei e-PTFE-Folien sandwichartig eingebetteten Stents (Querschnitt)
rechts: e-PTFE-Folie

4.1 Poly(D,L-lactid-co-TMC)(90:10) als Matrixmaterial

Sphärische Nanopartikel wurden nach der o/w-Lösungsmittel-Evaporationsmethode aus Poly(D,L-lactid-co-TMC)(90:10) hergestellt. Die Methode bezieht sich auf einer modifizierten Arbeitsvorschrift von Gerner et al.¹¹⁵. Die Dispergierung erfolgte in einem Homogenisator, wobei eine enge Verteilung durch Ultraschallbehandlung eingestellt wurde^{115,116}. Um Nanosphären in die Poren einer e-PTFE Folie einbringen zu können, ist es notwendig, diese mit einer definierten Größe herzustellen. Ein Parameter, der sich bei der Nanosphärenherstellung nach der o/w Lösungsmittel Evaporationsmethode auf die Teilchengröße auswirkt, ist die Konzentration des Polymers in der organischen Phase. Wie aus Abb. 58 ersichtlich, nimmt die Partikelgröße mit steigender Polymerkonzentration exponentiell zu. Die Bestimmung der mittleren Durchmesser der Partikel erfolgte direkt mit Hilfe von Streulichtmessungen an den frisch hergestellten Proben.

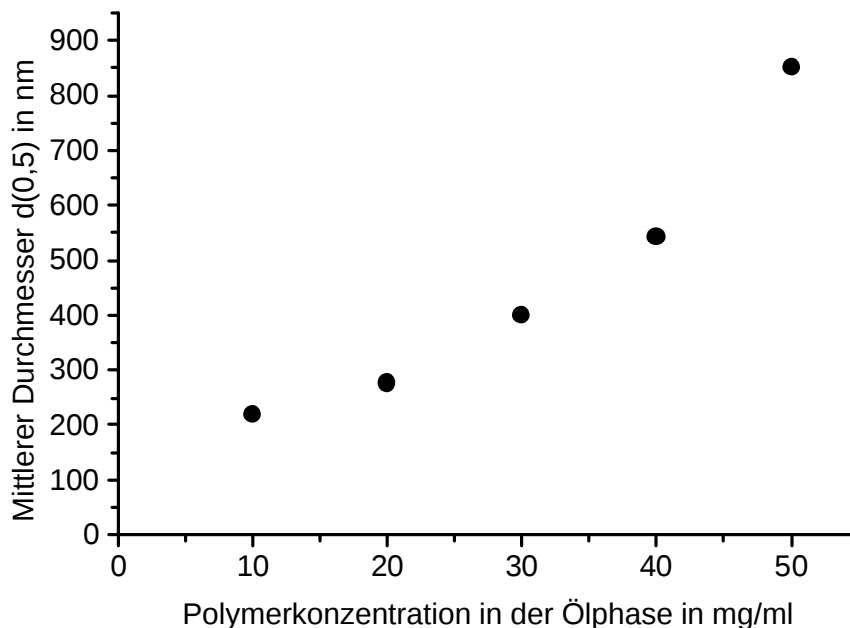


Abb. 58 Einfluss der Poly-(D,L-lactid-co-TMC)(90:10)-Konzentration in der Ölphase bei der o/w Lösungsmittel-Evaporationsmethode auf den mittleren volumenbezogenen Durchmesser der Nanosphären.

4.2 Verankerung von Nanosphären in einer e-PTFE Schicht bei Stents

Die Isolierung der Nanosphären erfolgte durch Zentrifugieren sowie zwei Waschprozessen mit Wasser und anschließende Gefriertrocknung. Die getrockneten Sphären bilden ein Agglomerat, welches sich selbst durch Ultraschallbehandlung nicht mehr in eine Suspension umwandeln lässt (Abb. 59).

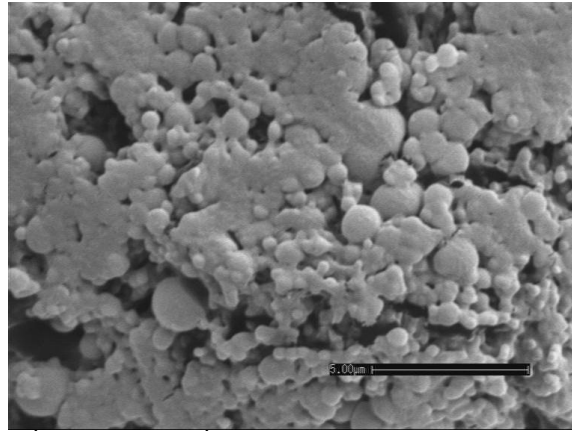


Abb. 59 REM-Aufnahme von durch Zentrifugation isolierten und gefriergetrockneten Nanosphären aus Poly-(D,L-lactid-co-TMC)(90:10).

Während der Isolierung der Nanosphären über Zentrifugation wirkt eine Zentrifugalkraft auf die Sphären ein, die die Agglomeration der Sphären verursacht. Aus diesem Grunde wurden die Nanosphären direkt, ohne Isolierung, mit einer Beladungsvorrichtung in den Stent gepumpt. In Abb. 60 ist die Beladungsvorrichtung schematisch dargestellt.

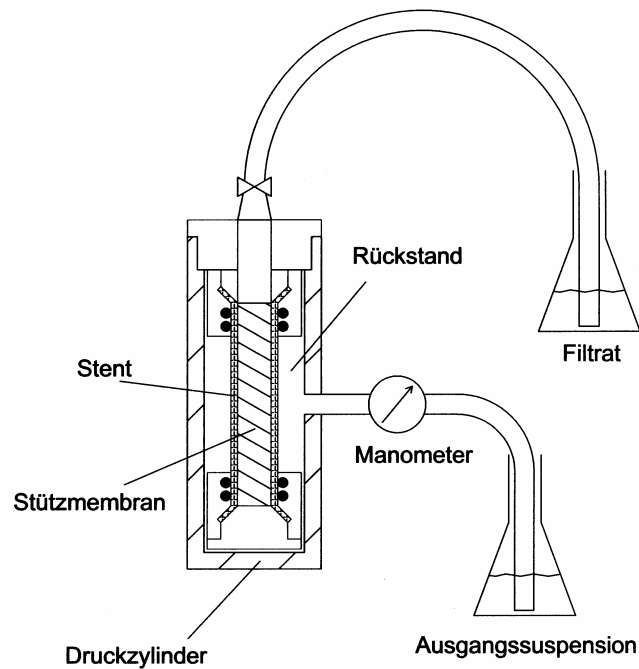
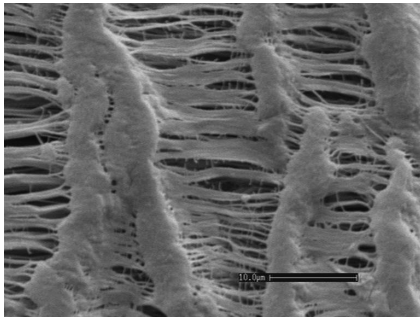
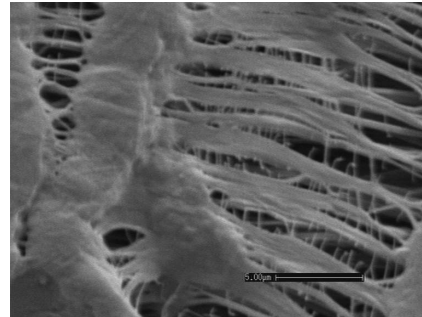


Abb. 60 Schematische Darstellung der Beladungsvorrichtung für die Einbringung von Nanosphären in eine e-PTFE-Schicht eines *wrapped stent*

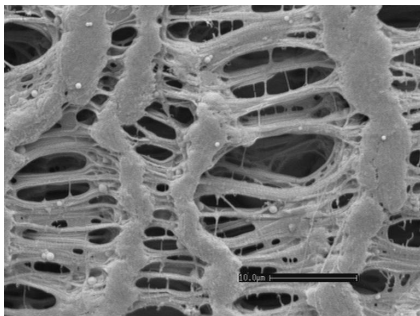
Der e-PTFE ummantelte Stent befand sich zur Beladung mit Nanosphären in einem Druckzylinder, der seitlich ein Einlassventil besitzt. Dabei wurde die Stentröhre am unteren Ende durch eine spezielle Verschraubung abgedichtet. An der oberen Stentseite befindet sich ebenfalls eine Verschraubung, die im Gegensatz zur unteren Vorrichtung über eine zweite Verschraubung mit dem Druckzylinder befestigt ist. Diese besitzt über ein Ausgangsventil eine Öffnung nach außen. Poly-(D,L-lactid-co-TMC)(90:10)-Nanosphären wurden in verschiedenen Größenverteilungen hergestellt, wobei die jeweils frische Nanosphärensuspension durch das Eingangsventil in den Druckzylinder gepumpt und anschließend durch die e-PTFE-Ummantelung gepresst wurde. Die auf diese Weise beladenen Stents wurden rasterelektronenmikroskopisch untersucht (Abb. 61).



