

**Einfluss von Kryoprotektoren auf  
Hydroxyethylstärke-basierte Hydrogele  
als Drug Delivery Systeme  
für die kontrollierte Freisetzung von Proteinen**

**Dissertation**

der Fakultät für Chemie und Pharmazie  
der Eberhard Karls Universität Tübingen  
zur Erlangung des Grades eines Doktors  
der Naturwissenschaften

**2009**

vorgelegt von

**Sandra Barisch**

Tag der mündlichen Prüfung

23.07.2009

Dekan

Prof. Dr. Lars Wesemann

1. Berichterstatter

Prof. Dr. Rolf Daniels

2. Berichterstatter

Prof. Dr. Henning Menzel

## **Danksagung**

Die vorliegende Arbeit entstand unter der Anleitung von

**Herrn Prof. Dr. Rolf Daniels**

am Lehrstuhl für Pharmazeutische Technologie der Eberhard Karls Universität Tübingen.

Meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Rolf Daniels, danke ich herzlich für die Möglichkeit, zwischen mehreren Themen das für mich richtige wählen zu dürfen. Mein besonderer Dank gilt ihm für die Unterstützung bei der Bearbeitung dieser Arbeit, die stets freundliche und persönliche Betreuung und sein stets offenes Ohr für Fragestellungen aller Art. Die Weiterbildung zum Fachapotheker für Pharmazeutische Technologie und der Besuch von Kongressen, Tagungen und Messen haben dazu beigetragen, meine Begeisterung für das Gebiet der Pharmazeutischen Technologie weiter zu fördern.

Herrn Prof. Dr. Henning Menzel danke ich herzlich für die Erstellung des Zweitgutachtens.

Herrn Prof. Dr. Martin Wahl danke ich für seine stets offene Tür, seine Hilfsbereitschaft bei allen technischen, praktischen und theoretischen Problemen und den anregenden fachlichen Diskussionen.

Mein besonderer Dank gilt meinen Kolleginnen Frau Barbara Kannen und Frau Cornelia Witt für kreative Diskussionen, das sorgfältige Korrekturlesen dieser Arbeit und die schöne Zeit, die wir miteinander am Lehrstuhl verbracht haben. Herrn Stephan Maurath und Herrn Carsten Döhling danke ich für ihre immer währende Geduld bei all meinen PC-technischen Fragen und Problemen. Meiner Wegbegleiterin Frau Ariane Schwörer danke ich herzlich für die zahlreichen produktiven Diskussionen, die Begleitung auf mehreren Kongressen und ihre Hilfsbereitschaft während meines zweiwöchigen Forschungsaufenthaltes in Braunschweig. Allen weiteren ehemaligen und derzeitigen Kolleginnen und Kollegen danke ich für das angenehme Arbeitsklima, die Zusammenarbeit und die fachlichen Diskussionen.

Weiterhin danke ich Frau Martina Brenn, Frau Dagmar Thumm, Herrn Roland Walker und Herrn Klaus Weyhing für die Unterstützung während meiner Zeit am Lehrstuhl.

Frau Ute Metzger danke ich für ihre stete Diskussionsbereitschaft zum Thema „Proteine“ und die Hilfe bei der Durchführung einer Gelpermeations-Chromatographie.

Herrn Dr. Haug und besonders Herrn Max Jahnel des Isotopenlabors der Universität Tübingen bin ich zu besonderem Dank für die Vermessung radioaktiver Proben verpflichtet.

Herrn Geiger und seinem Werkstatt-Team gilt mein Dank für die stets schnelle Hilfe bei kleineren und größeren Reparaturen.

Herrn Harald Günther danke ich für seine unendliche Geduld und seinen Zuspruch während meiner gesamten Promotionszeit. Sein Verständnis, sein Einsatz und seine immer währende mentale Unterstützung haben diese Arbeit möglich gemacht. Dafür danke ich ihm von ganzem Herzen!

Für alle, die mich bei dieser Arbeit unterstützt haben.



„Man muss sich entscheiden: Entweder ahmt man nach, oder man ergreift die Initiative.

Wir wollen Pioniere sein.“

Muhammad ibn Raschid Al Maktum

Teile dieser Arbeit wurden bereits als Tagungsbeiträge veröffentlicht:

**Barisch, Sandra & Daniels, Rolf** – „Influence of sucrose as cryoprotectant on an aqueous two phase system consisting of hydroxyethylstarch, polyethylene glycol and water” – Polypharma 2006, Halle, 24.-26.09.2006 (Poster)

**Barisch, Sandra & Daniels, Rolf** – “Influence of sucrose, trehalose and glycine as cryo-protectants on an aqueous two phase system with and without added lysozyme” – Controlled Release Society German Chapter Annual Meeting, Freiburg, 22.-23.03.2007 (Poster)

**Barisch, Sandra & Daniels, Rolf** – “Influence of sucrose and lysozyme on an aqueous two phase system consisting of hydroxyethylstarch, polyethylene glycol and water” – Controlled Release Society German Chapter Annual Meeting, Braunschweig, 04.-05.2008 (Poster)

**Barisch, Sandra & Daniels, Rolf** – “Influence of sucrose and lysozyme on an aqueous two phase system consisting of hydroxyethylstarch, polyethylene glycol and water” – 6<sup>th</sup> World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, Barcelona/Spain, 7.-10.04.2008 (Poster)

**Barisch, Sandra & Daniels, Rolf** – “Preparation and Characterisation of FITC-Dextran loaded Hydroxyethyl starch-based Microspheres” – Controlled Release Society German Chapter Annual Meeting, Halle, 19.-20. 03.2009 (Poster)

---

# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Zielsetzung.....	1
2	Allgemeiner Teil.....	4
2.1	Wässrige Zweiphasensysteme.....	4
2.1.1	Allgemeines.....	4
2.1.1.1	Begriffsdefinition und Beispiele .....	4
2.1.1.2	Lösevorgang von Polymeren in Wasser.....	5
2.1.1.3	Entstehung von Zweiphasensystemen.....	6
2.1.1.4	Grenzflächenspannung von Zweiphasensystemen.....	10
2.1.1.5	Viskosität von Zweiphasensystemen .....	11
2.1.1.6	Proteinverteilung in Zweiphasensystemen.....	12
2.1.2	Hydroxyethylstärke .....	13
2.1.3	Polyethylenglykol.....	15
2.2	Hydrogele.....	16
2.2.1	Begriffsdefinition und Eigenschaften.....	16
2.2.2	Physiologische Verträglichkeit von Hydrogelen.....	19
2.2.3	Anwendung .....	20
2.2.4	Herstellung von Hydrogelen .....	20
2.2.4.1	Chemisch verknüpfte Hydrogele.....	20
2.2.4.2	Physikalisch verknüpfte Hydrogele .....	21
2.2.5	Herstellung von Mikropartikeln.....	22
2.2.6	Einbettung von Wirkstoffen .....	23
2.2.7	Wirkstofffreisetzung aus Hydrogelen .....	24
2.2.8	Hydrogelabbau .....	26
2.2.9	Bioresponsive Hydrogele .....	26
2.2.10	HES-HEMA-Hydrogele .....	26

2.3	Modellsubstanzen .....	29
2.3.1	Aufbau und Eigenschaften von Proteinen .....	29
2.3.2	Lysozym .....	30
2.3.3	FITC-Dextran 70 .....	34
2.4	Stabilisatoren für den Gefriertrocknungsprozess.....	35
2.4.1	Kryoprotektoren.....	36
2.4.2	Lyoprotektoren .....	37
2.5	Auswertungsmethoden für Freisetzungsversuche .....	39
2.5.1	Quadratwurzelgesetz nach Higuchi .....	39
2.5.2	Power Law .....	41
3	Materialien und Methoden .....	43
3.1	Materialien.....	43
3.2	Herstellung des Zweiphasensystems .....	45
3.3	Untersuchung physikochemischer Einflussfaktoren auf das ATPS aus HES und PEG... 46	
3.3.1	Temperatureinfluss .....	46
3.3.2	pH-Wert-Einfluss auf das Phasen-Volumen-Verhältnis.....	46
3.3.3	Einfluss von Kryoprotektoren auf das wässrige Zweiphasensystem.....	47
3.3.3.1	Dichte.....	47
3.3.3.2	Trocknungsverlust/Trocknungsrückstand.....	48
3.3.3.3	Bestimmung der Verteilungskoeffizienten von Kryoprotektoren .....	49
3.3.3.4	Einfluss von Lysozym auf die Verteilungskoeffizienten von Kryoprotektoren	
	51	
3.3.4	Einfluss von Lysozym auf das wässrige Zweiphasensystem .....	53
3.3.4.1	Qualitative Bestimmung der Lysozymverteilung im wässrigen Zweiphasensystems durch Fluoreszenzmikroskopie .....	53

---

3.3.4.2	Quantitative Bestimmung der Verteilungskoeffizienten von Lysozym und Untersuchung des Saccharoseinflusses .....	54
3.4	HES-Mikropartikel.....	56
3.4.1	Herstellung .....	56
3.4.2	Mikropartikel-Auswaage und -Ausbeute .....	58
3.4.3	Morphologie und Partikelgröße der Mikropartikel .....	59
3.4.3.1	Durchlicht-Mikroskopie .....	59
3.4.3.2	Fluoreszenz-Mikroskopie.....	59
3.4.3.3	Rasterelektronen-Mikroskopie .....	59
3.4.3.4	Partikelgrößenmessung durch Laserbeugung.....	60
3.4.4	Bestimmung der Einschussrate .....	60
3.4.4.1	Lysozym .....	60
3.4.4.2	FITC-Dextran .....	62
3.4.5	Freisetzungsversuche .....	62
3.4.5.1	Lysozym .....	63
3.4.5.2	FITC-Dextran .....	65
3.4.6	Verhalten von Lysozym gegenüber Bestandteilen des Humanserums .....	66
3.4.6.1	Durchlichtmikroskopie.....	66
3.4.6.2	Gelpermeations-Chromatographie .....	66
3.4.7	Abschätzung der Netzwerk-Maschenweite.....	68
3.4.8	Berechnung des Diffusionskoeffizienten von Lysozym im Hydrogel.....	68
4	Ergebnisse und Diskussion.....	69
4.1	Physikochemische Einflussfaktoren auf das ATPS aus HES und PEG .....	69
4.1.1	Temperatureinfluss.....	69
4.1.2	pH-Wert-Einfluss auf das Phasen-Volumen-Verhältnis .....	70
4.1.3	Einfluss von Kryoprotektoren auf das wässrige Zweiphasensystem .....	71

4.1.3.1	Dichte.....	72
4.1.3.2	Trocknungsverlust/Trocknungsrückstandes .....	73
4.1.3.3	Bestimmung von Verteilungskoeffizienten von Kryoprotektoren .....	75
4.1.3.4	Einfluss von Lysozym auf die Verteilungskoeffizienten von Kryoprotektoren 76	
4.1.4	Einfluss von Lysozym auf das wässrige Zweiphasensystem .....	80
4.1.4.1	Qualitative Bestimmung der Lysozymverteilung im wässrigen Zweiphasensystem durch Fluoreszenzmikroskopie.....	80
4.1.4.2	Quantitative Bestimmung der Verteilungskoeffizienten von Lysozym und Untersuchung des Saccharoseinflusses .....	82
4.2	HES-Mikropartikel .....	87
4.2.1	Mikropartikel-Auswaage und -Ausbeute.....	88
4.2.2	Morphologie und Partikelgröße der Mikropartikel.....	91
4.2.2.1	Durchlicht-Mikroskopie .....	91
4.2.2.2	Fluoreszenz-Mikroskopie .....	92
4.2.2.3	Rasterelektronen-Mikroskopie.....	95
4.2.2.4	Partikelgrößenmessung durch Laserbeugung .....	100
4.2.3	Bestimmung der Einschlussrate.....	103
4.2.3.1	Lysozym .....	103
4.2.3.2	FITC-Dextran .....	108
4.2.4	Freisetzung.....	111
4.2.4.1	Freisetzung von f-Lysozym in Phosphatpuffer pH 7.....	112
4.2.4.2	Freisetzung von f-Lysozym in Humanserum .....	117
4.2.4.3	Freisetzung von FITC-Dextran in Phosphatpuffer pH 7 .....	122
4.2.4.4	Freisetzung von FITC-Dextran in Humanserum .....	127
4.2.5	Verhalten von Lysozym gegenüber Bestandteilen des Humanserums .....	132
4.2.6	Netzwerk-Maschenweite .....	135

---

4.2.7 Diffusionskoeffizient von Lysozym im Hydrogel .....	136
5 Abschlussdiskussion.....	140
6 Zusammenfassung .....	155
7 Literaturnachweis .....	159
8 Anhang .....	177
Residuenplots .....	177

## Abkürzungsverzeichnis

ATPS	Wässriges Zweiphasensystem (Aqueous two phase system)
BMP	Bone morphogenetic protein
BSA	Bovines Serumalbumin
ca.	circa
d. h.	das heißt
Dex	Dextran
DS	Substitutionsgrad
et al.	et alii
etc.	et cetera
evtl.	eventuell
f-Lysozym	Fluoreszenz-Lysozym
griech.	griechisch
HEMA	Hydroxyethylmethacrylat
HES	Hydroxyethylstärke
HEW-Lysozym	Hen Egg White Lysozym (Lysozym aus Hühnereiweiß)
hGH	human growth hormone
HPS	Hydroxypropylstärke
Ig	Immunglobulin
lat.	lateinisch
$m_{\text{Hig}}$	Steigung aus der Geradengleichung des Quadratwurzelgesetzes (Higuchi)
min	Minute
Mr	Molare Masse
MS	Molarer Substitutionsgrad
n	Anzahl durchgeführter Versuche
o. g.	oben genannt(e)
PBS	Phosphatpuffer
PEG	Polyethylenglykol
$r^2$	Bestimmtheitsmaß
rpm	rounds per minute
s	Sekunde
sog.	sogenannte
syn.	Synonym
T	Teil (math.)
u. a.	unter anderem
VB	Vertrauensbereich
vgl.	vergleiche ...
VK	Verteilungskoeffizient
z. B.	zum Beispiel

Besondere Hinweise

Gesetzlich geschützte Warenzeichen werden ohne besondere Kennzeichnung verwendet.