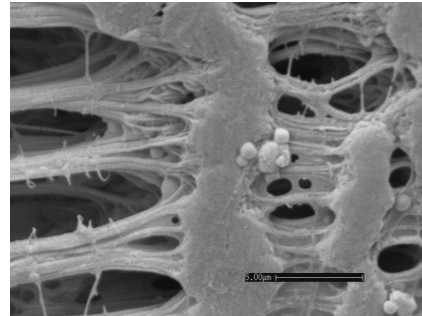
Blindprobe 0 μ -Balken = 10 μ m



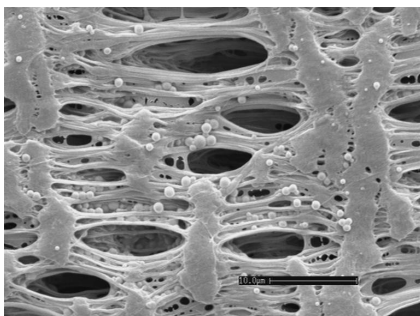
μ -Balken = 5 μ m



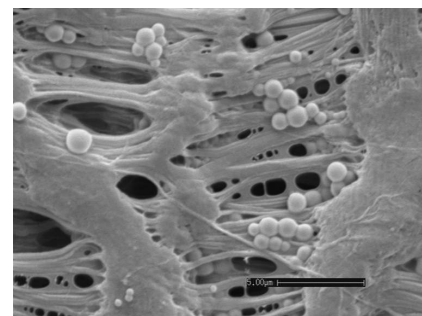
Probe a 220nm μ -Balken = 10 μ m



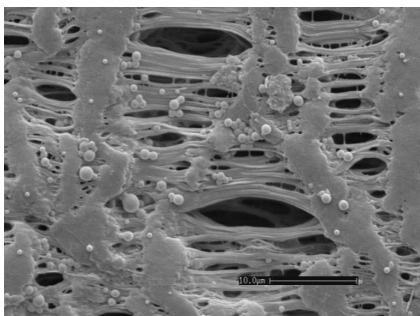
μ -Balken = 5 μ m



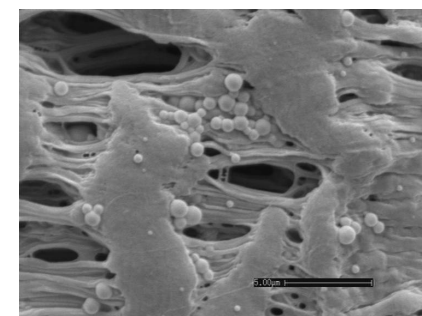
Probe b 276nm μ -Balken = 10 μ m



μ -Balken = 5 μ m



Probe c 400nm μ -Balken = 10 μ m



μ -Balken = 5 μ m

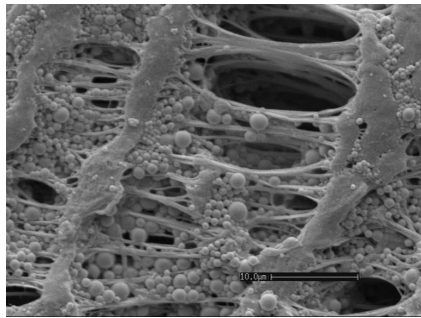
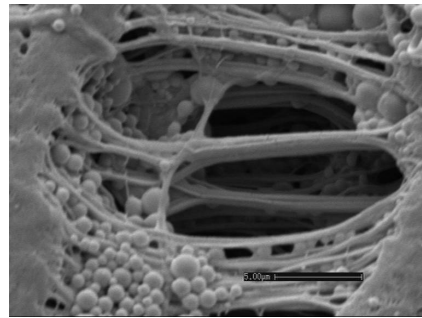
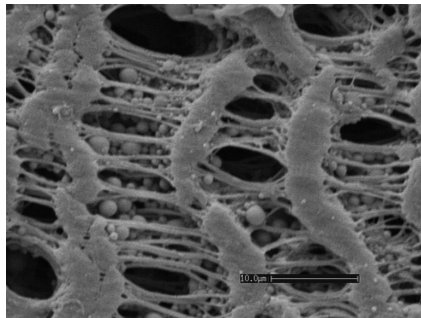
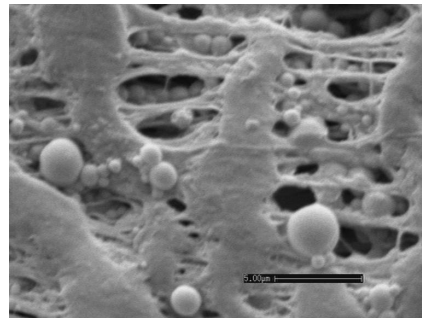
**Probe d** 542nm μ -Balken = 10 μ m μ -Balken = 5 μ m**Probe e** 852nm μ -Balken = 10 μ m μ -Balken = 5 μ m

Abb. 61 REM-Aufnahmen eines unbeladenen e-PTFE ummantelten Stents (Blindprobe 0) sowie mit Nanosphären unterschiedlicher Größe beladene Stents: a) 220nm, b) 276nm, c) 400nm, d) 542nm und e) 852nm.

Abb. 61-0 zeigt eine unbeladene e-PTFE-Folie und dient als Vergleichsprobe. Die Poren besitzen eine Länge von etwa 5 μ m bis 20 μ m und eine Breite von etwa 2 μ m bis 5 μ m. In Abb. 61 a bis e sind die beladenen Folien gezeigt. Es zeigt sich, dass die Beladungsdichte der Nanosphären in den Folien eine Abhängigkeit von der Sphärengrößenverteilung besitzt. Mit zunehmendem Radius nimmt die Anzahl an Sphären pro Bildausschnitt zu. Die in Abb. 61 gezeigten linken REM-Aufnahmen wurden alle bei gleicher Vergrößerung aufgenommen, so dass der gezeigte Bildausschnitt die gleiche absolute Fläche von 1670 μ m² zeigt. Für jedes Bild wurde die Anzahl n an Nanosphären pro 1670 μ m² ermittelt. Die Ergebnisse sind in Tab. 25 zusammengefasst.

Tab. 25 Anzahl der Sphären, die sich in dem Bildausschnitt von $1670 \mu\text{m}^2$ der REM-Aufnahmen (Abb. 61) befinden.

	Mittlere Sphärengroße d in nm	Anzahl n Sphären pro $1670 \mu\text{m}^2$
Abb. 61-0	0	0
Abb. 61-a	220	31
Abb. 61-b	276	99
Abb. 61-c	400	128
Abb. 61-d	542	303
Abb. 61-e	852	120

Die Anzahl an sichtbaren Sphären pro Bildausschnitt geht durch ein Maximum, welches für die 542 nm Sphären mit 303 Sphären erreicht wird. Im Falle zu kleiner Sphären beziehungsweise zu großer Poren der e-PTFE-Schicht können keine Partikel in der e-PTFE-Matrix festgehalten werden. Dies gilt für Nanosphären im Bereich unter $300 \mu\text{m}$.

Die Betrachtungsweise der Sphärenanzahl pro Bildausschnitt unterliegt großen Schwankungen, und es wurden lediglich Sphären auf der Stentoberfläche berücksichtigt. Daher wurden die bei der Beladung der e-PTFE ummantelten Stents anfallenden Suspensionen gesondert hinsichtlich ihrer Partikelgrößen untersucht. Dabei fiel einmal das Filtrat an, also die Fraktion, die den Stentmantel passiert hatte, und zum anderen die Fraktion, die den Stentmantel nicht passiert hatte und sich nach der Beladung noch im Druckzylinder befand, der hier mit Rückstand bezeichnet wird. Die Partikelgrößen des Filtrats und des Rückstands dieser beiden Suspensionen wurden mit den Partikelgrößen der Ausgangssuspensionen verglichen und sind in Abb. 62 dargestellt.

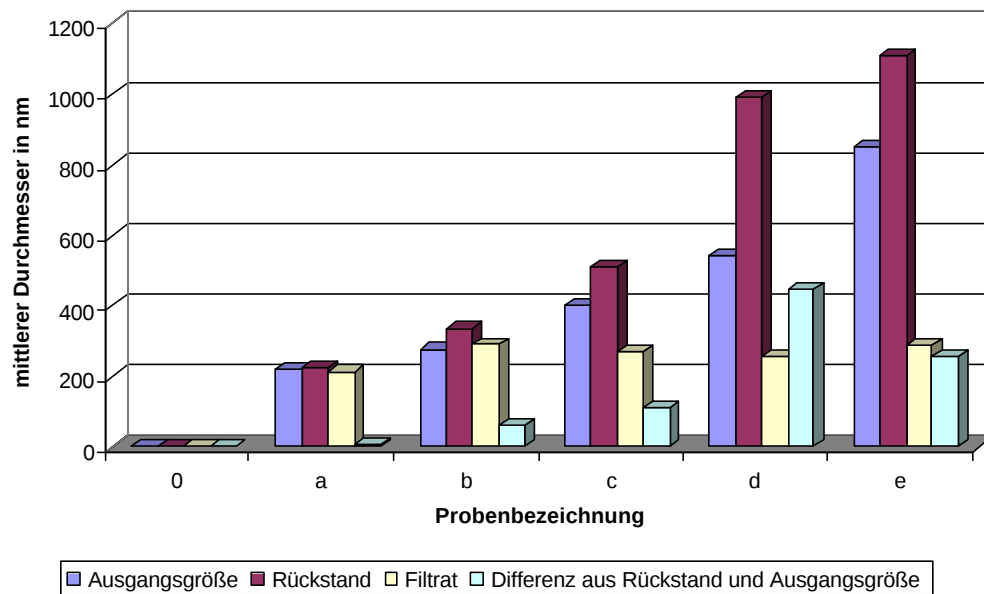


Abb. 62 Vergleich der mittleren Partikelgrößen in den einzelnen Suspensionen, die während der Beladung eines e-PTFE ummantelten Stents mit Nanosphären anfallen.

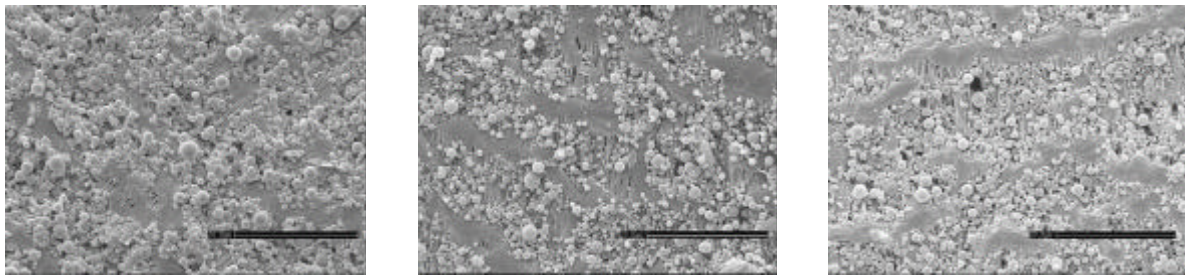
Die ermittelten mittleren Partikelgrößen für die Filtrate liegen alle in einem engen Bereich von 211 nm bis 289 nm. Partikel dieser Größenordnung können die e-PTFE-Schicht durchdringen. Die mittleren Partikelgrößen, die im Rückstand gemessen wurden, steigen für die einzelnen Proben mit steigender Partikelgröße der Ausgangssuspension an, wobei die Funktion einen Wendepunkt zwischen den Proben d und e aufweist. Zusätzlich ist in Abb. 62 noch die Differenz aus Rückstand und Ausgangsgröße aufgetragen.

Die mittleren Partikelgrößen, die im Rückstand gemessen wurden, weisen größere Werte auf als die jeweiligen mittleren Partikelgrößen der Ausgangssuspensionen. Die in der e-PTFE-Schicht zurückbleibenden Sphären und die Sphären, die die e-PTFE-Schicht passiert haben, tragen nicht mehr zur Größenverteilung der Rückstandssuspension bei. Im Rückstand bleiben die Sphären zurück, die zu groß sind, um in die e-PTFE-Schicht einzudringen. Die jeweilige Rückstandssuspension verarmt während der Beladungen der e-PTFE-Schicht mit Nanosphären an kleinen Sphären, und die mittlere Partikelgröße der jeweiligen Rückstandssuspension verschiebt sich zu größeren Werten. Mit der mittleren Partikelgröße der Ausgangssuspension werden alle vorhandenen Nanosphären eines Ansatzes berücksichtigt.

Da die mittlere Partikelgröße des Rückstandes die Sphären nicht mit einbezieht, die in der e-PTFE-Schicht stecken bzw. die e-PTFE-Schicht passiert haben, lässt sich aus der Differenz der mittleren Partikelgröße der Rückstandssuspension und der mittleren Partikelgröße der Ausgangssuspension ablesen, wie stark die Ausgangssuspension während der Beladung der e-PTFE-Schicht mit Nanosphären verarmt.

Da die Partikelgrößen im Filtrat für alle Proben etwa gleiche Werte unter 300 nm aufweisen, kann die Differenz aus den mittleren Partikelgrößen von Rückstandssuspension und Ausgangssuspension als ein qualitatives Maß für die Beladungseffektivität gesehen werden. Diese durchläuft für Probe d ein Maximum. Die Probe a mit einem mittleren Ausgangsdurchmesser von 220 nm zeigt für die Ausgangsgröße, Rückstand und Filtrat vergleichbare Werte. Für diese Partikel stellt die e-PTFE-Schicht keine Barriere dar.

Zur Untersuchung der Haftung der Sphären in und auf der e-PTFE-Schicht, wurden e-PTFE ummantelte Stents mit Nanosphären aus Poly-(D,L-lactid-co-TMC)(90:10) mit einem mittleren Durchmesser von 542 nm beladen. Während eines Freisetzungsexperiments dürfen die Nanosphären nicht von der umgebenden Lösung herausgewaschen werden. Diesbezüglich wurde ein beladener Stent in sechs Längsstreifen geschnitten, wobei die einzelnen Segmente für unterschiedlich definierte Zeiten bei 37°C in einer PBS-Puffer Lösung belassen wurden. Da der Stent während der Beladung mit Nanosphären senkrecht in der Beladungsvorrichtung aufgehängt war, wurde außerdem die Beladungsverteilung der Sphären in Abhängigkeit von der Stenthöhe untersucht. In Abb. 63 sind REM-Aufnahmen eines unteren, mittleren und oberen Stentsegments gezeigt.



0 Tage

unteres Stentsegment

6 Tage

mittleres Stentsegment

57 Tage

oberes Stentsegment

μ -Balken = 20 μ m

Abb. 63 REM-Aufnahmen verschiedener mit Nanosphären beladener Stentsegmente, die unterschiedliche definierte Zeiten in einer PBS-Pufferlösung bei 37°C belassen wurden.

Die REM-Aufnahmen zeigen unabhängig vom betrachteten Stentsegment zunächst für alle Proben eine einheitliche Beladungsdichte. Es ist keine Tendenz einer Abhängigkeit der Beladungsdichte von der Stenthöhe erkennbar. Somit ist eine homogene Verteilung der Sphären gewährleistet. In Abhängigkeit von der Verweilzeit im Freisetzungsmedium ist ebenfalls keine Änderung in der Sphärendichte zu erkennen, weder in Abhängigkeit von der Stenthöhe noch von der Behandlungsdauer in PBS-Puffer bei 37°C. Die Sphärenmorphologie zeigt zudem keine signifikanten Veränderungen im Vergleich zur unbehandelten Probe (0 Tage).

4.3 Freisetungsverhalten von Dexamethason aus Poly(D,L-lactid-co-TMC)(90:10)-Nanosphären

Dexamethason beladene Nanosphären aus Poly-(D,L-lactid-co-TMC)(90:10) wurden in einen e-PTFE ummantelten Stent eingebracht. Das Freisetzungsexperiment wurde bei 37°C in PBS-Puffer unter Sink-Bedingungen durchgeführt.

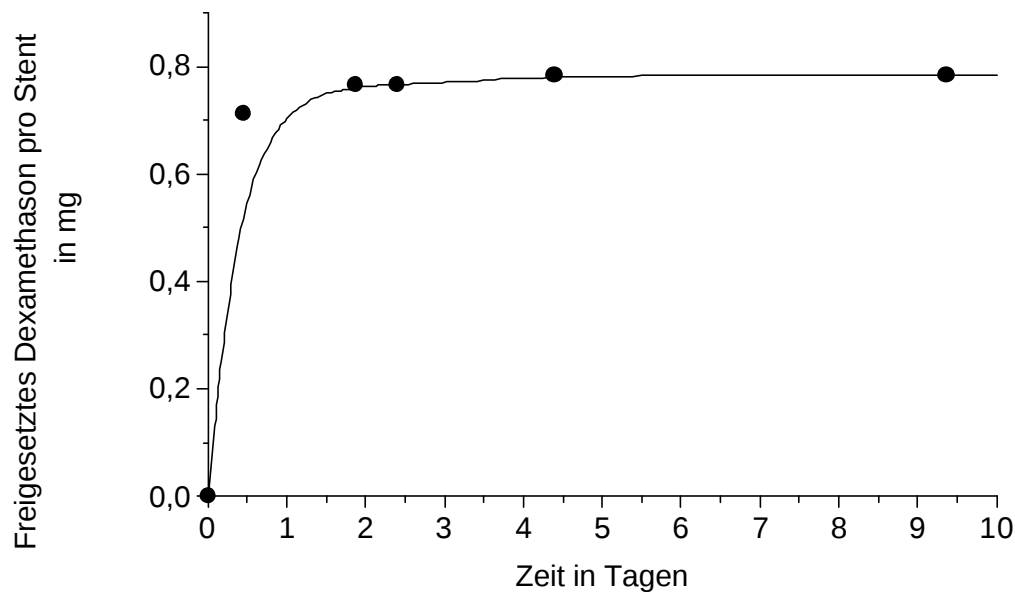


Abb. 64 Kumulative Auftragung der Freisetzung von Dexamethason aus Poly-(D,L-lactid-co-TMC)(90:10)-Nanosphären, die in einen e-PTFE ummantelten Stent eingebracht waren, bei 37°C in PBS-Puffer unter Sink-Bedingungen.

Die Freisetzung von Dexamethason ist nach 4,4 Tagen beendet (Abb. 64). Es werden 0,78 mg Dexamethason freigesetzt, was für eine medizinische Anwendung eine geeignete therapeutische Menge darstellt¹¹⁰. Die geforderte Freisetzungsdauer von etwa 30 Tagen wird allerdings weit unterschritten. Die Freisetzung findet hier aus Nanosphären mit einer sehr großen Oberfläche statt, was die schnelle Freisetzung erklärt. Außerdem stellt Dexamethason mit einem Molekulargewicht von $M = 392,45$ ein für den Einsatz in Wirkstofffreisetzungssystemen kleines Molekül dar. Die Diffusion von Stoffen durch eine Polymermatrix kann mit Hilfe des freien Volumens innerhalb des Polymers beschrieben werden. Es wird postuliert, dass individuelle

freie Volumenelemente im Polymer so betrachtet werden können, als hätten sie eine bestimmte Größenverteilung^{78,111}. Demnach steht einem kleinen penetrierenden Molekül eine größere Anzahl an freien Volumenelementen zur Verfügung als großen Molekülen, und kleine Moleküle besitzen darum einen höheren Diffusionskoeffizienten als große Moleküle. Während der Inkorporation von Dexamethason in Nanosphären nach der o/w-Lösungsmittel-Evaporationsmethode diffundiert eine große Menge Wirkstoff in die wässrige PVA-Lösung. Frisch hergestellte Nanosphären wurden zentrifugiert, gefriergetrocknet und anschließend in Chloroform aufgelöst. Die quantitative Bestimmung des Wirkstoffes in dieser Lösung erfolgte UV-spektroskopisch, wobei eine Beladung von 9,1 Gew-% gefunden wird (Tab. 26).

Tab. 26 Vergleich der UV-spektroskopisch ermittelten Beladung von Dexamethason enthaltenden Poly-(D,L-lactid-co-TMC)(90:10)-Nanosphären mit der freigesetzten Menge an Dexamethason, die aus dem Freisetzungsexperiment resultiert.

	Menge an Sphären in mg	Dexamethason in mg	Dexamethason in %
UV-Bestimmung	220,13	20,13	9,1
Freisetzungsexperiment	7,3	0,77	10,5

Im Freisetzungsexperiment wird 0,77 mg Dexamethason aus 7,3 mg Nanosphären freigesetzt. Das entspricht einem Massenanteil von 10,5 Gew-% und liegt in der Größenordnung der UV-spektroskopisch ermittelten Beladung der Nanosphären mit Dexamethason von 9,1 Gew-%. Die Freisetzung von Dexamethason aus Poly-(D,L-lactid-co-TMC)(90:10)-Nanosphären in eine PBS-Pufferlösung weist somit eine hohe Freisetzungseffektivität auf.

4.4 Freisetzungsverhalten von Paclitaxel aus Poly-(D,L-lactid-co-TMC)(90:10)-Nanosphären

Es wurde ein weiteres Medikament zur Verhinderung der In-Stent-Restenose in Nanosphären nach der o/w-Lösungsmittel-Evaporationsmethode inkorporiert. Dabei handelt es sich um Paclitaxel, ein zytostatisch wirkendes Medikament, welches in vielen aktuellen Studien als wirksames Medikament zur Verhinderung einer Restenosierung beschrieben wird^{101, 108, 109}. Die quantitative Bestimmung des Paclitaxels erfolgte mit Hilfe der HPLC-MS-Analytik. In Abb. 65 ist das HPL-Chromatogramm einer Paclitaxel-Probe zusammen mit dem Massenspektrum der HPLC-Fraktion, die nach 10,32 min eluiert wird, gezeigt. Das Signal bei $m/z = 854,4$ im Massenspektrum entspricht dem einfach protonierten Paclitaxel. Der Elutionspeak im HPL-Chromatogramm nach 10,32 min kann dem Paclitaxel zugeordnet werden.