# 1 Einleitung und Zielsetzung

Neue Erkenntnisse in der Forschung zur medikamentösen Behandlung verschiedener Krankheitsbilder und Fortschritte in der Pharmazeutischen Biotechnologie führen in den letzten Jahren immer häufiger dazu, dass anstelle klassischer niedermolekularer Wirkstoffmoleküle biotechnologisch gewonnene Proteine für die Pharmakotherapie entwickelt und verwendet werden. Beispielsweise werden Interleukine in der Krebstherapie, Interferone in der Therapie der Multiplen Sklerose und der chronischen Hepatitis C sowie Antikörper in der Therapie der rheumatoiden Arthritis mit großem Erfolg eingesetzt.

Klassische Wirkstoffe werden in der Regel peroral verabreicht. Dieser Applikationsweg ist bei Proteinen durch deren fehlende Resorption und die Anfälligkeit für Denaturierungsreaktionen nicht möglich: Aufgrund der komplexen Proteinstruktur und der zahlreichen labilen, für Abbaureaktionen anfälligen Stellen am Peptidgrundgerüst stellen Proteine im Vergleich zu klassischen Arzneistoffen erhöhte Anforderungen im Bezug auf den Umgang und die Verarbeitung. Dadurch stellen sie eine Herausforderung für die Pharmazeutische Technologie dar.

Proteine werden aus den oben genannten Gründen meist parenteral verabreicht, da aus der nicht-parenteralen Gabe eine schlechte Bioverfügbarkeit resultiert (Degim & Çelebi, 2007). Der im Handel befindliche Wirkstoff Desmopressin (Minirin, Peptidanalogen des Vasopressins) weist beispielsweise als perorale Arzneiform eine absolute Bioverfügbarkeit von nur 0,16 % auf, die durch nasale Applikation auf 10 % erhöht werden kann (Rote Liste 2008). Ein weiteres Beispiel ist das im Herbst 2007 vom Markt genommene inhalierbare Insulinpräparat Exubera mit einer relativen Bioverfügbarkeit von 10 % (Referenz: schnell wirkendes subkutan appliziertes Humaninsulin) (EMA, 2008). Weiterhin werden die buccale, rektale und vaginale Anwendung erforscht, bislang jedoch ohne großen Erfolg (Degim & Çelebi, 2007). Diese Beispiele zeigen sowohl die Notwendigkeit als auch die Schwierigkeiten bei der Neuentwicklung von Darreichungsformen, die für Proteine geeignet sind.

Der Fokus der Forschung wird derzeit auf parenteral applizierbare Depot-Präparate gelegt, da eine häufige parenterale Applikation der Patienten-Compliance nicht zuträglich ist. Neben der damit verbundenen Reduktion der Applikationshäufigkeit liegt ein weiterer Vorteil von Depot-Präparaten in einer verringerten benötigten Dosis gegenüber einer schnellfreisetzenden Arzneiform. Der Grund dafür liegt darin begründet, dass durch die langsame, kontinuierliche Freisetzung des Wirkstoffs aus

der Arzneiform die im menschlichen Körper intra- und extrazellulär vorkommenden Proteasen die inkorporierten Proteine nicht abbauen können (Degim & Çelebi, 2007).

Als Darreichungsform für die vorliegende Arbeit werden Mikropartikel ausgewählt, aus denen der Wirkstoff kontrolliert über einen längeren Zeitraum hinweg freigesetzt werden soll. Das den Mikropartikeln zugrunde liegende Zweiphasensystem (aqueous two phase system = ATPS) kommt ohne die Verwendung organischer Lösungsmittel aus. Da die bereits beschriebene Denaturierungsgefahr vermehrt in Systemen auftritt, die organische Lösungsmittel enthalten (Inoue & Timasheff, 2004; Miroliaei & Nemat-Gorgani, 2002), stellt dies einen bedeutenden Vorteil dar. Die in der vorliegenden Arbeit verwendete Methode zur Herstellung des wässrigen Zweiphasensystems beruht auf dem Phänomen, dass beim Mischen zweier Polymerdispersionen eine Phasenseparation eintreten kann. Durch die niedrige Grenzflächenspannung zwischen den beiden resultierenden Phasen entsteht bei geringem mechanischem Energieeintrag eine Wasser-in-Wasser-Emulsion, bei der sich die disperse Phase gleichmäßig mit einer Tropfengröße von ca. 10-50 µm in der kontinuierlichen Phase verteilt. Die so entstandene Emulsion ist instabil und trennt sich nach einiger Zeit wieder in zwei nicht miteinander mischbare Phasen auf. Bei der Verwendung von quervernetzbaaren Polymeren in der dispersen Phase kann durch einen Polymerisationsschritt nach dem Dispergieren der Phasen die Ausbildung von Mikropartikeln durch die Quervernetzung der Polymerketten erreicht werden.

Durch die ausschließliche Verwendung von Wasser als Dispersionsmittel müssen die verwendeten Hilfsstoffe wasserlöslich bzw. wasserdispergierbar sein, um kolloiddisperse Lösungen zu erhalten. Darüber hinaus sollen die verwendeten Polymere eine hervorragende Biokompatibilität aufweisen und die Proteinstruktur nicht beeinflussen. Diese Anforderungen werden in den Eigenschaften der Hydrogelbildner vereint. Hydrogele bestehen aus einem Netzwerk von Polymeren, die – abhängig vom Vernetzungsgrad – durch Wasserzugabe unter beträchtlicher Volumenzunahme quellen und dadurch eine proteinfreundliche Umgebung schaffen.

Ein weiterer wünschenswerter Aspekt ist, dass die Hilfsstoffe bereits für die Verwendung in Arzneimitteln zugelassen sind. Die drei Bestandteile des in dieser Arbeit verwendeten Zweiphasensystems sind Hydroxyethylstärke (HES) als Hydrogelbildner, Polyethylenglykol (PEG) als zweites Polymer und Wasser. Hydroxyethylstärke ist in zwei verschiedenen Modifikationen (130/0,4 und 200/0,5) in derzeit insgesamt 11 zugelassenen Fertigarzneimitteln als Plasmaexpander auf dem Markt (Rote Liste 2008). Hydroxyethylstärke kann durch die zahlreichen im Molekül vorhandenen Hydroxyethyl-Reste dahingehend chemisch modifiziert werden, dass die für eine

Polymerisation der Polymerketten notwendigen quervernetzbaaren Gruppen ins Molekül eingefügt werden können und so die Herstellung von Mikropartikeln durch Quervernetzung möglich ist. Für diese Arbeit werden dazu Hydroxyethylmethacrylatgruppen (HEMA) kovalent in die HES-Struktur eingefügt und es entsteht HES-HEMA. Diese Modifikation ist derzeit noch nicht in Fertigarzneimitteln auf dem Markt, jedoch gibt es Untersuchungen, die dessen fehlende Zytotoxizität belegen (Scheibe, 2008).

Das zweite in dieser Arbeit verwendete Polymer, Polyethylenglykol, ist in verschiedenen Kettenlängen derzeit in 13 verschiedenen Präparaten als osmotisch aktives Laxans zugelassen (Rote Liste 2008) und kommt außerdem in 1 850 zugelassenen Arzneimitteln als Hilfsstoff vor, u. a. auch in Parenteralia. Durch den Einsatz in zugelassenen Arzneimitteln kann von einer gut dokumentierten physiologischen Unbedenklichkeit dieses Stoffes ausgegangen werden.

Zur besseren Steuerbarkeit und zur Prozessoptimierung bei der Herstellung von Arzneimitteln ist es notwendig, das Grundsystem ausreichend zu kennen und beurteilen zu können. Aus diesem Grund beschäftigt sich diese Arbeit sowohl mit physiko-chemischen Grundlagen des ausgewählten Zweiphasensystems, als auch mit der Herstellung und Charakterisierung von Mikropartikeln auf dessen Basis. Es werden verschiedene Einflüsse auf das ATPS aus HES, PEG und Wasser untersucht, wie z. B. der Einfluss der Temperatur und des pH-Wertes. Weiterhin werden die Verteilung von zusätzlich eingebrachten Hilfsstoffen und Wirkstoffen im Zweiphasensystem und deren gegenseitige Beeinflussung untersucht. Die so gewonnenen Erkenntnisse können mit den Ergebnissen der Herstellung und Charakterisierung von Mikropartikeln verknüpft und bewertet werden.

## **2 Allgemeiner Teil**

### **2.1 Wässrige Zweiphasensysteme**

#### **2.1.1 Allgemeines**

##### **2.1.1.1 Begriffsdefinition und Beispiele**

Ein wässriges Zweiphasensystem entsteht beim Mischen zweier Polymerlösungen oder einer Salz- und einer Polymerlösung. Dabei erhält man zwei flüssige Phasen, in denen jeweils eines der beiden Polymere in einer sehr hohen Konzentration vorliegt. Die Phasen bestehen jedoch nicht ausschließlich aus einem der beiden Polymere und Wasser, sondern es ist jeweils auch ein geringer Anteil des anderen Polymers gelöst (Gupta et al., 1999; Shanbhag & Axelsson, 1974). Die obere Phase hat durch einen höheren Wassergehalt eine niedrigere Dichte (Johansson, 1974).

In der Biochemie und Biotechnologie werden wässrige Zweiphasensysteme aus makromolekularen Bestandteilen für die Separation und Reinigung von Zellen und Zellorganellen genutzt (Albertsson, 1977; Hatti-Kaul, 2001) und diesbezüglich auch erstmals erwähnt. Beispiele für natürliche Polysaccharide, die mit Salzen Zweiphasensysteme ausbilden, sind Alginate, Gellan und Scleroglucan (Coviello et al., 2007). Da Zweiphasensysteme aus einer Polymerlösung und einer Salzlösung für diese Arbeit von untergeordneter Bedeutung sind, wird im Weiteren hauptsächlich auf Zweiphasensysteme mit zwei unterschiedlichen Polymeren eingegangen, die in Tabelle 2-1 als Übersicht dargestellt sind.

Durch den hohen Wassergehalt (85-99 %) der Zweiphasensysteme ergibt sich ein Milieu, das für biologisch aktive Moleküle hervorragend geeignet ist. Die in den Systemen auftretende niedrige Grenzflächenspannung zwischen den Phasen erlaubt die Anreicherung von Proteinen in einer der beiden Phasen ohne Verlust der Proteinaktivität. Die Einstellung des Verteilungsgleichgewichtes von Proteinen im System wird nach dem Mischen durch die kleine Tropfengröße im unteren Mikrometerbereich und der daraus resultierenden großen Tropfenoberfläche sowie den geringen Distanzen zwischen den einzelnen Tropfen erleichtert (Gupta et al., 1999).

In jüngerer Zeit werden Zweiphasensysteme aus zwei verschiedenen Polymeren häufig für die Herstellung von Mikropartikeln eingesetzt, in die Arzneistoffe wie z. B. Proteine oder Peptide eingebettet werden können. Ein bedeutender Vorteil dieser neuen Methode ist die Möglichkeit,

Mikropartikel ohne die Verwendung organischer Lösungsmittel herzustellen. Eines der am besten untersuchten Systeme ist das Zweiphasensystem aus Dextran und PEG (Walter & Johansson, 1986; Münchow et al., 2008).

*Tabelle 2-1: Übersicht gängiger wässriger Zweiphasensysteme*

<b>Polymer 1</b>	<b>Polymer 2</b>	<b>Quelle</b>
Carrageenan	Agar Gelatine	Coviello et al., 2007
Dextran	Polyvinylalkohol Methylcellulose Ethylhydroxyethylcellulose	Albertsson, 1958 Albertsson, 1958 Albertsson, 1958
Gummi arabicum	Gelatine	Daniels & Mittermaier, 1992
Polyethylenglykol	Polypropylenglycol Polyvinylpyrrolidon Polyvinylalkohol Maltodextrin Hydroxypropylstärke  Dextran	Albertsson, 1958 Albertsson, 1958 Albertsson, 1958 da Silva & Meirelles, 2000 Tjerneld et al., 1986 Madeira et al., 2008  Albertsson, 1958 Gündüz, 2000 Madeira et al., 2008 Stenekes, 1999
Polypropylenglycol	Polyvinylpyrrolidon Dextran	Albertsson, 1958 Albertsson, 1958
Xanthan	Chitosan	Coviello et al., 2007

### 2.1.1.2 Lösevorgang von Polymeren in Wasser

Beim Lösevorgang eines Polymers in Wasser liegen die Moleküle anfangs einzeln vor. Beim Ansteigen der Polymerkonzentration kommt es zu deren Annäherung und die Polymerketten interagieren miteinander, so dass es zur Ausbildung eines Polymernetzwerkes kommt. Die Konzentration  $c^*$ , ab der es zur Ausbildung des Netzwerkes kommt, kann mit Gleichung 2-1 (nach Cabezas et al., 1996) berechnet werden.

$$c^* = \frac{3^{\frac{3}{2}}}{R^3}$$

Gleichung 2-1

$c^*$      *Konzentration*  
 $R$      *Polymer-Radius*

Wird ein einzelnes hydrophiles Polymer in Wasser gelöst, kann die Entropie im System zunehmen ( $\Delta S$  positiv) oder abnehmen ( $\Delta S$  negativ). Die Abnahme der Entropie kann am Beispiel von Methylcellulose beobachtet werden: während sich Methylcellulose in kaltem Wasser löst, kommt es bei einer Temperaturerhöhung (Trübungspunkt) zu einem Ausfällen von Methylcellulose. Bei einer Zunahme der Entropie kommt es jedoch zu einer negativen freien Enthalpie  $\Delta G$ , was zur Ausbildung einer kolloidalen Lösung führt (Gleichung 2-2). Dies ist eine exergone Reaktion, die unter den gegebenen Bedingungen (Konzentrationen) spontan abläuft.

$$\Delta G = \Delta H - T \cdot \Delta S$$

Gleichung 2-2

$\Delta G$      *freie Enthalpieänderung*  
 $\Delta H$      *Mischungsenthalpieänderung*  
 $T$      *Temperatur*  
 $\Delta S$      *Entropieänderung*

### 2.1.1.3 Entstehung von Zweiphasensystemen

Die begrenzte Mischbarkeit von Polymerlösungen und die dadurch entstehende Mischungslücke sind abhängig von der Polymerkonzentration im System. In stark verdünnten Polymerlösungen werden die Moleküle durch mehrere Schichten des Lösungsmittels voneinander getrennt, so dass die Polymermoleküle keine direkten Wechselwirkungen miteinander eingehen können (Cabezas, 1996). Übersteigen die Konzentrationen einen bestimmten Wert, kommt es zu Wechselwirkungen zwischen den Polymeren und diese können ausfallen.

Die beim Mischen zweier Polymerlösungen entstehende Phasenseparation in wässrigen Zweiphasensystemen wird durch eine Vielzahl von Wechselwirkungen zwischen den eingesetzten Polymermolekülen hervorgerufen. Dazu gehören u. a. Wasserstoffbrückenbindungen, ladungsbedingte Wechselwirkungen, Van-der-Waals-Kräfte, Polarität, Oberflächeneigenschaften und sterische Effekte (Gupta et al., 1999). Auch chemische Eigenschaften (Gupta et al., 1999) und die Molekülgröße (Cabezas, 1996) der Polymere spielen hierbei eine große Rolle.

---

Die Anwesenheit eines zweiten Polymers P2 in einer Polymerlösung P1 reduziert die statistisch möglichen Anordnungsmöglichkeiten des Polymers P1, d. h., die Mischungsentropie wird – im Vergleich mit einem einzelnen Polymer in Lösung – weniger positiv. Dadurch reduziert sich die Anzahl an freien Lösungsmittelmolekülen, wodurch der Entropiebeitrag deutlich kleiner wird. Die Mischungsenthalpie  $H$  steigt durch die Abstoßungskräfte zwischen den Polymeren an. Dies führt zur Erhöhung der Gesamtenergie des Systems, wodurch dieses einen thermodynamisch ungünstigen Zustand erreicht. Es kommt zur Ausbildung einer Mischungslücke und damit zur Phasentrennung (Stenekes et al., 1999; Huddleston et al., 1991).

Eine weitere Theorie zur Entstehung eines Zweiphasensystems beim Mischen zweier Kolloiddispersionen ist das Phänomen der Flockung durch Verarmung der Grenzfläche (Everett, 1992). Diese Theorie ist für nur nicht-adsorbierende Polymere anwendbar, d. h., es dürfen keine Anlagerungsprozesse des Polymers P1 an der Oberfläche des Polymers P2 erfolgen. Beim Versetzen einer kolloidalen Dispersion mit einem zweiten Polymer (Abbildung 2-1 (A)) kann es zu einer Phasenseparation kommen, bei der eine polymerarme und eine polymerreiche Phase entstehen. Dieses Phänomen wird als Verdrängungsflockung ("depletion flocculation") bezeichnet. Bei der Annäherung zweier gleicher Polymermoleküle P2 in einer Polymerlösung P1 (Abbildung 2-1 (B)) kommt es zu einer "kritischen Distanz" zwischen diesen beiden Molekülen. Diese sog. Verdrängungsschicht („depletion layer“) weist eine Dicke auf, die in etwa dem Radius der Molekülbewegung des Polymers entspricht. Wird dieser Abstand unterschritten, werden die Polymerketten des Polymers P1 zwischen den Polymerpartikeln P2 verdrängt und die Ketten richten sich zur Bulkphase aus (Abbildung 2-1 (C)), wodurch es zur P1-Verarmung an der Grenzschicht kommt. Folglich entsteht ein Bereich mit reinem Lösungsmittel zwischen den beiden Molekülen. Die Polymerkonzentration auf der Partikeloberfläche im Spalt ist nahe Null und steigt zur Bulkphase hin an. Dadurch entsteht ein osmotischer Druck-Gradient, wodurch das Lösungsmittel aus dem Spalt zwischen den beiden Polymermolekülen P2 gesaugt wird. Daraus resultiert eine Anziehungskraft zwischen den Molekülen P2 (Abbildung 2-1 (D)) und es kommt zur Auftrennung der Phasen (Hunter, 2001; Yan et al., 2000; Cabezas, 1996; Everett, 1992). Dies erklärt auch, warum diese Theorie nur für nicht-adsorbierende Polymere gilt: Adsorbierende Polymere würden sich nicht ohne Energieaufwendung aus dem Spalt zwischen den Polymermolekülen P2 verdrängen lassen und es würde somit kein osmotischer Gradient aufgebaut werden können.

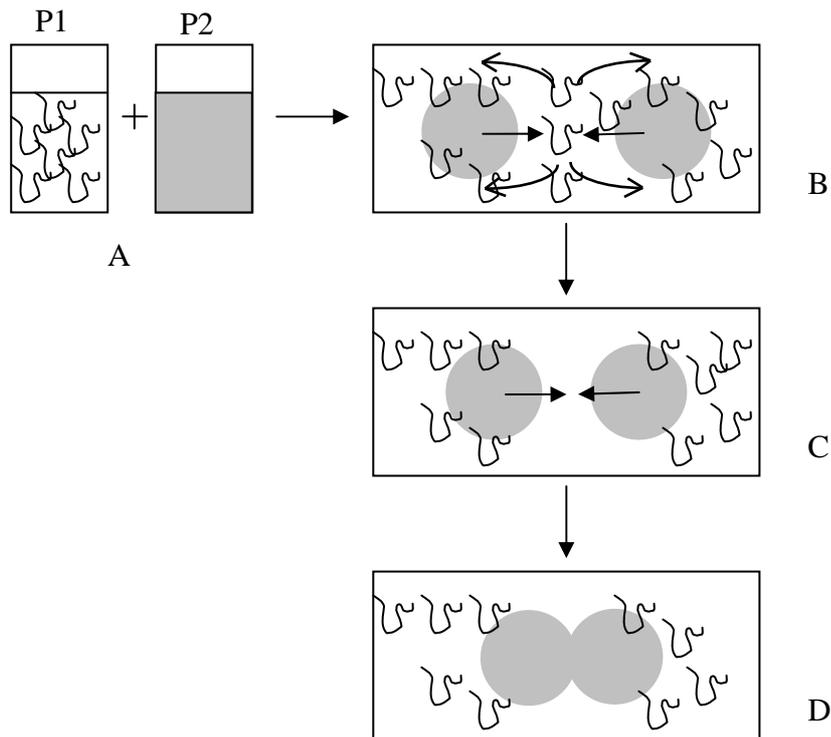


Abbildung 2-1: Schematische Darstellung der Verdrängungsflockung (Erklärung siehe Text)

Ein weiterer Grund für die Ausbildung von Zweiphasensystemen wird von Huddleston et al. (1991) beschrieben: Polymere richten sich beim Lösen in Wasser in einer bestimmten Orientierung aus und verändern dadurch die Wasserstruktur. Werden die Lösungen zweier inkompatibler Polymere zusammengegeben, sind auch die Wasserstrukturen nicht miteinander kompatibel. Die beiden Polymere sind somit nicht optimal hydratisiert und es kommt zur Phasenseparation. Je höher die Konzentration der Polymere in Lösung ist, desto stärker wird die Wasserstruktur verändert. Dies erklärt auch, warum es in Systemen mit niedrigen Konzentrationen der Polymere zu einer Mischbarkeit und erst ab einer für das ATPS spezifischen Konzentration zur Ausbildung einer Mischungslücke kommt.

In der Literatur finden sich weitere Theorien zum Mechanismus der Entstehung von Zweiphasensystemen. Einen sehr ausführlichen Überblick gibt Cabezas (1996).

Zur Darstellung des Phasenverhaltens von ternären und pseudoternären Systemen wird häufig das Gibbs'sche Phasendreieck genutzt. In Abbildung 2-2 wird dies am Beispiel eines Dreikomponentensystems aus HES, PEG und Wasser gezeigt.

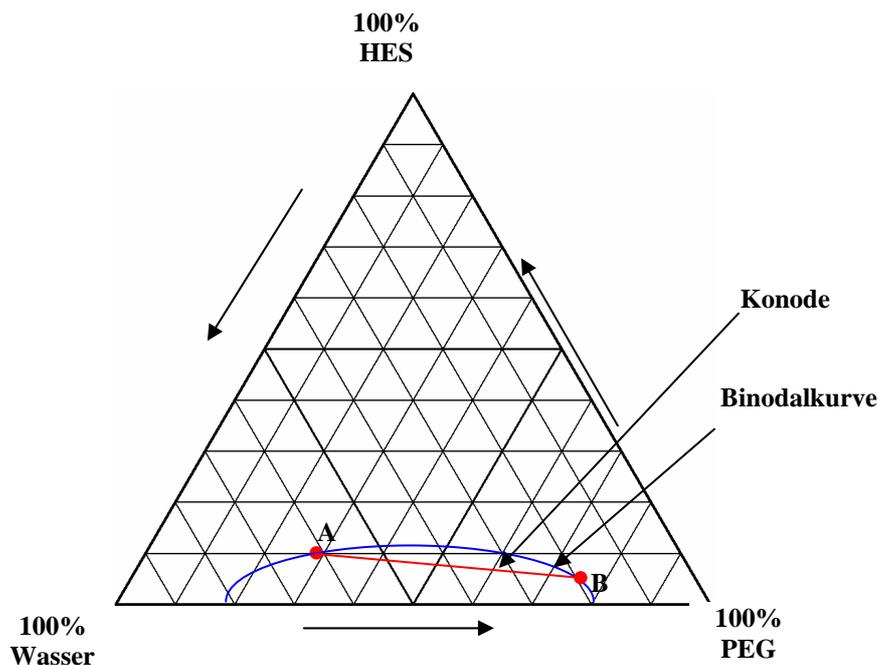


Abbildung 2-2: *Graphische Darstellung für Dreikomponentensysteme und Systeme mit begrenzter Mischbarkeit nach Gibbs*

In Abbildung 2-2 sind die Binodalkurve und eine Konode des Systems eingezeichnet. Die Binodalkurve ist die Grenze zwischen dem heterogenen Zweiphasengebiet (Mischungslücke) und dem homogenen Einphasengebiet (vollständige Mischbarkeit). Die Konode verbindet zwei auf der Binodalkurve liegende Zustandspunkte, die miteinander im Phasengleichgewicht stehen. Das Phasengleichgewicht ist erreicht, wenn Polymer P1 mit seiner Sättigungskonzentration in Polymerphase P2 gelöst ist und umgekehrt. An den Punkten, an denen sich die Konode und die Binodalkurve treffen, ist die Zusammensetzung der oberen Phase (PEG-Phase) und der unteren Phase (HES-Phase) ablesbar (Walter & Johansson, 1986). Als „kritischer Punkt“ wird der Punkt auf der Binodalkurve bezeichnet, an dem die Konodenlänge „0“ beträgt (Hatti-Kaul, 2000).