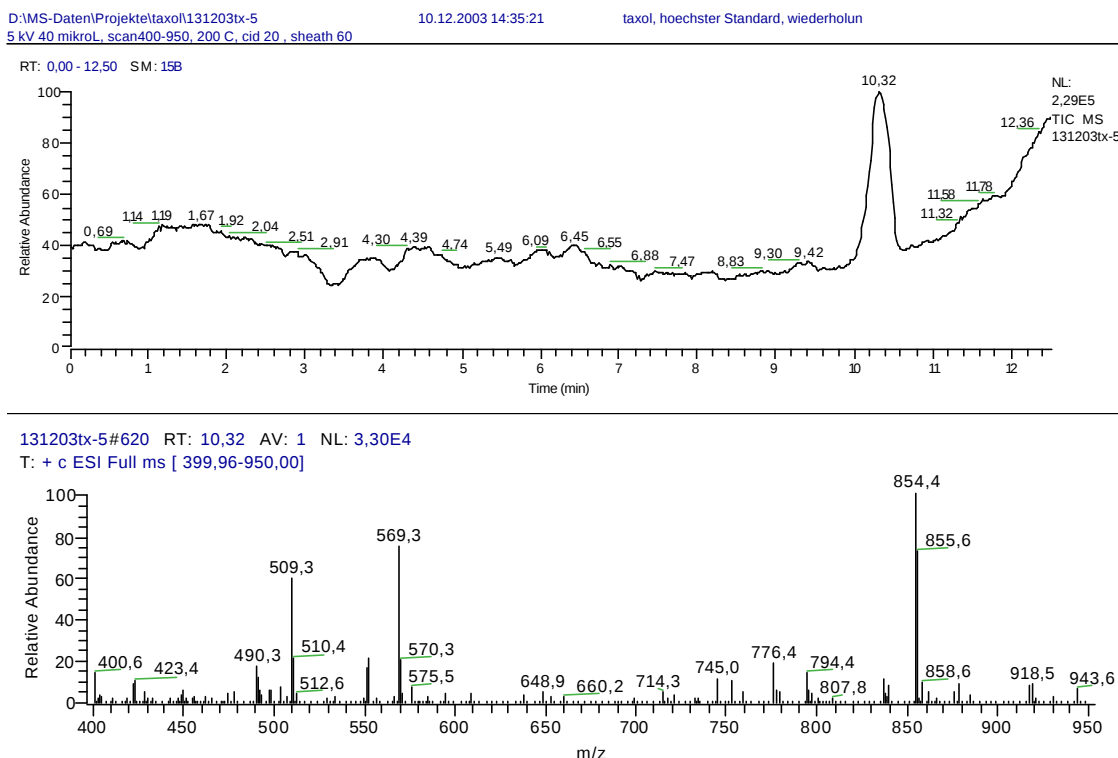


Abb. 65 Oben: HPLC-Trennung einer Paclitaxel-Probe

Unten: Massenspektrum der HPLC-Fraktion bei 10,3 min.

Das Signal bei $m/z = 855,6$ ist ein Artefakt der Datenaufnahme und wurde bei wiederholten Messungen in unterschiedlichen Intensitäten vorgefunden.

In Abb. 66 ist das Freisetzungsprofil von Paclitaxel aus Poly-(D,L-lactid-co-TMC)(90:10)-Nanosphären, die in einem e-PTFE ummantelten Stent eingebracht wurden, gezeigt.

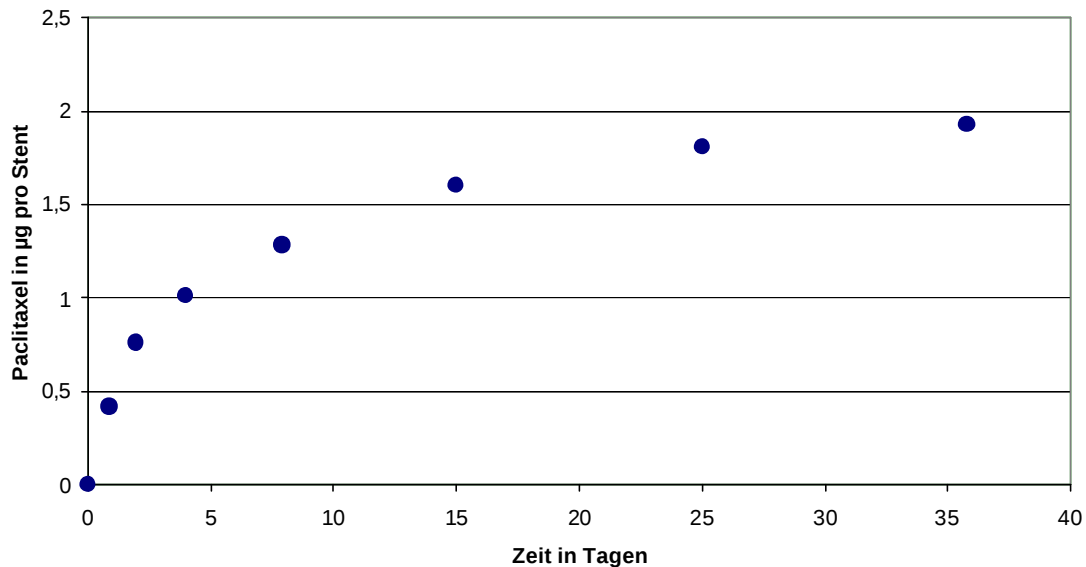


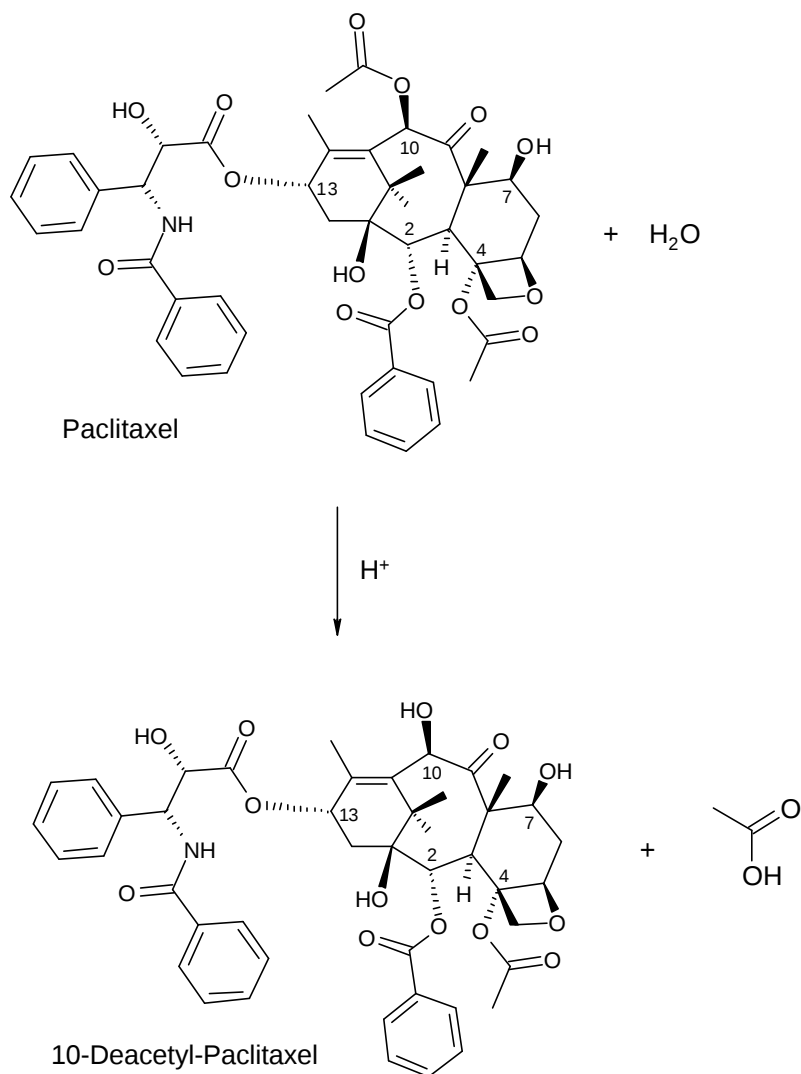
Abb. 66 Kumulative Auftragung der Freisetzung von Paclitaxel aus Poly-(D,L-lactid-co-TMC)(90:10)-Nanosphären, die in einem e-PTFE ummantelten Stent eingebracht waren, bei 37°C in PBS-Puffer unter Sink-Bedingungen.

Die Freisetzung von Paclitaxel verläuft über einen Zeitraum von etwa 37 Tagen, wobei 2 µg Paclitaxel freigesetzt werden. Da Paclitaxel sehr hydrophob ist, diffundiert während der Herstellung wenig Wirkstoff in die wässrige, kontinuierliche PVA-Phase. Zur Ermittlung der Beladung der Nanosphären wurden frisch hergestellte und mit Paclitaxel beladene Nanosphären gefriergetrocknet und anschließend in Chloroform gelöst. In Tab. 27 sind die praktische und virtuelle Beladung der mit Paclitaxel beladenen Nanosphären im Stent und die Beladung der ohne Stentverankerung hergestellten Paclitaxel beladenen Nanosphären gegenübergestellt.

Tab. 27 Vergleich der HPLC-analytisch ermittelten Beladung von Paclitaxel enthaltenden Poly-(D,L-lactid-co-TMC)(90:10)-Nanosphären mit der praktischen und virtuellen Beladung, die aus dem Freisetzungsexperiment resultiert.

Paclitaxel-Nanosphären	Menge an Sphären in mg	Paclitaxel in mg	Beladung in Gew-%
praktische Beladung (Nanosphären nicht im Stent verankert)	11,6	2,53	21,8
virtuelle Beladung (Nanosphären im Stent)	9	0,002	0,1
praktische Beladung (Nanosphären im Stent)	9	2,12	23,5

Die HPLC analytisch ermittelte Paclitaxelmenge in 11,6 mg Poly-(D,L-lactid-co-TMC)(90:10)-Nanosphären beträgt 2,53 mg und entspricht einer praktischen Beladung der nicht in der e-PTFE-Schicht des Stents verankerten Nanosphären von 21,8 Gew-%. Der e-PTFE ummantelte Stent war mit 9 mg Nanosphären beladen. Somit sollten nach der praktischen Beladung der nicht im Stent verankerten Nanosphären von 21,8 Gew-% 1,96 mg Paclitaxel im Stent vorhanden sein, obwohl nur 2 µg freigesetzt werden, was einer virtuellen Beladung der im Stent verankerten Nanosphären von 0,1 % entspricht. Der Restgehalt an Wirkstoff im Stent wurde ebenfalls untersucht, indem der Stent nach 57 Tagen im Freisetzungsexperiment gefriergetrocknet wurde, um anschließend die noch im Stent verbliebenen Nanosphären mit Chloroform herauszulösen. Dabei wurde qualitativ massenspektroskopisch nachgewiesen, dass Paclitaxel über 57 Tage in den Nanosphären stabil bleibt und im wässrigen Milieu keine Zersetzung erfährt. Im sauren Milieu erfährt Paclitaxel eine Deacetylierung an der Position 10 zu 10-Deacetylpaclitaxel (Schema 5).



Schema 5 Deacetylierung von Paclitaxel zu 10-Deacetylpaclitaxel im sauren Milieu¹¹².

Bei neutralen pH-Wert ist Paclitaxel sehr beständig^{112,113}. Die bei der Degradation des Polylactidblocks des Poly-(D,L-lactid-co-TMC)(90:10) entstehenden Protonen werden vom PBS-Puffer abgepuffert, so dass die Deacetylierung des Paclitaxels nicht auftreten kann. Die HPLC-analytisch detektierte Menge an Paclitaxel beträgt 2,12 mg und entspricht einer praktischen Beladung von 23,5 Gew-% der im Stent verankerten Nanosphären. Paclitaxel ist sehr hydrophob und besitzt daher wenig Neigung, in ein hydrophiles Medium zu diffundieren.