In der Praxis wird häufig eine vereinfachte Darstellung (siehe Abbildung 2-3) mit nur zwei Achsen verwendet. Auf der x-Achse wird die Konzentration des ersten Polymers, auf der y-Achse die Konzentration des zweiten Polymers im System aufgetragen. Der Wasseranteil ergibt sich durch die Subtraktion der beiden Werte von 100 % (Stenekes et al., 1999; Walter & Johansson, 1986). Alle Systeme, die auf der Verbindungsgeraden A/C liegen (Konode), haben die gleiche chemische Zusammensetzung der oberen und der unteren Phase, die durch die Punkte A und C angegeben wird. Diese Systeme unterscheiden sich nur durch den Volumenanteil der Phasen:

Während am Punkt  $D_1$  die untere Phase ein kleines Volumen im Vergleich zur oberen Phase aufweist, wird das Volumen der unteren Phase in Richtung C immer größer, so dass sich die Phasenverhältnisse umkehren ( $D_3$ ). Punkt B gibt den kritischen Punkt des Systems an (Huddleston et al., 1991).

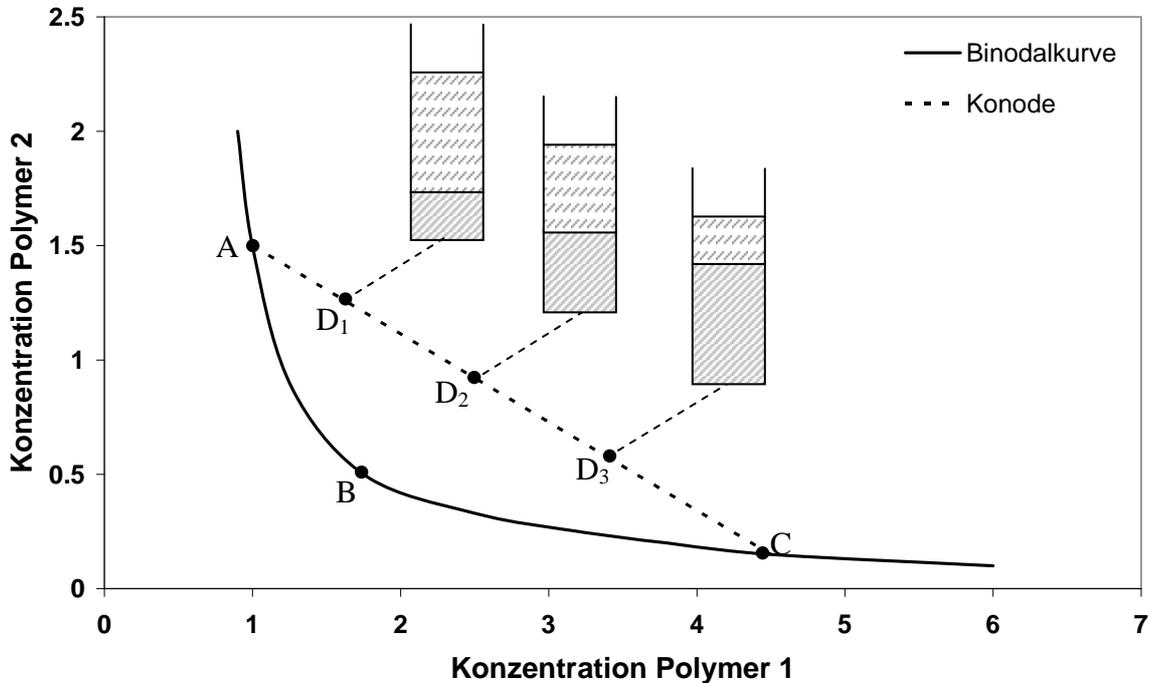


Abbildung 2-3: In der Praxis häufig verwendete graphische Darstellungsmöglichkeit für Dreikomponentensysteme und Systeme mit begrenzter Mischbarkeit

#### 2.1.1.4 Grenzflächenspannung von Zweiphasensystemen

Die Grenzflächenspannung zwischen den beiden entstehenden gesättigten Polymerphasen ist für ein ATPS aus PEG und Dextran mit einem Wert von ca.  $10^{-4}$ -1 mN/m (Wu & Zu, 1998) bzw. für ein ATPS aus PEG und Maltodextrin mit einem Wert von 0,04-0,12 mN/m (Giraldo-Zuniga et al., 2009) um ein Vielfaches geringer als in Zweiphasensystemen aus einer organische Phase und Wasser. Die Grenzflächenspannung ist u. a. abhängig von der Konodenlänge des Systems und dem Molekulargewicht der verwendeten Polymere: Die Grenzflächenspannung steigt sowohl mit zunehmender Konodenlänge als auch mit zunehmendem Molekulargewicht der Polymere (Forciniti et al., 1990; Giraldo-Zuniga et al., 2009), wobei in einem System aus PEG und Dextran der Einfluss des Molekulargewichtes von PEG deutlich stärker ausgeprägt ist als der Einfluss des Molekulargewichtes von Dextran (Forciniti et al., 1990). Trägt man den Logarithmus der

Grenzflächenspannung gegen den Logarithmus der Konodenlänge auf, ergibt sich ein linearer Zusammenhang. Vergleicht man Systeme aus PEG und Dextran mit jeweils unterschiedlichen Kettenlängen, kommt es mit zunehmender Kettenlänge der Polymere zu geringeren Steigungen. Dies deutet darauf hin, dass Systeme, die näher am „kritischen Punkt“ liegen (kurze Konode) empfindlicher auf die Änderung des Molekulargewichtes reagieren als Systeme, die vom kritischen Punkt weiter entfernt liegen (lange Konode). Einen weiteren exponentiellen Zusammenhang gibt es zwischen der Grenzflächenspannung und der Differenz der Dextran- bzw. PEG-Konzentration zwischen der oberen und der unteren Phase. Dadurch ist es möglich – bei Kenntnis der Volumina der Phasen und der Polymerkonzentration – die Zusammensetzung der Phasen zu berechnen (Forciniti et al., 1990). Auch der pH-Wert beeinflusst die Grenzflächenspannung von Zweiphasensystemen. So steigt in einem PEG-Dextran-ATPS beispielsweise die Grenzflächenspannung mit steigendem pH-Wert: Während die Grenzflächenspannung im pH-Bereich von 2 bis 6 relativ konstant ist, steigt diese ab pH 7 sprunghaft an (Schluck et al., 1995). Die Temperaturabhängigkeit der Grenzflächenspannung von Zweiphasensystemen aus PEG und Dextran ist von Forciniti et al. (1990) ebenfalls untersucht worden. Hier gibt es jedoch keinen klaren Zusammenhang: Die Grenzflächenspannung kann bei einer Temperaturänderung – abhängig von der Konodenlänge – fallen, konstant bleiben oder steigen.

### **2.1.1.5 Viskosität von Zweiphasensystemen**

Die Viskosität von Zweiphasensystemen wird ebenfalls durch das Molekulargewicht der Polymere bestimmt. Mit steigendem Molekulargewicht steigt die Viskosität der Phasen, wobei die Viskosität der unteren Phase sowohl im Maltodextrin/PEG-ATPS (Giraldo-Zuniga et al., 2009) als auch im Hydroxypropylstärke/PEG-ATPS (Venâncio et al., 1996) stets größer ist. Brooks & Norris-Jones (2000) beschreiben für ein ATPS aus PEG und Dextran, dass mit steigender Entfernung vom „kritischen Punkt“ die Viskosität der Dextran-Phase stark steigt, wohingegen die Viskosität der PEG-Phase nahezu konstant bleibt. Der Grund dafür liegt darin, dass Dextran mit steigender Entfernung vom „kritischen Punkt“ immer weiter von der PEG-Phase ausgeschlossen wird. Die Kenntnis der Viskosität ist wichtig, weil durch die Viskosität der Phasen auch die Verteilungsvorgänge im Zweiphasensystem z. B. von Proteinen beeinflusst werden können. Weiterhin sind die Grenzflächenspannung und die Viskosität des Systems ausschlaggebend für das Verhalten des Zweiphasensystems beim Mischen der Phasen.

### 2.1.1.6 Proteinverteilung in Zweiphasensystemen

Die Verteilung von Zellen, Zellorganellen und Proteinen in Zweiphasensystemen ist hauptsächlich diffusionsgesteuert (Münchow et al., 2008) und abhängig von verschiedenen physikalischen Faktoren. Eine Auswahl ist im Folgenden zusammengestellt:

- Proteingröße (Sakasawa & Walter, 1972; Asenjo et al., 1994)
- Nettoladung des Proteins (Johansson, 1974)
- Hydrophobie (Hachem et al., 1996; Asenjo et al., 1994)
- dem Ausmaß von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Komponenten, Van-der-Waals-Kräften und sterische Effekten (Hachem et al., 1996)
- pH-Wert des Zweiphasensystems, zugesetzte Salze (Johansson, 1974)
- Polymerkonzentration und -größe und Temperatur (Salgado et al., 2008)
- elektrostatische Kräfte und Löslichkeit des Proteins in den Phasen (Asenjo et al., 1994)
- Ausmaß der Polymer-Solvatation (Shanbhag & Axelsson, 1975; Johansson, 1974).

Dabei sind nicht alle aufgeführten Faktoren gleich wichtig, da das Ausmaß des Einflusses vom gewählten System abhängt (Asenjo et al., 1994). Ladung und Hydrophobie sind dabei von großer Bedeutung (Hachem et al., 1996). In Systemen, in denen die Potentialdifferenz zwischen den Phasen Null beträgt (nichtionogene Systeme), besitzt die Hydrophobie einen noch stärkeren Einfluss (Hachem et al., 1996).

Asenjo et al. (1994) fand einen exponentiellen Zusammenhang zwischen dem Protein-Verteilungskoeffizienten und dem Molekulargewicht des Proteins: je größer ein Protein ist, desto höher ist die Proteinkonzentration in der unteren (Dextran-) Phase. Dabei bedeutet eine geringe molare Masse nicht zwingend, dass der Diffusionskoeffizient des Proteins größer ist, da hierfür sowohl die 3-D-Struktur des Proteins (gestreckt, kugelförmig u. a.) als auch die Polymer-Protein- bzw. Lösungsmittel-Protein-Wechselwirkungen verantwortlich sind (Münchow et al., 2008).

Johansson (1974) beschreibt die Beeinflussung der Proteinverteilung durch Veränderung der Salzkonzentration und damit einer Potentialänderung im System, so dass sich Proteine entsprechend ihrer Ladung ausrichten können. Bei der Wahl der Salzkonzentration sollte dabei auf den denaturierenden Effekt von Salzen geachtet werden (Venâncio et al., 1996). Der größte Teil der

Proteineigenschaften ist von deren Oberflächenbeschaffenheit abhängig. Aus diesem Grund besitzt die Hydrophobie von Proteinen für deren Verhalten im Zweiphasensystem eine besondere Bedeutung (Salgado, 2008). Shanbhag & Axelsson (1975) fanden einen Anstieg von Protein-Verteilungskoeffizienten um das 100-fache durch Veränderung der Solvataion der Polymere.