5 Experimenteller Teil

5.1 Chemikalien, Polymere und Lösungsmittel

Wirkstoffe und Modellsubstanzen

2,2',4,4'-Tetrahydroxybenzophenon (*Uvinul D-50*TM), 2,2'-Dihydroxy-4,4'-dimethoxybenzophenon-5,5'-dinatriumsulfonat (*Uvinul-DS49*TM) und 2-Hydroxy-4-methoxybenzophenon (*Uvinul M-40*TM) wurden freundlicherweise von der Firma BASF, Ludwigshafen zur Verfügung gestellt.

Ascorbinsäure (reinst, p.a.) und Dexamethason wurden von der Firmengruppe Sigma Aldrich Chemie GmbH (Deisenhofen, Deutschland) bezogen.

Paclitaxel wurde von der Fa. Labomedic, Bonn bezogen.

Polymere

Poly(D,L-lactid) Resomer R208, batch no. 260316 ($M_n = 100000$) und Poly(D,L-lactid)-co-TMC (90:10) wurden freundlicherweise von der Firma Boehringer Ingelheim KG (Ingelheim, Deutschland) zur Verfügung gestellt.

Polyethylenoxid ($M_n \sim 2000$) wurde von der Firma Merck, Polyvinylalkohol 10 98 ($M_w = 61000$) wurde von der Firmengruppe Sigma-Aldrich Chemie GmbH bezogen.

Lösungsmittel

Chloroform wurde mit Reinheitsgrad pro analysi von der Firma Merck bezogen, Diethylether und Hexan wurden mit dem Reinheitsgrad pro analysi von der Firmengruppe Sigma-Aldrich Chemie GmbH bezogen.

Der verwendete PBS Puffer wurde in Tablettenform von der Firmengruppe Sigma-Aldrich Chemie GmbH bezogen, der für die Ringöffnungspolymerisation verwendete Katalysator Zinn(II)-2-Ethylhexanoat ebenso. Die für die Freisetzung von Ascorbinsäure benutzten Silikonöle Sil-Oil 5000[®] (adato) bzw. Sil-Oil 1000[®] (adato) wurden freundlicherweise von der Klinik für Ophthalmologie des Universitätsklinikums der RWTH Aachen zur Verfügung gestellt. Die e-PTFE ummantelten Stents wurden von der Firma Angiomed GmbH & Co Medizintechnik KG, Karlsruhe freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

5.2 Synthese von Poly-(D,L-lactid)-co-PEO-co-poly-(D,L-lactid)

Eine genau eingewogene Menge Polyethylenoxid wurde in einem Reaktionsrohr vorgelegt und mit einer definierten Menge D,L-Lactid und Zinn(II)-2-Ethylhexanoat als Katalysator versetzt. Nach Zugabe eines Rührfisches wurde das Rohr evakuiert, anschließend mit Stickstoff befüllt und nochmals evakuiert und zugeschmolzen. Das Reaktionsrohr wurde 9 h auf 140°C erhitzt und gerührt. Nach Erkalten wurde das Polymer aus Methylenchlorid/Hexan umkristallisiert. Es wurde ein zweites Mal aus Methylenchlorid/Diethylether umkristallisiert und das Polymer abfiltriert. Das Polymer wurde 48 h im Vakuumtrockenschrank bei 40°C getrocknet. Die Einwaagen sind in Tab. 28 zusammengestellt.

Tab. 28 Bei der Synthese des ABA-Polymers verwendeten Einwaagen

PEO in g	2	2	0,5	0,1
Lactid in g	5	10	5	5
Verhältnis Lactid/PEO	2,5	5	10	50

5.3 Methoden

5.3.1 Herstellung von Poly-(D,L-lactid) und Poly-(D,L-lactid)-co-PEO-co-poly-(D,L-lactid)-Mikrosphären nach der o/w-Lösungsmittel-Evaporations-Methode

Die Herstellung von Mikrosphären aus Poly-(D,L-lactid) bzw. Poly-(D,L-lactid)-co-PEO-co-poly-(D,L-lactid) erfolgte nach einer modifizierten Vorschrift von Paz¹¹⁴ in einem 1000 ml Glasreaktor mit Heizmantel und Vakuumrührdichtung. Der Druck wurde mit Hilfe einer Membranpumpe VAC 503 mit Vakuum-Controller V800 der Firma Büchi eingestellt. Die kontinuierliche Phase bestand aus 900 ml einer 4%igen (w/v) PVA-Lösung ($M_w = 61.000$), in der eine definierte Menge an Modellsubstanz bzw. Wirkstoff gelöst wurde (Tab. 29). 1 ml Span 20 wurde zu der kontinuierlichen Phase zugegeben. Die disperse Phase bestand aus 3 g Polymer, welches in 30 ml Dichlormethan gelöst wurde. Nachdem das Polymer gelöst war wurde eine definierte Menge an Modellsubstanz bzw. Wirkstoff (Tab. 30) mit einer Korngröße $< 50\mu\text{m}$ dazugegeben. Die beiden Phasen wurden vereinigt und man ließ 4 h bei einer Rührgeschwindigkeit von 300 rpm und einer Temperatur von 25 °C Rühren, wobei der Druck schrittweise auf 250 mbar reduziert wurde. Die Mikrosphären wurden anschließend über Mikrosiebe (20 μm ; 300 μm ; 710 μm ; 1000 μm) fraktioniert, dreimal mit Wasser gewaschen und gefriergetrocknet.

Tab. 29 In der kontinuierlichen Phase gelöste Modellsubstanz- bzw. Wirkstoffmenge.

Modellsubstanz / Wirkstoff	Angereichert in kontinuierlicher Phase in g
DS-49	5,00
D-50	1,00
M-40	0,02
Ascorbinsäure	90,0

Tab. 30 In der dispersen Phase vorgelegte Modellsubstanz bzw. Wirkstoffmenge bezogen auf die verwendete Polymermenge von 3 g.

Theoretische Beladung	17%	13%	9%
Wirkstoffmenge in mg	600	450	300

5.3.2 Herstellung von Poly-(D,L-lactid-co-TMC)(90:10)-Nanosphären nach der o/w Lösungsmittel-Evaporations-Methode

Die Herstellung von Nanopartikeln aus Poly-(D,L-lactid-co-TMC)(90:10) nach der o/w-Lösungsmittel-Evaporationstechnik wurde nach einer modifizierten Arbeitsvorschrift von Goerner et al.^{115, 116} durchgeführt. Zur gezielten Größeneinstellung wurde die Polymerkonzentration in der organischen Phase variiert. Eine definierte Menge Poly-(D,L-lactid-co-TMC)(90:10) (Tab 31) wurde in 5 ml Methylenchlorid gelöst und anschließend in 50 ml einer gefilterten 4 %igen (w/v) wässrigen PVA-Lösung (Mw = 61.000) gegeben. Die Mischung wurde 30 s mit einem Homogenisator (Vortex Ika Ultra Turrax 25 T basic, Staufen im Breisgau, Germany) bei 150.000 rpm und 0 °C behandelt und sofort anschließend mit einer Ultraschallspitze (Branson Sonifier 450, Danbury, CT, USA) 120 s behandelt. Die so hergestellte Öl-in-Wasser-Emulsion wurde in einen 500 ml Kolben gegeben und die organische Phase vorsichtig unter stufenweiser Reduktion des Drucks am Rotationsverdampfer entfernt. Der Druck muss vorsichtig vermindert werden, um eine zu starke Schaumbildung zu vermeiden. Die erhaltene Suspension wurde für die Beladung e-PTFE ummantelter Stents direkt weiterverarbeitet (siehe Abschnitt 5.3.3).

Tab. 31 Poly-(D,L-lactid-co-TMC)(90:10)-Einwaagen bei der Herstellung von Nanosphären nach der o/w-Lösungsmittel-Evaporationsmethode und erhaltene Durchmesser.

Einwaagen Polymer in mg	Mittlere Durchmesser in nm
50	220
100	276
150	400
200	542
250	852

5.3.3 Beladung von e-PTFE ummantelten Stents mit Nanosphären

Die von der Fa. Angiomed GmbH & Co. zur Verfügung gestellten e-PTFE ummantelten Stents wurden mit einer speziellen Beladungsvorrichtung (Abb. 60 Seite 116) mit Nanosphären bestückt. Zunächst wurde eine Stützmembran in den Stent geschoben, um zu verhindern, dass der Stent während des Beladungsvorganges unter dem Druckaufbau kollabiert. Der untere Teil des Stents wurde mit zwei Gummidichtungsringen über eine Metallschelle mit einem Gewindeendstück verschraubt und somit abgedichtet. Mit dem oberen Teil des Stents wurde ebenso verfahren, wobei dieses Gewindestück eine Schlaucholive und ein zweites Gewinde besaß. Über das zweite Gewinde wurde der Stent mit einem Druckzylinder verschraubt. Dieser besaß ein Einlassventil, durch welches die Nanosphärensuspension mit einem bestimmten Druck gepumpt werden konnte. Die nach Vorschrift 5.3.2 frisch produzierten Nanosphären wurden über ein Pumpsystem mit Manometer direkt durch den e-PTFE ummantelten Stent gepumpt, wobei ein Druck von 2 bar nicht überschritten wurde. Nach der Beladung wurde der Stent der Vorrichtung entnommen, gut mit dest. Wasser gewaschen und anschließend gefriergetrocknet.

5.3.4 *In vitro* Freisetzungsexperimente

Mikrosphären in PBS Puffer

Die Freisetzungsexperimente wurden in PBS-Puffer bei 37°C unter Sink-Bedingungen durchgeführt, wobei die Konzentration der Modellsubstanz im Puffer 30% der Sättigungskonzentration nicht überschritt.

Die *in vitro* Freisetzungsexperimente erfolgten in 50 ml Zentrifugenröhrchen in einem Schüttelinkubator (Frequenz: 200 min⁻¹). Nach definierten Zeiten wurde das Lösungsmittel abdekantiert und durch frischen Puffer ersetzt. Der Gehalt an Modellsubstanz wurde UV-spektroskopisch bestimmt.

Freisetzung von Ascorbinsäure aus Mikrosphären

Die *in vitro* Freisetzungsexperimente erfolgten in 15 ml Zentrifugenröhrchen in 15 ml PBS-Puffer bei 37°C in einem Schüttelinkubator (Frequenz: 200 min⁻¹). In der wässrigen Phase wurde eine Ascorbinsäurekonzentration von 1,5 mmol/l eingestellt und mit 2 ml eines Silikonöls (Sil-Oil 5000® (adato) bzw. Sil-Oil 1000® (adato)) überschichtet. Die Sphären wurden direkt auf das Silikonöl gegeben und sanken bis zur Phasengrenzfläche. Täglich wurden 240 µl der wässrigen Phase entnommen und durch das gleiche Volumen frischen Puffers ersetzt. Der Gehalt an Ascorbinsäure der entnommenen Probe wurde UV-spektroskopisch bestimmt.