In der vorliegenden Arbeit wird Lysozym als Modellprotein verwendet. In der Literatur finden sich einige Verteilungskoeffizienten für Lysozym in Zweiphasensystemen aus Dextran und PEG bzw. aus Hydroxypropylstärke (HPS) und PEG. Der Verteilungskoeffizient  $VK_{\text{Protein}}$  ist definiert als Quotient aus der Proteinkonzentration der oberen und der unteren Phase (Gleichung 2-3).

$$VK_{\text{Protein}} = \frac{C_{\text{obere Phase}}}{C_{\text{untere Phase}}} \quad \text{Gleichung 2-3}$$

$VK$     *Verteilungskoeffizient*

$C$       *Konzentration*

In einem ATPS aus Dextran und PEG fanden Shanbhag & Axelsson (1975) beispielsweise einen Lysozym-Verteilungskoeffizienten von ca. 0,56 und Johansson (1974) einen Koeffizienten von 0,79. Für ein ATPS aus Hydroxypropylstärke (HPS) und PEG fanden Madeira et al. (2008) einen Koeffizienten von ca. 1. Alle Bestimmungen wurden in Lösungen durchgeführt, deren pH-Wert unterhalb des isoelektrischen Punktes von Lysozym liegt. Das bedeutet, dass Lysozym unter diesen Bedingungen protoniert und somit geladen vorliegt. Durch diese Ladung wird das Molekül hydrophiler und reichert sich so bevorzugt in der hydrophileren Dextran-Phase an. Die gleichmäßige Verteilung von Lysozym im System HPS/PEG ist im Vergleich mit Dextran durch die verminderte Hydrophilie von HPS durch dessen lipophile Hydroxypropyl-Seitenketten zu erklären. Diese Erkenntnisse können durch die Forschungsergebnisse von Venâncio et al. (1996) für das letztgenannte System bestätigt werden: Für hohe pH-Werte wurde hier aufgrund der Deprotonierung eine Anreicherung von Proteinen in der hydrophoberen PEG-Phase nachgewiesen.

### 2.1.2 Hydroxyethylstärke

Ein Grund für die Auswahl von Hydroxyethylstärke (HES) für diese Arbeit als Bestandteil des Zweiphasensystems und für die Herstellung von mit Wirkstoffen beladenen Mikropartikeln ist u. a. die ausgezeichnete physiologische Verträglichkeit und der lange bekannte Einsatz als Plasmaersatzmittel (Boldt, 2000; Kulicke & Heinze, 2006). Die Verwendung von HES für die Mikropartikelherstellung ist in der Literatur noch nicht beschrieben. Larionova et al. (1999)

beschreiben die Herstellung von Mikrokapseln aus HES durch Quervernetzung mit Terephthaloylchlorid. Lévy & Andry (1990) stellen HES-Mikrokapseln unter Verwendung von organischen Lösungsmitteln her. Die Möglichkeit der lösungsmittelfreien Herstellung von Mikropartikeln durch die Nutzung eines Zweiphasensystems lässt HES als optimales Polymer für diesen Zweck erscheinen.

Hydroxyethylstärke ist ein semi-synthetisch hergestelltes Polymer aus Wachsmaisstärke oder Kartoffelstärke. Es besteht fast ausschließlich aus Amylopektin, welches aus  $\alpha$ -1,4 glykosidisch verknüpften Glucosemolekülen besteht. An etwa jeder 17. Glucoseeinheit befinden sich  $\alpha$ -1,6 glykosidisch verknüpfte Glucoseketten, so dass ein mehrfach verzweigtes Makromolekül entsteht (Boldt, 2000) (Abbildung 2-4).

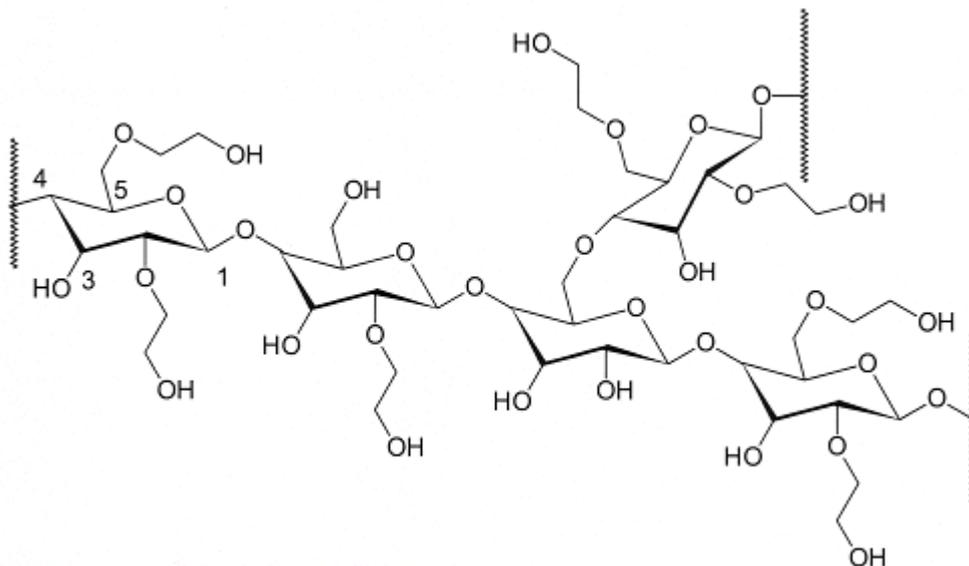


Abbildung 2-4: Ausschnitt aus der Strukturformel von Hydroxyethylstärke (HES)

Natives Amylopektin zeichnet sich durch eine schlechte Wasserlöslichkeit aus. Zur Verbesserung der Wasserlöslichkeit und zur Verhinderung des schnellen Abbaus durch das endogene Enzym Amylase erfolgt eine teilweise Hydroxyethylierung der Glucoseeinheiten. Dazu erfolgt in einem ersten Schritt die Spaltung der langen Ketten des Rohstoffes durch Säurehydrolyse auf ein mittleres Molekulargewicht von 450 000 bis 200 000 Dalton. Anschließend werden in alkalischer Lösung mit Ethylenoxid Hydroxyethylgruppen eingeführt, um so zu sehr gut wasserlöslichen Verbindungen zu gelangen.

Durch die zufällige Kettenspaltung ergeben sich zwei Variablen: Die erste Variable ist die Molmasse, welche nicht einheitlich ist und somit der angegebene Zahlenwert nur einen Richtwert darstellt. Die zweite Variable bei der Herstellung von HES ist der Grad und das Muster der Substitution der Hydroxylgruppen an den Glucosemolekülen (Leuthold, 2003).

In dieser Arbeit werden zwei Typen der Hydroxyethylstärke verwendet: HES 200/0,5 und HES 130/0,4, wobei – aufgrund der besseren Lösungseigenschaften – bereits nach den ersten Versuchen die Festlegung auf HES 130/0,4 erfolgte. Die Zahlen 200 bzw. 130 stehen für das Massenmittel der Molekülgröße in kDa und die Zahlenwerte 0,5 bzw. 0,4 für den molaren Substitutionsgrad (MS). Das heißt beispielsweise für HES 130/0,4, dass die Molekülgröße 130 000 Da beträgt und dass pro 100 Glucosemolekülen 40 Hydroxyethylgruppen in das Molekül eingeführt wurden.

### 2.1.3 Polyethylenglykol

Polyethylenglykol (syn.: Macrogol, PEG, Polyethylenoxid) ist ein nichtionogenes Homopolymer aus mindestens drei sich wiederholenden Ethylenresten, die durch eine Etherbrücke miteinander verbunden sind (Abbildung 2-5) (Fiedler, 2002).

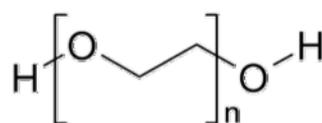


Abbildung 2-5: Strukturformel von Polyethylenglykol (PEG)

Aus der Strukturformel ergibt sich die Möglichkeit der Berechnung der Kettenlänge aus der Molekülmasse. Ein Monomer hat eine Molmasse von 44. Zieht man von der Molmasse des PEG-Derivates die Molmasse von Wasser ab und dividiert diesen Wert durch 44, erhält man die Anzahl verknüpfter Monomere. Das in dieser Arbeit verwendete PEG 8 000 ist demnach aus ca. 180 Ethylenoxid-Einheiten aufgebaut.

Die Herstellung von PEG erfolgt durch eine Polymerisationsreaktion von Etylenoxid durch alkalische Katalyse. Dazu wird Ethylenoxid in ein 120-135 °C heißes Ethylenglykol-Diethylenglykol-Wassergemisch eingeleitet. Beim Erreichen der gewünschten Kettenlänge wird die Reaktion durch Säurezugabe gestoppt.

Polyethylenglykol liegt, je nach Kettenlänge, in flüssiger ( $M_r$  zwischen 200 und 400 g/mol), pastöser ( $M_r$  zwischen 600 bis 2500 g/mol) oder fester Form ( $M_r > 3000$  g/mol) vor. Mit zunehmender Molekülmasse steigen die Viskosität von wässrigen Lösungen, die Härte und der Schmelzbereich. Die Bezeichnung „Polyethylenglykol“ ist bis zu einer molaren Masse von 35 000 g/mol gebräuchlich. Polyethylenglykole mit einer molaren Masse von  $> 35 000$  g/mol werden häufig als „Polyethylenoxid“ bezeichnet, da bei diesen Verbindungen der Einfluss der endständigen Hydroxylgruppe vernachlässigt werden kann.

Die Löslichkeit von Polyethylenglykol nimmt mit zunehmender Kettenlänge ab. Jedoch ist auch hochmolekulares Polyethylenglykol in Wasser sehr gut löslich. Beim Kontakt mit Wasser werden zwei Wassermoleküle durch Wasserstoffbrückenbindung an jeden Ether-Sauerstoff gebunden, wodurch PEG von einer hochgeordneten Flüssigkeitsschicht umgeben ist (Huddleston et al., 1991).

Im Europäischen Arzneibuch (2008) finden sich Polyethylenglykole unter der Bezeichnung „Macrogole“ mit einem Molekulargewicht von 300 bis 35 000 g/mol.

## **2.2 Hydrogele**

### **2.2.1 Begriffsdefinition und Eigenschaften**

Der Begriff Hydrogel setzt sich zusammen aus „hydro“ (griech. *hýdor* = Wasser) und „gel“ (lat. *gelatus* = erstarrt) (Duden, 2007) und bezeichnet ein wasserunlösliches Polymer Netzwerk, das beim Kontakt mit Wasser unter Volumenzunahme quillt und dabei seine Form beibehält (Baroli, 2007; Hoare & Kohane, 2008). Die Wasseraufnahmekapazität von Hydrogelen kann bis zum 1000-fachen des Eigengewichtes betragen (Hoffman, 2002).

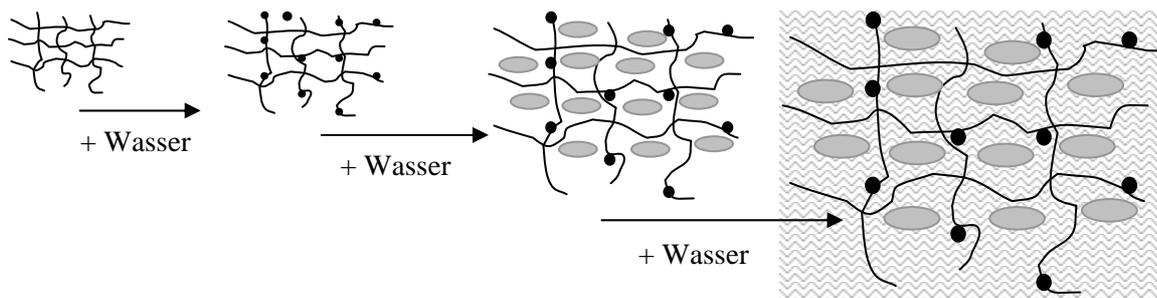
Die Wasserunlöslichkeit der Gele entsteht dadurch, dass in dem dreidimensionalen Polymer Netzwerk ein Gleichgewicht zwischen kohäsiven und abstoßenden Kräften vorliegt. Die Kräfte, die die Polymerketten auseinander drängen, entstehen durch deren Hydratisierung. Zu den kohäsiven Kräften gehören sowohl chemische Bindungen, wie z. B. kovalente Quervernetzung von Polymerketten, als auch physikalische Bindungen, wie z. B. Van-der-Waals-Kräfte, Wasserstoffbrückenbindungen, ionische Wechselwirkungen, kristallisierende Strukturen innerhalb der Polymerketten und Kombinationen aus diesen Kräften.

Die Hydrophilie der Polymernetzwerke basiert auf dem Vorhandensein funktioneller Gruppen wie z. B. Hydroxyl-, Carboxyl-, Carbamoyl-, Amid- und Sulfonsäure-Resten. Gleichwohl ist es möglich, Hydrogele aus sowohl hydrophilen als auch hydrophoben Polymeren z. B. durch Co-Polymerisation herzustellen (Baroli, 2007).

Hydrogele können nach verschiedenen Gesichtspunkten eingeteilt werden (Baroli, 2007; Koepcek & Yang, 2007; Lee & Yuk, 2007) in

- abbaubare und nicht abbaubare Hydrogele
- natürliche und synthetische Hydrogele
- physikalisch oder chemisch vernetzte Hydrogele
- homopolymere oder heteropolymere Hydrogele
- nichtionische und ionische Hydrogele
- amorphe oder (semi-) kristalline Hydrogele

Eine wichtige Eigenschaft von Hydrogelen ist deren Quellfähigkeit. Der Quellvorgang soll mit Hilfe von Abbildung 2-6 beschrieben werden: Durch Zugabe von Wasser oder einer wässrigen Lösung zu einem trockenen Hydrogelbildner wird durch die vorhandenen hydrophilen Gruppen Wasser in das Netzwerk gesogen. Der erste Teil des adsorbierten Wassers interagiert sehr stark mit den hydrophilen Gruppen und wird als „gebundenes Wasser“ oder „primär gebundenes Wasser“ bezeichnet. Da diese Wassermoleküle einen gewissen Platzbedarf besitzen, werden die Polymerketten aufgeweitet, wodurch weiteres Wasser in das Polymernetzwerk eindringen kann. Sind alle hydrophilen funktionellen Gruppen hydratisiert, interagiert das weiter eindringende Wasser mit dem primär gebundenen Wasser und es entsteht eine Wasserschicht zwischen den Polymerketten, die als „sekundär gebundenes Wasser“ bezeichnet wird. Dadurch vergrößert sich das Netzwerk und es kommt zur Quellung. Nun wird weiteres Wasser durch osmotische Kräfte in das Netzwerk gesogen, das als „Freies Wasser“ oder „Bulkwasser“ bezeichnet wird.



Trockenes  
Polymernetz-  
werk

Polymernetzwerk mit  
primär gebundenem  
Wasser

Polymernetzwerk mit  
sekundär gebunde-  
nem Wasser

Polymernetzwerk mit eingelagertem  
Bulkwasser, das bis zur maximalen  
Quellung aufgenommen wird

Abbildung 2-6: Schematische Darstellung des Quellungsprozesses eines Hydrogels

● = Primär gebundenes Wasser, ● = sekundär gebundenes Wasser,

≡ = Bulkwasser

Ein chemisch vernetztes Hydrogel (Hauptvalenzgel) weist eine begrenzte Quellfähigkeit auf, da die Elastizität der chemischen Bindungen nicht unendlich ist (Baroli, 2007; Hoffman, 2002). Der Endpunkt der Quellung eines chemisch vernetzten Hydrogels ist erreicht, wenn der osmotische Druck und die kovalenten Bindungen des Gelnetzwerks miteinander im Gleichgewicht stehen. Für den Einsatz als Drug Delivery System kommen aufgrund ihrer begrenzten Quellfähigkeit nahezu ausschließlich chemisch vernetzte Hydrogele in Frage. Physikalisch vernetzte Hydrogele (Nebenvaleenzgele) sind im Gegensatz zu den Hauptvalenzgelen meist unbegrenzt quellfähig, da hier der Zusammenhalt des Gelnetzwerkes ausschließlich durch physikalische Bindungen erfolgt. Diese sind lockerer als die kovalente Quervernetzung der Hauptvalenzgele und können sich mit zunehmender Wassereinlagerung immer weiter aufweiten. Eine Ausnahme stellen dabei jedoch ionotrope Gele dar: Diese Nebenvaleenzgele sind trotz ihrer physikalischen Vernetzung nur begrenzt quellfähig (z. B. Alginate).

Das Ausmaß der Quellung von Hydrogelen ist abhängig vom Grad der Quervernetzung: Je höher die Quervernetzung des Polymernetzwerks ist, desto weniger quillt das Hydrogel, da die Bewegungsfreiheit der Polymerketten eingeschränkt und damit die Wasseraufnahmefähigkeit vermindert ist. Weiterhin ist die Quellfähigkeit abhängig von der Polarität des verwendeten Polymers. So können hydrophile Polymere deutlich mehr Wasser aufnehmen als hydrophobe Polymere, was sich in einer höheren Volumenzunahme auswirkt (Peppas et al., 2000). Da die Vernetzung und damit die Struktur von physikalisch und chemisch vernetzten Hydrogelen (siehe

---

Kapitel 2.2.4) nicht gleichmäßig ist, gibt es in Hydrogelen immer stärker und schwächer gequollene Bereiche (Hoffman, 2002).

## 2.2.2 Physiologische Verträglichkeit von Hydrogelen

Anforderungen an Hydrogele sind eine hervorragende Biokompatibilität und dass alle verwendeten Bestandteile untoxisch und nicht reizend sind. Weiterhin müssen die zur parenteralen Applikation hergestellten Darreichungsformen kanülangänglich sein (Degim & Çelebi, 2007).

Die sehr gute Biokompatibilität von Hydrogelen ist in der Literatur mehrfach beschrieben und beruht auf dem hohen Wassergehalt und der physikochemischen Ähnlichkeit zur nativen Extrazellulärmatrix, was sowohl die Zusammensetzung als auch die Konsistenz betrifft (Hoare & Kohane, 2008; Kopecek & Yang, 2007; Lee & Yuk, 2007).

Untersuchungen zur Biokompatibilität verschiedener – insbes. HEMA-haltiger – Hydrogele zeigen eine sehr gute Verträglichkeit dieser Strukturen bei Ratten und Schweinen. Dabei spielt die Zusammensetzung der verschiedenen Hydrogele eine untergeordnete Rolle. Entscheidend für die Biokompatibilität ist die Porosität (Kopecek & Yang, 2007). Auch die Oberflächenbeschaffenheit spielt im Bezug auf die Immunantwort eine wichtige Rolle: Hydrogel-Mikropartikel mit einer glatten Oberfläche bewirken eine deutlich geringere Antigenausschüttung als Mikropartikel mit rauer Oberfläche (Balasse et al., 2008).

Auch die Partikelgröße ist von großer Bedeutung: Zur parenteralen Applikation sollte die Partikelgröße ca. 7  $\mu\text{m}$  betragen, um eine gute Injizierbarkeit zu gewährleisten (Chung et al., 2005). Jedoch werden Mikropartikel mit einer Größe unter 10  $\mu\text{m}$  von Monozyten des Bauchfells bevorzugt internalisiert und phagozytiert (Audran et al. 2003; Balasse et al., 2008), weshalb nur Mikropartikel > 10  $\mu\text{m}$  zur Wirkstofffreisetzung zur Verfügung stehen. Aus diesen Gründen ist es notwendig, Kompromisse in Bezug auf die Größe einzugehen und erstrebenswert, Mikropartikel mit einer Größe von ca. 10 bis 20  $\mu\text{m}$  und möglichst glatter Oberfläche herzustellen.

Obwohl die Vorteile von Hydrogelen die Nachteile bei Weitem übertreffen, sind bei der Herstellung und Anwendung von Hydrogelen einige Beschränkungen zu beachten. So lassen sich nach Baroli (2007) einige Hydrogele aufgrund ihrer unzureichenden mechanischen Stabilität nur schlecht applizieren. Weiterhin können die Inkorporierung von Wirkstoffen, die mangelnde Sterilisationsfähigkeit (insbesondere für proteinbeladene Hydrogele) und die evtl. auftretende

Toxizität von unzureichend entfernten Monomeren Probleme bereiten (Hoare & Kohane, 2008; Hoffman, 2002).

### **2.2.3 Anwendung**

Die Anwendungsbereiche von Hydrogelen sind vielfältig und werden stetig erweitert. In der Medizin werden Hydrogele beispielsweise als Hämodialysemembranen, künstliche Linsen und Hornhäute in der Ophthalmologie, als Coating-Material für Stents, als Schwämme, die in die Knochensubstanz einwachsen und als künstlicher Hautersatz verwendet. Die Anwendung als künstliche Hybrid-Organ (z. B. Leber, Pankreas) wird derzeit untersucht. Auch als weiche Kontaktlinsen, als Trommelfell-Ersatz, als Rhinoplastik in der plastischen Chirurgie und als Drug Delivery Systeme sind Hydrogele derzeit häufig in Gebrauch (Baroli, 2007; Kopecek & Yang, 2007).

Als Drug Delivery Systeme kommen Hydrogele meist in Form von Matrices, Filmüberzügen, Membranen (z. B. in Transdermalen therapeutischen Systemen), Implantaten und Mikro- bzw. Nanopartikeln oder -kapseln vor (Baroli, 2007; Degim & Çelebi, 2007). Die Applikation dieser Arzneiformen ist auf oralem, rektalem, okulaem, epidermaleem und parenteralem Weg möglich (Peppas et al., 2000).

### **2.2.4 Herstellung von Hydrogelen**

Die Herstellung von Hydrogelen ist, wie bereits in Kapitel 2.2.1 erwähnt, sowohl durch chemische als auch durch physikalische Bindungen möglich. Beide Methoden sollen hier kurz erläutert werden.

#### **2.2.4.1 Chemisch verknüpfte Hydrogele**

Chemisch verknüpfte Hydrogele (syn.: Hauptvalenzgele) werden durch eine kovalente Quervernetzung der Polymerketten erzielt. Die Quervernetzung kann auf zwei verschiedenen Wegen erfolgen. Zum einen ist es möglich, die Crosslinker *in situ* in einer „Eintopf-Methode“ mit den Monomeren und allen weiteren Hilfsstoffen zu mischen und so in einem Schritt ein Hydrogel herzustellen. Beispiele für diese Methode sind die Reaktionen (1) eines Amins mit einem Aldehyd zu einer Schiffsch Base, (2) die Reaktion von Hydrazinen mit Aldehyden zu einem Hydrazon und (3) die Reaktion von Acrylaten mit primären Aminen oder Thiolen zu einem sekundären Amin bzw.

einem Sulfid. Der Nachteil dieser Methode liegt in der Verwendung von potentiell toxischen oder allergenen Crosslinkern, die häufig nur unzureichend aus dem Endprodukt entfernt werden können. Eine zweite Methode der chemischen Quervernetzung ist die Funktionalisierung der Polymere durch das Einfügen reaktiver Gruppen bereits vor der Quervernetzung (Hoare & Kohane, 2008). Der Vorteil der Vermeidung toxischer Monomere im Endprodukt kompensiert den Mehraufwand, der mit einem weiteren Herstellungsschritt verbunden ist. Aus diesem Grund wird für diese Arbeit ein Hydrogel gewählt, das durch die letztgenannte Methode synthetisiert wird (siehe Kapitel 2.2.10).

Die für die Quervernetzung notwendige Energie wird häufig durch Bestrahlung der Monomere oder Makromoleküle mit UV-Licht, Gammastrahlen, Röntgenstrahlung oder Elektronenstrahlung ins System eingebracht. Dazu ist es notwendig, dass das Ausgangsmaterial mindestens eine Vinylgruppe besitzt oder diese durch chemische Modifizierung des Ausgangsmaterials ins Molekül eingeführt wird. Häufig eingesetzte Vinylgruppen-enthaltende Monomere sind (Meth-) Acrylsäure, Hydroxyethylmethacrylat (HEMA), Zimtsäure und Vinylpyrrolidon. Durch Zugabe eines Photoinitiators, der unter Lichtabsorption Radikale bildet, werden unter Aufspaltung der Doppelbindungen der Vinylgruppen jeweils zwei Polymermoleküle miteinander verknüpft und es entsteht ein hochmolekulares Netzwerk. Die Herstellung von chemisch verknüpften Hydrogelen durch Quervernetzung ist sowohl *in vitro* als auch *in vivo* möglich (Baroli et al., 2007; Hoare & Kohane, 2008; Kopecek & Yang, 2007). Ein Beispiel für eine häufig verwendete *in vivo*-Polymerisation ist die Aushärtung von HEMA-enthaltenden Kunststoffpolymeren des Komposits in der Zahnmedizin durch blaues Licht.