Freisetzung aus Stents

Die *in vitro* Freisetzungsexperimente von Dexamethason bzw. Paclitaxel aus Nanosphären beladener Stents erfolgte in 15 ml Zentrifugenröhrchen in 15 ml PBS-Puffer bei 37°C in einem Schüttelinkubator (Frequenz: 200 min⁻¹). Zu definierten Zeiten wurde der PBS-Puffer durch frischen ersetzt und der Dexamethasongehalt UV-spektroskopisch, der Paclitaxelgehalt HPLC-MS-analytisch bestimmt.

5.3.5 Abbauversuche an resorbierbaren Mikrosphären

Eine definierte Menge m_o resorbierbarer Sphären wurde in 15 ml Zentrifugenröhrchen eingewogen und in 15ml PBS-Puffer bei 37°C in einem Schüttelinkubator (Frequenz: 200 min⁻¹) gegeben. Das Lösungsmittel wurde in der ersten Woche täglich gewechselt und danach jeden zweiten Tag. Nach definierten Zeiten wurden die Sphären entnommen und im Vakuumexsiccator bis zur Gewichtskonstanz getrocknet (erhaltene Masse = m_e).

Der prozentuale Massenabbau der Sphären wurde gemäß

$$m_{\text{Sphären}} = \frac{m_e}{m_o} * 100 \quad \text{Gl. 4}$$

berechnet.

5.3.6 Bestimmung der Löslichkeit der Modellsubstanzen in Wasser bzw. Methylenchlorid

Die Löslichkeit der Modellsubstanzen DS-49, D50 bzw. M-40 in Wasser bzw. Dichlormethan wurde bestimmt, indem jeweils soviel Modellsubstanz in 250 ml Lösungsmittel gegeben wurde, dass ein Bodensatz vorlag.

Die Suspension wurde 24 h gerührt. Nach 24 h wurde filtriert und 200 ml der Lösung entnommen und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Aus der erhaltenen Masse der zurückbleibenden Modellsubstanz ließ sich die Löslichkeit der jeweiligen Modellsubstanz im entsprechenden Lösungsmittel gemäß

$$\text{Löslichkeit} = \frac{\text{Masse}_{\text{Modellsubs.}}}{\text{Volumen}_{\text{Lösungsmittel}}} \quad \text{Gl. 5}$$

berechnen.

Für die Bestimmung der Löslichkeit von DS-49 in CH₂Cl₂ und von D-50 bzw. M-40 in Wasser wurde jeweils 500 ml Lösungsmittel eingesetzt und 400 ml Lösung zur Massenbestimmung der gelösten Modellsubstanz im Lösungsmittel entnommen.

5.4 Analytik

5.4.1 UV-Vis Spektroskopie

Zur Bestimmung der Wirkstoff- und Modellsubstanzkonzentrationen wurde ein Zweistrahl-UV/Vis-Spektrometer Lambda EZ 210 der Fa. Perkin Elmer verwendet. Hierzu wurden für die jeweiligen Substanzen Konzentrationsreihen in den entsprechenden Lösungsmitteln erstellt und mit den dazugehörenden, gemessenen Extinktionen die Kalibriergeraden erstellt. Die Spektren wurden mit einer Auflösung von 0,5 nm und einer Abtastgeschwindigkeit von 100 nm/min aufgenommen. Die Auswertung erfolgte mit der Software Pessw, Version 1.2, Revision E.

5.4.2 Kernmagnetische Resonanz-Spektroskopie

Die ^1H -NMR-spektroskopischen Untersuchungen wurden mit einem Inova 400 Spektrometer (400 MHz, Varian Associates Nuclear Magnetic Resonance Instruments, Palo Alto, USA) in deuteriertem Chloroform (CDCl_3) durchgeführt. Tetramethylsilan (TMS) wurde als interner Standard mit einer chemischen Verschiebung δ von 0,0 ppm verwendet.

5.4.3 Rasterelektronenmikroskopie (REM)

Die Probe wurde mit doppelseitigem Klebeband auf dem Probenträger befestigt und über eine Kathodenzerstäubung mit einem Sputtergerät S 150 B der Fa. Edwards im Vakuum mit Gold bedampft. Die rasterelektronischen Aufnahmen wurden mit einem Rasterelektronenmikroskop der Fa. Leica S 360, Bensheim angefertigt. Beschleunigungsspannung 15 kV, Arbeitsabstand 15 mm.

5.4.4 Massenverlust

Der Massenverlust der Mikrosphären wurde gravimetrisch verfolgt. Eine definierte Menge an Sphären wurde eingewogen (100-150 mg) und in 15 ml PBS Puffer bei 37°C in einen Schüttelinkubator (GFL[®] Burgwedel, Deutschland; Schüttelfrequenz 100 min⁻¹) gegeben. Um Sink-Bedingungen zu gewährleisten wurde das Lösungsmittel in der ersten Woche täglich, dann alle zwei Tage gewechselt. Nach definierten Zeiten wurden die Sphären entnommen und im Vakuumexsiccator bis zur Gewichtskonstanz getrocknet.

5.4.5 DSC

Die DSC-Messungen wurden mit einem DSC 204 Phoenix Gerät der Fa. Netzsch, Selb, Deutschland durchgeführt.

Die Proben wurden in abgedichteten Aluminiumpfännchen in einem Temperaturbereich von -50°C bis 150°C gemessen. Die Heiz- bzw. Abkühlrate betrug 10°C/min. Alle Messungen wurden unter einem getrockneten Stickstoffstrom durchgeführt.

Die Auswertung der DSC-Thermogramme erfolgte mit der Software Proteus Analysis der Firma Netzsch.

5.4.6 Gelpermeationschromatographie

Lösungsmittel:	THF (HPLC grade), mit 250 mg/l 2,6-Di-tert-butyl-4-methylphenon (Fa. Aldrich)
Autosampler:	Schambeck SFD S5200
Pumpe	ERC HPLC Pumpe Modell 64200
UV Detektor	ERC 7215, Messung bei 254 nm
RI Detektor	ERC 7515A, Messung bei 128 nm temperiert bei 35°C
Fluss	1,0 ml/min

Säulenkombination:

THF MZ-Gel (d=8,0 mm, l=50 mm) 50 Å (Vorsäule)
 MZ-Gel (d=8,0 mm, l=300 mm) 50 Å
 MZ-Gel (d=8,0 mm, l=300 mm) 100 Å
 MZ-Gel (d=8,0 mm, l=300 mm) 1000 Å
 MZ-Gel (d=8,0 mm, l=300 mm) 10000 Å

(MZ: Fa. MZ Analysentechnik Mainz)

Die Partikelgröße der Gele betrug 5 µm.

Die Eichung erfolgte mit PMMA-Eichproben. Als Messaufnahme- und Auswertesoftware wurde das Programmpaket NTeqGPC 6 der Firma HS benutzt.

5.4.7 HPLC-MS

Die HPLC-Messungen wurden mit einem HP 1100 Gerät der Firma Agilent, Waldbronn Deutschland mit Degasser, binärer Pumpe, Autosampler, Säulenofen und Diodenarraydetektor (DAD) durchgeführt. Die Auswertung der Messergebnisse erfolgte mit der Software Chemstation A.09.03.

Gerätespezifikationen:

Säule: Nukleosil 100-5 C-18, 250 mm x 4 mm
Column Flow: 0,6 ml/min
Stoptime: 30.00 min
Säulentemperatur: 35°C
Wellenlänge: 228 nm

Lösungsmittel:

Lösungsmittel A: Wasser
Lösungsmittel B: Acetonitril

Tab. 32 Lösungsmittelgradient

Zeit in min	Lösungsmittel B in %
0.00	40.0
10.00	100.0
12.00	100.0
27.00	40.0

Nach dem DAD konnte eine gewünschte Fraktion mit einem Single-Stage-Quadropul-Massenspektrometer MS SSQ 7000 der Firma Finnigan MAT, Bremen Deutschland untersucht werden.

Gerätespezifikationen

Sheath Gas: 60 psi (Stickstoff)

(Die durch eine Kapillare strömende flüssige Phase (HPLC-Eluat) wird durch eine am Ende der Kapillare angelegte Hochspannung mit Unterstützung eines Gasflusses (Sheath Gas) während der Electrospray-Ionisation (ESI) in geladene Tröpfchen versprüht.)

Ionisierung bei 5 kV Spray

Kapillartemperatur: 200°C

Collision Induced Dissoziation (CID): 20 V

Scanbereich: 400-950 m/z

Die Messergebnisse wurden mit der Software ICIS 8.3.0. (Finnigan) ausgewertet.

6 Anhang

Interpretation der ^1H -NMR-Spektren von Poly-(D,L-lactid)-co-PEO-co-poly-(D,L-lactid) und Bestimmung des Molekulargewichtes $M_n^{117,118,119}$

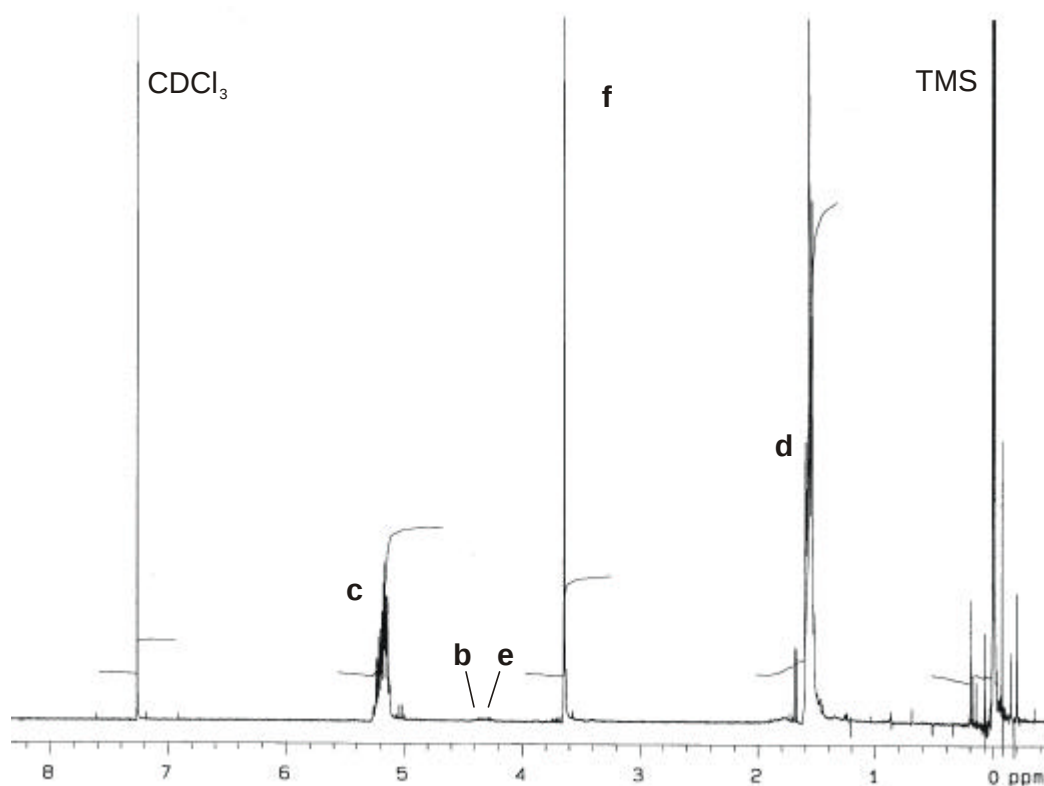


Abb. A 1 ^1H -NMR-Spektrum von Poly-(D,L-lactid)-co-PEO-co-poly-(D,L-lactid) aufgenommen in CDCl_3

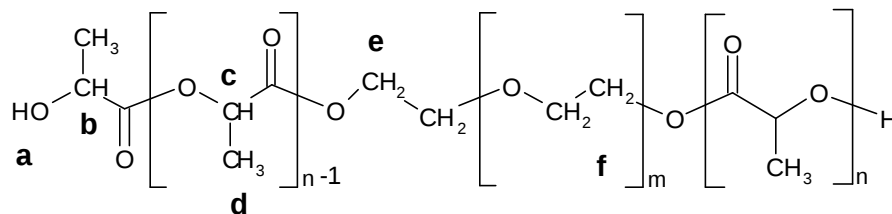


Abb. A 2 Poly-(D,L-lactid)-co-PEO-co-poly-(D,L-lactid)

Tab. A 1 Zuordnung der Signale im ^1H -NMR Spektrum.

Signal	d ppm	Protonen	Multiplizität
1	1,52-1,61	d	bs
2	3,64	f	bs
3	4,24-4,40	b, e	m
4	5,11-5,27	c	m

Für die Copolymerisation wurde ein PEO mit einem Molekulargewicht von 2000 verwendet, so dass über diese Methylenprotonen das Molekulargewicht eines Lactidblockes berechnet werden konnte. M_n pro Lactid-Block wurde anhand folgender Formel berechnet:

$$M_n = \frac{I_1}{I_2} * 2184 \quad \text{Gl. 6}$$

I_1 = Intensität bei 1,52-1,61 ppm

I_2 = Intensität bei 3,64 ppm

Tab. A 2 Mittlere Durchmesser $d(0,5)$ in nm der Poly-(D,L-lactid-co-TMC)-Nanosphären-Suspensionen, die während der Beladung anfallen.

Ausgangssuspension	Rückstand	Filtrat
220	227	211
276	335	289
400	512	268
542	991	256
852	1109	287

7 Literatur

-
- ¹ S. Weihe, M. Epple, *Rubin Forschungsmagazin der Ruhr-Universität Bochum*, (2/2001), 18-23.
- ² XXIX. Internationaler Kongress der ESAO in Wien (31.08.2002).
- ³ Winet H. Bao J.Y., *J. Biomed. Mater. Res.*, **40**, (1998), 567-576.
- ⁴ Lu L., Stamatas G.N., Mikos A.G., *J. Biomed. Mater. Res.*, **50**, (2000), 440-451.
- ⁵ Heller J., *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*, **1** (1984), 39.
- ⁶ Edwards D.A., Hanes J., Caponetti G., Hrkach J., Ben-Jebria A., Eskew M., Mintzes J., Deaver D., Lotan N., Langer R., *Science*, **276**, (1997), 1868.
- ⁷ Wintermantel E., Ha S. W., "Biokompatible Werkstoffe und Bauweisen – Implantate für Medizin und Umwelt", Springer-Verlag, Berlin; Heidelberg; New York, (1996).
- ⁸ Tsuruta T., Hayashi T., Kataoka K., Ishihara K., Kimura Y., „Biomedical application of polymeric materials“, CRC Press, Boca Raton, (1993), 1-15.
- ⁹ Wichterle O., Lim D., *Nature*, **185**, (1960), 117-118.
- ¹⁰ Folkman J., Long D. M., Rosenbaum R., *Science*, **154**, (1966), 148-149.
- ¹¹ Frazza E. J., Schmitt E. E., *J. Biomed. Mater. Res. Symp*, **1**, 43-58.
- ¹² Yolles S., Eldridge J., Woodland J. H. R., *Polymer News*, **1**(4-5), (1971), 9-15.
- ¹³ Yolles S., *Polym Sci Techn (Plenum)*, **8**, (1975), 245-61.
- ¹⁴ Merkli A., Tabatabay C., Gurny R., Heller J., *Prog. Polym.Sci.*, **23**, (1998), 563-580.
- ¹⁵ Ranade V., „*J. Clin. Pharmacol.*“, **30**, (1990), 10-23.
- ¹⁶ Plum G., "Beschichtung von Ca-Alginat-Sphären für den Einsatz in der Biotechnologie", Diplomarbeit RWTH-Aachen, (2000).
- ¹⁷ Burkoth A.K., Anseth K.S., *Biomaterials*, **21**, (2000), 2395-2404.
- ¹⁸ Burkoth A.K., Burdick J, Anseth K.S., *J. Biomed. Mater. Res.*, **51**, (2000), 352-359.
- ¹⁹ Muggli D.S., Burkoth A.K., Anseth K.S., *J. Biomed. Mater. Res.*, **46**, (1999), 271-278.
- ²⁰ Lendlein A., *ChiuZ*, **5**, (1999), 276-295.
- ²¹ Vert M., Li S. M., Spenlehauer G., Guerin P., *Journal of materials science: Materials in medicine*, **3**, (1992), 432-446.
- ²² Göpferich A., *Macromolecules*, **30**, (1997), 2598-2604.
- ²³ Göpferich A., *Biomaterials*, **17**(2), (1996), 103-114.
- ²⁴ Göpferich A. and Langer R., *Macromolecules*, **26**, (1993), 4105-4112.
- ²⁵ von Burkersroda F., Schedl L., Göpferich A., *Biomaterials*, **23**, (2002), 4221-4231.
- ²⁶ Park T.G., *J. Contr. Rel.*, **30**, (1994), 161-173.
- ²⁷ Park T.G., *Biomaterials*, **16**(15), (1995), 1123-1130.
- ²⁸ Lu L., Garcia C. A., Mikos A. G., *J Biomed Mater Res*, **46**, (1999), 236-44.
- ²⁹ Zong X.H., Wang Z.G., Hsiao B.S., Chu B., *Macromolecules*, **32**, (1999), 8107-8114.
- ³⁰ Mauli Agrawal C., Athanasiou K. A., *J. Biomed. Mater. Res.*, **38**, (1997), 105-14.
- ³¹ Tsuji H., Nakahara K., *J. Appl. Polym. Sci.*, **86**, (2002), 186-194.
-

-
- ³² Herzfeld C.D., Kreuter J. "Grundlagen der Arzneiformenlehre, Galenik 2", Springer-Verlag Berlin-Heidelberg-New York, (1999).
- ³³ Makoid M. C., Banakar U. V., "Mathematics of Modified Drug Release", Creighton University, School of Pharmacy and Health Professions, Omaha, NE 68178 (Jahrgang unbekannt).
- ³⁴ Langer R., Peppas N. A., *Biomaterials*, **2**, (1981), 201-212.
- ³⁵ Langer R., „*Pharmac Ther.*“, **21**, (1983), 35-51.
- ³⁶ Jalil R., Nixon J. R., *Journal of Microencapsulation*, **7**(3), (1990), 375-83.
- ³⁷ Jain R., Shah N. H., Malick A. W., Rhodes C. T., *Drug Development and Industrial Pharmacy*, **24**(8), (1998), 703-27.
- ³⁸ Edlund U., Albertson A. C., *Advances in Polymer Science*, **157**, (2002), 67-112.
- ³⁹ Hilgers C., Dissertation RWTH Aachen.
- ⁴⁰ Schubert H., "New developments in the field of emulsification technique", *Diskussionstagung-Forschungskreis der Ernährungsindustrie*, **56**, (1998), 75-106.
- ⁴¹ Bahl Y., Sah H., *AAPS Pharm Sci Tech*, **1**(1), (2000), article 5.
- ⁴² Maia J. L., Santana M. H. A., Ré M.I., "Biodegradable Microspheres for Drug Administration", *Unicamp, FEQ, Campinas-SP-Brazil*.
- ⁴³ Drewe J., Krähenbühl S., *Schweiz Med Wochenschr*, **130**, (2000), 727-31.
- ⁴⁴ Einmahl S., Behar-Cohen F., Tabatabay C., Savoldelli M., Hermies F.D., Chauvaud D., Heller J., Gurny R., *J. Biomed. Mater. Res.*, **50**, (2000), 566-573.
- ⁴⁵ Kirchhof B., Wong D., Meurs J., Hilgers R., Macek M., Lois N., Schrage N.F., *Am. J. Ophthalmol.*, **133**(1), (2002), 95-101.
- ⁴⁶ Vineros S. A., Campochiaro P. A., Conway B. P., *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **31**, (1990), 14-28.
- ⁴⁷ Antragsband 2002 des Bereiches "Biomat" im IZKF "Biomat", "Biomaterialien und Material-Gewebsinteraktion bei Implantaten", RWTH Aachen, (2002), 133-148.
- ⁴⁸ Reim M., Redbrake C., Schrage N., *Arch. Soc. Esp. Oftalmol.*, **76**(2), (2001), 103-124.
- ⁴⁹ Kampik A., Kenyon K. R., Michels R. G., Green W. R., de la Cruz Z. C., *Arch Ophthalmol.*, **99**, (1981), 1445-1454.
- ⁵⁰ Pastor J. C., *Surv. Ophthalmol.*, **43**, (1998), 3-18.
- ⁵¹ Hemel M., Heckelen A., Kirchhof B., Schrage N.F., *Inflamm. Res.*, **Suppl. 2**, (2001), 93-95.
- ⁵² Böhmer J. A., Sellhaus B., Schrage N. F., *Current Eye Research*, **23**(3), (2001), 206-214.
- ⁵³ Schrage N.F., Hermel M., Klinik für Ophthalmologie RWTH Aachen, *persönliche Mitteilung*.
- ⁵⁴ Jaffe G. M., *Kirk Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*, 3 Aufl, **24**, Wiley, New York, (1984).
- ⁵⁵ Ball E. G., *J. Biol. Chem.*, **118**, (1937), 219-239.
- ⁵⁶ Ogata Y., Kosugi Y., *Tetrahedron*, **26**, (1970), 4711-4716.
- ⁵⁷ Friedrich W., *Handbuch der Vitamine*, 1. Aufl., Urban & Schwarzenberg, München, (1987), 597-639.
- ⁵⁸ Sapper H., Pleyer-Weber A., Lohmann W., *Z. Naturforsch.*, **37c**, (1982), 129-131.
- ⁵⁹ Sapper H., Kang S. O., Paul H. H., Lohmann W., *Z. Naturforsch.*, **37c**, (1982), 942-946.
- ⁶⁰ Jung C. H., Wells W. W., *Arch. Biochem. Biophys.*, **355**, (1998), 9-14.
- ⁶¹ Kang S. O., Supper H., Lohmann W., *Z. Naturforsch.*, **37c**, (1982), 1064-1069.
-