#### **2.2.4.2 Physikalisch verknüpfte Hydrogele**

Physikalisch verknüpfte Hydrogele (syn.: Nebenvalenzgele) haben gegenüber den chemisch verknüpften Hydrogelen den Vorteil, dass sie ohne die Verwendung von toxischen und reaktiven Molekülen herstellbar sind. Allerdings haben sie zwei entscheidende Nachteile: Zum einen sind sie mechanisch instabiler, wodurch keine Freisetzung von Wirkstoffen über einen sehr langen Zeitraum möglich ist. Zum anderen sind die Steuerung und Kontrolle der Wirkstofffreisetzung sehr schwierig oder nicht möglich (Hoare & Kohane, 2008). Physikalische Bindungen sind beispielsweise über ionische Wechselwirkungen möglich. Dabei reagieren Polymere entweder mit ihrem Gegenion (ionotrope Hydrogele; z. B. Alginate mit Calcium-Ionen) oder zwei unterschiedlich geladene Polymere interagieren miteinander („Komplexe Koazervation“) (Kalpana & Park, 1993). Eine Vernetzung ist auch möglich über eine teilweise Kristallisation von Polymerketten. Diese

kristallisierten Polymerbereiche interagieren durch ihre Inflexibilität mit weiteren Polymermolekülen und es bildet sich ein sterisch stabilisiertes Netzwerk aus. Ein Beispiel hierfür ist Polyvinylalkohol, der durch Einfrieren-Auftauen-Zyklen partiell kristallisiert werden kann. Auch Wasserstoffbrücken und hydrophobe Wechselwirkungen sind in der Lage, Polymernetzwerke zu stabilisieren (Kalpana & Park, 1993). Durch Protonierungs- und Deprotonierungsprozesse bei verschiedenen pH-Werten ist diese Art der Bindung stark vom pH-Wert abhängig (Baroli et al., 2007; Hoare & Kohone, 2008).

### **2.2.5 Herstellung von Mikropartikeln**

Die Herstellung von pharmazeutisch verwendeten Mikropartikeln auf Hydrogelbasis kann auf verschiedenen Wegen stattfinden. Eine Methode ist, wie bereits in Kapitel 2.1 erwähnt und in Kapitel 2.2.10 genauer ausgeführt, die Herstellung von Mikropartikeln durch eine Wasser-in-Wasser-Emulsionstechnik (Franssen et al., 1998). Eine weitere Möglichkeit ist das Mischen zweier enantiomerer Polymere, was von Hennink et al. (2004) am Beispiel von Dextran-(L)-Lactat und Dextran-(D)-Lactat gezeigt wird. Weitere Methoden unter Verwendung organischer Lösungsmittel sind die Herstellung durch die „Solvent Evaporation Methode“ und die „Koazervationsmethode“ (Degim & Çelebi, 2007).

Bei der „Solvent-Evaporation-Methode“ wird der Arzneistoff in der Lösung eines Polymers in einem mit Wasser nicht mischbaren Lösungsmittel (z. B. Dichlormethan, Hexan) gelöst oder dispergiert. Diese arzneistoffhaltige Polymerphase wird anschließend in einer wässrigen Phase zur Bildung wirkstoffhaltiger Polymertröpfchen emulgiert. Das Lösungsmittel wird anschließend abgedampft („evaporation“) und es werden durch Erhärten des Polymers Mikropartikel erhalten, die abschließend von der wässrigen Phase z. B. durch Filtration abgetrennt und getrocknet werden (Bodmeier, 2007).

Für die einfache „Koazervationsmethode“ (*lat. co*: zusammen; *lat. acervus*: Anhäufung) wird mindestens ein Polymer benötigt. Dabei wird der Wirkstoff in das Gemisch des Polymers und eines wässrigen oder organischen Lösungsmittels eingebracht. Die Koaleszenz kann durch eine pH-Wert- oder Temperaturänderung, durch Zugabe von Salzen (Aussalzung) oder Silikonöl (Gander et al., 2001) induziert werden, wodurch eine Phasenseparation („Koazervation“) hervorgerufen wird. Bei dieser entstehen eine polymerreiche und eine lösungsmittelreiche Phase. Anschließend erfolgt die Adsorption der Koazervatteilchen (Polymere) an der Oberfläche des Wirkstoffs bzw. der Tröpfchen und es kommt zur Koaleszenz. Nach der Koaleszenz wird durch Zugabe von z. B. Glutaraldehyd

---

die Koaleszenzschicht quervernetzt. Abschließend kann diese durch Behandlung mit einem Nicht-Lösemittel des Polymers (z. B. Heptan oder Hexan) zusätzlich ausgehärtet werden. Die „komplexe Koazervation“ verläuft nach dem gleichen Schema, nur werden in diesem Fall zwei gegensätzlich geladene Polymere eingesetzt, die sich gegenseitig in ihrer Hydratisierung beeinflussen und dadurch ausfallen. Dabei entstehen zwei Phasen, wobei in einer der beiden Phasen beide Polymere angereichert sind. Aus dieser polymerreichen Phase wird durch Adsorptionseffekte – wie bereits bei der „einfachen Koazervation“ beschrieben – eine Hülle um den zu inkorporierenden Stoff gebildet. Als Beispiel für diese Art der Koazervation ist das System aus Gelatine und Gummi arabicum zu nennen.

Eine weitere Methode ist die Herstellung von Liposomen mit eingeschlossenem Polymer-Hydrogel und die anschließende Entfernung der Lipidschicht mit speziellen Detergentien (Van Thienen et al., 2005).

## **2.2.6 Einbettung von Wirkstoffen**

In Hydrogele können sowohl Moleküle (Proteine, Hormone, etc.) als auch Zellen, die diese Wirkstoffe produzieren, eingebettet werden. Besonders im Bereich der Zellkultur ist die Inkorporierung von Zellen von großer Bedeutung. Da für diese Arbeit jedoch nur die Einbettung von Proteinen von Interesse ist, wird im Weiteren ausschließlich darauf eingegangen.

Die Einbettung von Wirkstoffen in ein Polymernetzwerk kann auf unterschiedliche Weise erfolgen. Die gebräuchlichste Methode ist die Zugabe des Wirkstoffs zu einer Lösung hydrogelbildender Monomere, Crosslinker und Photoinitiatoren. Nach der Quervernetzung bleibt der Wirkstoff im Netzwerk „gefangen“. Eine zweite Möglichkeit ist die Zugabe des Wirkstoffs zu einer Polymerlösung und die Quervernetzung durch chemische oder physikalische Wechselwirkungen. Die letztgenannte Methode findet über eine chemische Quervernetzung auch für die vorliegende Arbeit Anwendung. Zum Schutz des Proteins kann dieses auch in gecoateter Form zum Einsatz kommen (Baroli et al., 2003 und Baroli, 2007). Dabei wird das Protein durch eine Naßgranulation mit Gelatine vor den Polymerisationsreagentien geschützt.

Während bei den genannten Methoden die Beladung des Hydrogels mit Wirkstoff direkt im Herstellungsprozess erfolgt, ist auch eine nachträgliche Beladung möglich (Devy et al., 2006; Balasse et al., 2008). Der Nachteil der nachträglichen Beladung besteht – je nach Porosität der

Matrix – in einer meist geringen Beladungseffizienz (Chen et al., 2005; Hennink et al., 2004), besonders im Fall hochmolekularer oder hydrophober Wirkstoffe (Hoare & Kohane, 2008).

Die Bestimmung der Einschussrate des Wirkstoffs in Mikropartikel ist auf verschiedenen Wegen möglich. Eine Möglichkeit ist die Stickstoffanalyse der eingeschlossenen Proteine (Vlugt-Wensik et al., 2007). Bei Kenntnis des Stickstoffgehaltes des eingesetzten Proteins kann dessen Menge berechnet werden. Weiterhin kann die Massenbilanzmethode herangezogen werden (Chen et al., 2005; Franssen et al., 1999). Dabei wird das nicht eingeschlossene Protein im Überstand und den Waschwasserfraktionen der Mikropartikel gemessen und von der eingesetzten Menge abgezogen. Es ist auch möglich, bereits während der Herstellung der Mikropartikel hydrolytisch aktive Spacer in das Gelgerüst einzubauen (van Dijk-Wolthuis et al., 1997), die durch den Kontakt mit Wasser das Gelgerüst zum Brechen bringen und so den inkorporierten Stoff freigegeben. Diese Methode eignet sich jedoch nicht für die Herstellung von Mikropartikeln, die den Wirkstoff über einen langen Zeitraum freisetzen sollen. Eine weitere Methode ist der forcierte Abbau des Gelgerüsts durch Enzyme. Diese können entweder bereits bei der Herstellung in die Mikropartikel eingeschlossen und durch Wasserzugabe aktiviert werden (Franssen et al., 1999) oder erst später für der Bestimmung der Einschussrate zugesetzt werden (Devy et al., 2006). In der hier vorliegenden Arbeit wurde die Einschussrate zum einen durch die Massenbilanzmethode und zum anderen durch den Abbau des Gelgerüsts mit Alpha-Amylase bestimmt.

### **2.2.7 Wirkstofffreisetzung aus Hydrogelen**

Die Freisetzungsmechanismen aus Hydrogelen sind vielfältig. Oft kommen auch Kombinationen verschiedener Mechanismen vor. In Abbildung 2-7 sind die am häufigsten vorkommenden Mechanismen schematisch zusammengefasst.

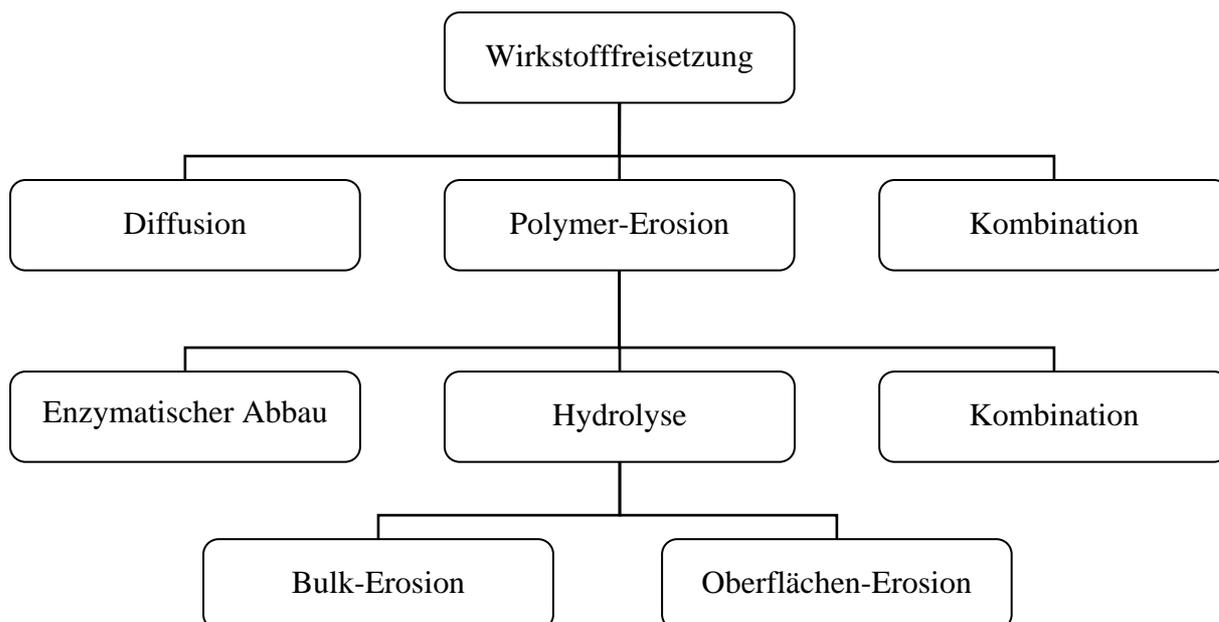


Abbildung 2-7: *Mechanismen der Wirkstofffreisetzung aus Mikropartikeln (nach Degim & Çelebi, 2007)*

Sowohl die Geschwindigkeit als auch die Kinetik der Freisetzung von Wirkstoffen aus Hydrogelen sind über den Grad der Quervernetzung und damit der Netzwerkmaschendichte und der Affinität des Hydrogels zum umgebenden Medium steuerbar (Hoare & Kohane, 2008; Kopecek & Yang, 2007).