-
- ⁶² Ullmanns Enzyklopädie der technischen Chemie, 4. Auflage, **12**, (1976), 564.
- ⁶³ Connock E., "Do your products suffer from sunburn", A&E Connock (Perfumery & Cosmetics) LTD, Produktinformation.
- ⁶⁴ Van Natta F. J., Hill J. W., Carothers W. H., *J Am Chem Soc*, **56**, (1934), 455.
- ⁶⁵ Carothers W. H., Dorrough G. L., Van Natta F. J., *J Am Chem Soc*, **54**, (1932), 761.
- ⁶⁶ Carothers W. H., Van Natta F. J., *J Am Chem Soc*, **52**, (1930), 314.
- ⁶⁷ Albertssona A. C., Gruvegårda M., *Polymer*, **36**(5), (1995), 1009.
- ⁶⁸ Kricheldorf H. R., Meier-Haack J., *Makromol Chem*, **194**, (1993), 715.
- ⁶⁹ Grijpma D. W., Zondervan G. J., Pennings A. J., *Polym Bul*, **25**(3), (1991), 327.
- ⁷⁰ Albertsson A. C., *Adv Polym Sci*, **157**, (2002), 48.
- ⁷¹ Vert M., *Die Angewandte Makromolekulare Chemie*, **166/167**, (1989), 155-168.
- ⁷² Santani J.T., Richards A.C., Scheidt R., Cima M.J., Langer R., *Angew. Chem.*, **112**, (2000), 2486-2498.
- ⁷³ Schierholz J., Steinhauser H., Rump A.F.E., Berkels R., Pulverer G., *Biomaterials*, **18**, (1997), 839-844.
- ⁷⁴ Langer R., *J. Control. Rel.*, **62**, (1999), 7-11.
- ⁷⁵ Narasimhan B., Langer R., *Polym. Mater. Sci. Eng.*, **76**, (1997), 558-559.
- ⁷⁶ Narasimhan B., Langer R., "J. Contr. Re.I", **47**, (1997), 13-20.
- ⁷⁷ Lee C.H., Bhatt P., Chien Y., "J. Contr. Re.", **43**, (1997), 283-290.
- ⁷⁸ Baker R. "Controlled Release of Biologically Active Agents", John Wiley & Sons, (1987).
- ⁷⁹ Okay O., *Prog. Polym. Sci.*, **25**, (2000), 711-779.
- ⁸⁰ Sung K.C., Han R.Y., Hu O.Y.P., Hsu L.R., *Int. J. Pharm.*, **172**, (1998), 17-25.
- ⁸¹ Pean J.M., Venier-Julienne M.C., Boury F., Menei P., Denizot B., Benoit J.P., *J. Contr. Rel.*, **56**, (1998), 175-187.
- ⁸² Sriramakamal J., Dennis H.R., *AAPS Pharm Sci Tech*, **1**(4), (2000), 29.
- ⁸³ Leong K.W., Brott B.C., Langer R., *J. Biomed. Mater. Res.*, **19**, (1985), 941-955.
- ⁸⁴ Vollmert B., "Grundriss der Makromolekularen Chemie", E. Vollmert-Verlag Karlsruhe, (1988).
- ⁸⁵ Kosmidis K., Panos A., "Pharm. Res.", **20**(7), (2003), 988-995.
- ⁸⁶ Makoid M.C., Banakar U.V., "Mathematics of Modified Drug Release", Creighton University, School of Pharmacy and Allied Health Professions, Omaha, NE 68178, (Jahrgang unbekannt).
- ⁸⁷ Nijenhuis A. J., Colstee E., "Polymer", **37**(26), (1996), 5849-5857.
- ⁸⁸ Huatan H., Collett J.H., Attwood D., Booth C., "Biomaterials", **16**, (1995), 1297-1303.
- ⁸⁹ Rashkov I., Manolova N., Espartero J.L., Vert M., "Macromolecules", **29**, (1996), 50-56.
- ⁹⁰ McGregor R., "Diffusion and Sorption in Fibers and Films" Vol. 1, Academic Press London New York, (1974).
- ⁹¹ Crank J., Park G.S., "Diffusion in Polymers", Academic Press London New York, (1968), 251.
- ⁹² Langer R., "Molecular Principles of Biomaterials", Vorlesung MIT, (2003).
- ⁹³ Drumheller P.D., Hubbel J.A., *Anal. Biochem.*, **222**, (1994), 380-388.
- ⁹⁴ Chiellini E., Corti A., D'Antone S., Solaro R., "Prog. Polym. Sci.", **28**, (2003), 963-1014.
- ⁹⁵ Berman E. R., "Biochemistry of the Eye", (1991), 243-244.
-

-
- ⁹⁶ Roempp, Chemielexikon, 9. Auflage, Thieme Verlag Stuttgart New York, (1995).
- ⁹⁷ Isler O., Brubacher G., „Vitamine II“, Georg Thieme Verlag Stuttgart New York, (1988).
- ⁹⁸ Kimoto E., Hidehiko T., Toshio O., Choami M., „*Anal. Biochem.*“, **214**, (1993), 38-44.
- ⁹⁹ Schrage N.F., Hermel M., Ophthalmologie Klinikum RWTH Aachen, *persönliche Mitteilung*.
- ¹⁰⁰ Arkles B., *Chemtech*, **13**(9), (1983), 542-555.
- ¹⁰¹ Sick P., Hambrecht R., Schuler G., *Cardiovasc.*, **2** (Sonderheft 1), (2002), 25-28.
- ¹⁰² Fischman D. L., Leon M. B., Baim D. S., Schatz R. A., Savage M. P., Penn I., Detre K., Veltri L., Ricci D., Nobuyoshi M., *N. Engl. J. Med.*, **331**, (1994), 496-501.
- ¹⁰³ Serruys P. W., de Jaegere P., Kiemeneij F., Macaya C., Rutsch W., Heyndrickx G., Emanuelsson H., Marco J., Legrand V., Materne P., *N. Engl. J. Med.*, **331**, (1994), 489-495.
- ¹⁰⁴ Sigwart U., Puel J., Mirkovitch V., Joffe F., Kappenberger L., *N. Engl. J. Med.*, **316**, (1987), 701-706.
- ¹⁰⁵ Schwartz R. S., *Am. J. Cardiol*, **81**, (1998), 14E-17E.
- ¹⁰⁶ Mutschler E., „*Arzneimittelwirkungen Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie*“ Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, 7. Auflage, (1996).
- ¹⁰⁷ Hafner L., Hoff P., „Genetik“, Schroedel GmbH Verlag, (1984).
- ¹⁰⁸ Müller R., Gerckens U., Hauptmann K., Silber S., Grube E., *Z. Kardiol.* **91.1** (Suppl. 1), (2002) 219.
- ¹⁰⁹ Büllsfeld L., Gerckens U., Müller R., Grube E., *Z. Kardiol.*, **92**, (2003), 825-832.
- ¹¹⁰ Dr. Th. Blank, Projektpartner Fa. Angiomed GmbH & Co Medizintechnik KG, *persönliche Mitteilung*.
- ¹¹¹ Peppas N., Moynihan H. J., „*J. Applied Polym. Sci.*“, **30**, 2589-2606.
- ¹¹² Volk K.J., Susan E.H., *Journal of Chromatography B*, **696**, (1997), 99-115.
- ¹¹³ Mac Eachern-Keith G.J., Wagner Butterfield L.J., *Anal Chem*, **69**, (1997), 72-77.
- ¹¹⁴ Paz R.M., Dissertation RWTH Aachen, *eingereicht*.
- ¹¹⁵ Gorner T., Gref R., Michenot D., Sommer F. Tran M. N., Dellacherie E, *J. Contr. Release*, **57**(3), (1999), 259-268.
- ¹¹⁶ Polakovic M., Gorner T. Gref R., Dellacherie E, *J. Contr. Release*, **60**(2-3), (1999), 169-77.
- ¹¹⁷ Jedlinski Z., Kurcok P., Walach W., Janeczek H., Radecka I., *Makromol Chem*, **194**, (1993), 1681-1689.
- ¹¹⁸ Hesse M., Meier H., Zeeh B., „Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie“, Georg Thieme Verlag Stuttgart New York, 4. Auflage, (1991).
- ¹¹⁹ Steuer S., Dissertation RWTH-Aachen.
-

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Georg Plum
Geburtsdatum: 03.01.1969
Geburtsort: Geilenkirchen
Nationalität: deutsch
Familienstand: ledig

Schulische Ausbildung

1975-1978 katholische Grundschule Beggendorf
1979-1988 Gymnasium der Stadt Baesweiler

Wehrdienst

1988-1989 Allgemeiner Grundwehrdienst

Studium

04/1990-09/2000 Diplomstudiengang Chemie an der RWTH-Aachen
Vertiefungsfach: Makromolekulare Chemie
11/1996 Diplom-Vorprüfung
03/2000-09/2000 Diplomarbeit mit dem Titel „*Beschichtung von Ca-Alginat Sphären für den Einsatz in der Biotechnologie*“ unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. H. Höcker am Lehrstuhl für Textil- und Makromolekulare Chemie der RWTH-Aachen.
09/2000 Diplom

Promotion

10/2000-06/2004 Promotion unter Anleitung von Prof. Dr. H. Höcker am Lehrstuhl für Textil- und Makromolekulare Chemie der RWTH-Aachen zum Thema „*Freisetungsverhalten von unterschiedlich hydrophil/hydrophoben Modellsubstanzen aus Poly-(D,L-lactid)- und Poly-(D,L-lactid)-co-PEO-co-poly-(D,L-lactid)-Mikrosphären und pharmazeutische Anwendungen*“

Postdoctoral Fellowship

seit 16. August 2004 Postdoctoral Fellowship im Arbeitskreis von Prof. Dr. M. Tabrizian im Department of Biomedical Engineering an der McGill University Montreal, Quebec, Canada auf dem Gebiet der Oberflächenmodifizierung von Biomaterialien zur Ausbildung bioaktiver Oberflächen.