Die Wirkstofffreisetzung aus Hydrogelen ist abhängig vom Quellungsverhalten des Gels, dem Ausmaß der Erosion, dem Volumenanteil an Wasser, der das Hydrogel umgibt, dem Anteil an Bulkwasser, der zum Transport der Wirkstoffmoleküle zur Verfügung steht, dem Porendurchmesser und der Porosität des Hydrogels. Auch der Abstand der Polymerketten zueinander und die Ladung der Polymere, die sowohl zu einem Verschluss der Poren des Hydrogels als auch zu einer Interaktion mit eingebetteten Proteinen durch ionische Wechselwirkungen führen können, sind von Bedeutung. Weiterhin sind hydrophobe Wechselwirkungen sowohl innerhalb des Polymernetzwerks als auch zwischen Polymer und Protein von großer Bedeutung (Hoffman, 2002; Peppas et al., 2000).

Die zur Charakterisierung der Freisetzungskinetik aus Hydrogelen verwendeten Methoden werden in Kapitel 2.5 näher erläutert.

### **2.2.8 Hydrogelabbau**

Wie in Kapitel 2.2.1 bereits erwähnt, gibt es bioabbaubare und nicht bioabbaubare Hydrogele. Die Verwendung von nicht bioabbaubaren Hydrogelen bedingt durch die parenterale Gabe die operative Entfernung des Hydrogels nach einer bestimmten vorher festgelegten Zeit oder wenn eine gleichmäßige Wirkstofffreisetzung nicht mehr gewährleistet ist (Kalpana & Park, 1993). Um einen erneuten invasiven Eingriff am Patienten zu vermeiden, werden bioabbaubare Hydrogele bevorzugt. Der Abbau dieser Hydrogele (Erosion) findet entweder durch Abbau des Polymerrückgrates oder durch Aufspaltung der Quervernetzungen durch den Einsatz bioabbaubarer Crosslinker bei der Herstellung statt. Der Abbau des Polymerrückgrates resultiert in meist löslichen, niedermolekularen Bausteinen, während der Abbau der Crosslinker zu höhermolekularen Polymeren führt. In Polymernetzwerken, die aus natürlichen Polymeren aufgebaut sind, finden meist beide Arten des Abbaus gleichzeitig statt. Die Geschwindigkeit der Erosion ist abhängig vom pH-Wert, der Ionenstärke, der hydrolytischen und der enzymatischen Aktivität des umgebenden Mediums (Baroli et al., 2007).

### **2.2.9 Bioresponsive Hydrogele**

In letzter Zeit ist der Fokus immer häufiger auf sog. „Bioresponsive Hydrogele“ gerichtet. Dies sind Hydrogele, die auf bestimmte Umgebungsbedingungen reagieren, was sich als Quellung oder Schrumpfung (in chemisch vernetzten Hydrogelen) oder Gel-Sol-Umwandlungen (in physikalisch vernetzten Hydrogelen) auswirkt. Stimuli für diese Umwandlungen sind sowohl physikalische als auch chemische Faktoren wie z. B. Änderungen des pH-Werts, der Ionenstärke, der Temperatur, dem Lösungsmittel, Lichteinwirkung und Druck (Baroli, 2007; Kopecek & Yang, 2007; Ulijn et al., 2007; Lee & Yuk, 2007)

### **2.2.10 HES-HEMA-Hydrogele**

In dieser Arbeit werden Hydrogel-Mikropartikel hergestellt. Zu deren Herstellung ist es notwendig, quervernetzbare Gruppen in die HES-Struktur einzuführen. Dies erfolgt durch die kovalente Bindung von Hydroxyethylmethacrylat-Gruppen an das HES-Rückgrat. Dazu wird Hydroxymethacrylat im ersten Schritt mit Carbonyldiimidazol (CDI) über eine CDI-Kopplungsreaktion angebunden und zum HEMA-CI umgesetzt (Abbildung 2-8).

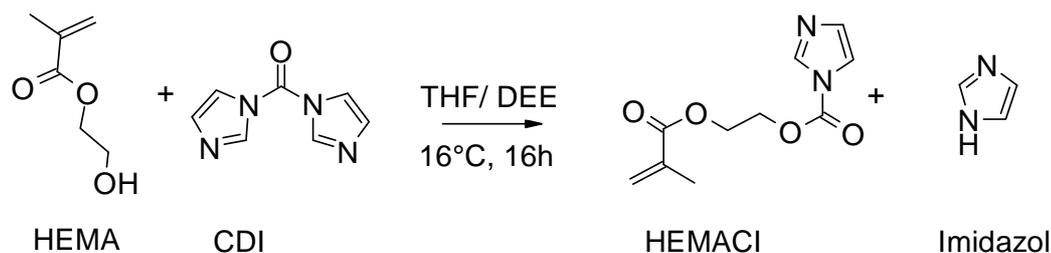


Abbildung 2-8: Umsetzung von HEMA mit Carbonyldiimidazol

Das so gebildete Hydroxyethylmethacrylat-Carbonylimidazol wird mit HES versetzt und reagiert mit dessen Hydroxylgruppen unter Abspaltung von Imidazol zu einer Carbonatesterbindung, dem HES-HEMA (Abbildung 2-9).

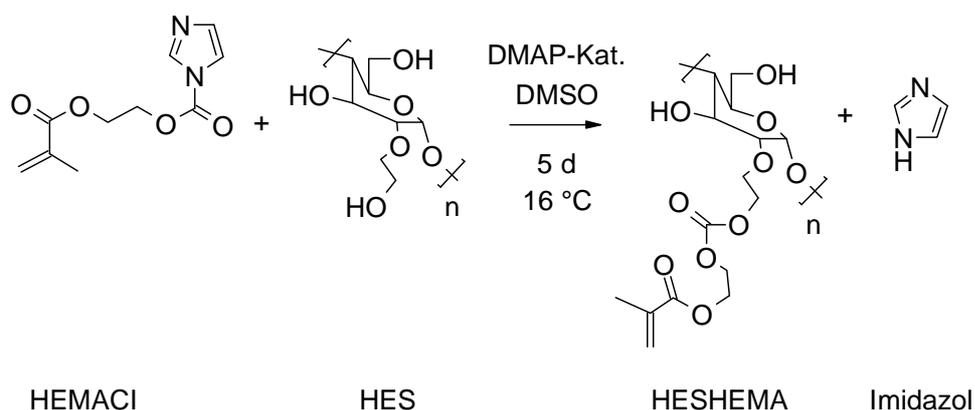


Abbildung 2-9: Umsetzung von Hydroxyethylmethacrylat-Carbonylimidazol (HEMA-CI) mit Hydroxyethylstärke (HES) zu HES-HEMA und Imidazol

HES-HEMA wird als Ausgangsstoff für die Herstellung eines Zweiphasensystems mit PEG genutzt und dient als Basis für die Mikropartikelherstellung. Dabei werden eine HES-HEMA-reiche Phase und eine PEG-reiche Phase ausgebildet. Durch Vortexen der Mischung, der ein Photoinitiator zugesetzt wird, verteilt sich die HES-HEMA-Phase als Tröpfchen in der PEG-Phase. Bei der anschließenden Bestrahlung der homogenen Mischung mit UV-Licht (366 nm, 3,5 mW/cm<sup>2</sup>, 30 min) wird der HES-HEMA-Anteil quervernetzt (Abbildung 2-10) und es entsteht ein nicht wasserlösliches, bioabbaubares, quellfähiges Hydrogel in Form von Mikropartikeln.

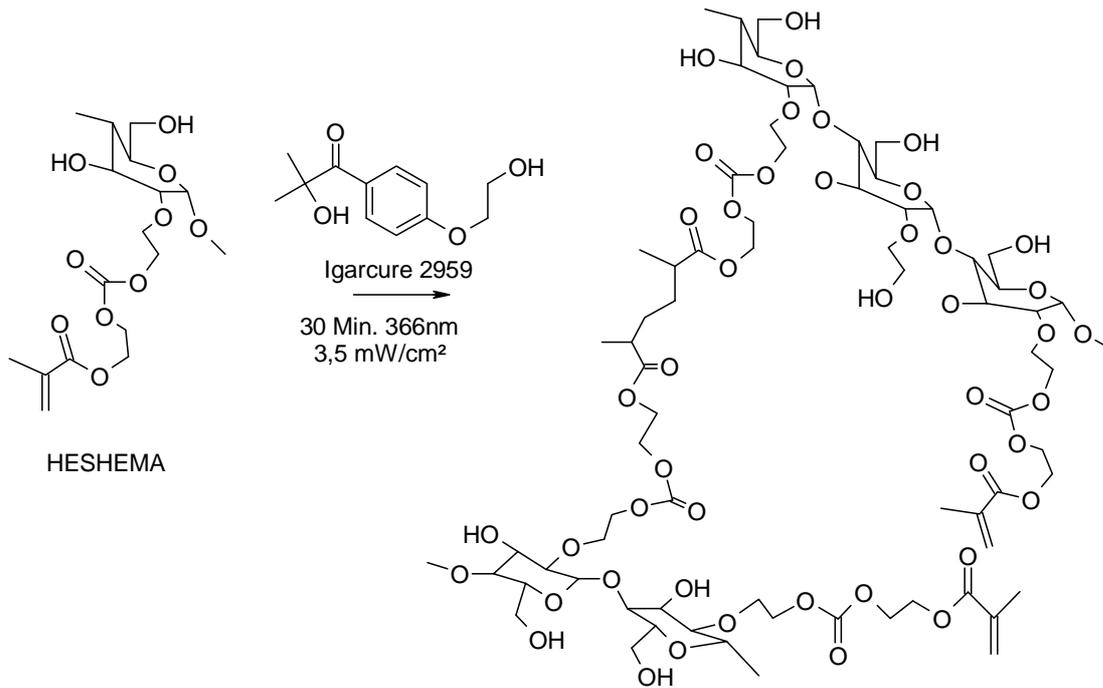


Abbildung 2-10: Quervernetzung von HES-HEMA zum Hydrogel

In Abbildung 2-11 ist die Herstellung von HES-HEMA-Mikropartikeln schematisch dargestellt. Eine Stammlösung von HES-HEMA wird mit dem einzubettenden Wirkstoff gemischt und mit einer PEG-Stammlösung überschichtet. Diese Mischung wird zur Viskositätserhöhung auf 4 °C gekühlt und anschließend 1 min gevortext. Die entstandene Wasser-in-Wasser-Emulsion wird mit UV-Licht bestrahlt, wodurch die Quervernetzung von HES-HEMA induziert wird und dadurch Mikropartikel entstehen.

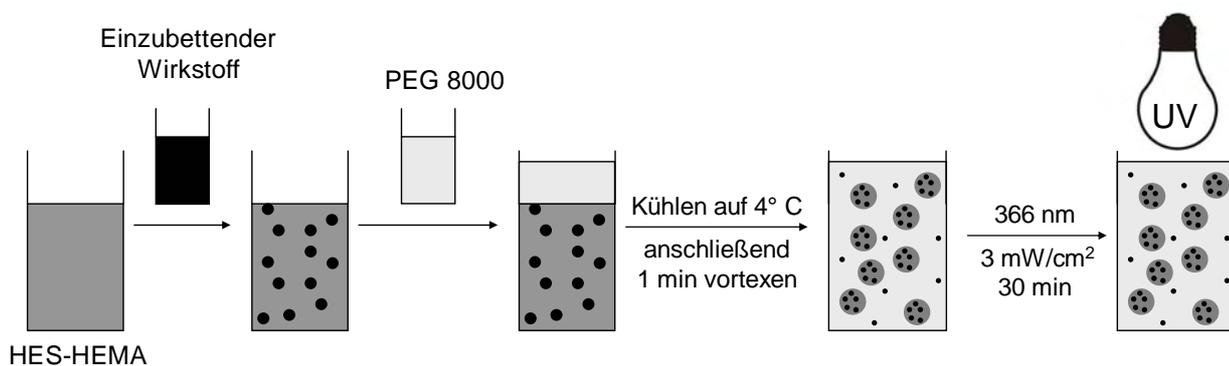


Abbildung 2-11: Schematische Darstellung des Herstellungsprozesses von HES-HEMA-Mikropartikeln

---

## 2.3 Modellsubstanzen

### 2.3.1 Aufbau und Eigenschaften von Proteinen

Der Begriff Protein wurde von dem holländischen Chemiker Gerardus Mulder im Jahre 1838 geprägt. Er entdeckte stickstoffhaltige Substanzen, die quantitativ in verschiedenen Geweben vorherrschen und gab diesen Stoffen den Namen Proteine (von griechisch *proteion*: „die erste Stelle“).

Proteine sind hochmolekulare, oft grenzflächenaktive Polymere, die aus L-Aminosäuren aufgebaut sind und zu den Grundbausteinen aller Zellen gehören. Dabei sind die einzelnen Aminosäuren durch Peptidbindungen miteinander verknüpft und bilden die Primärstruktur des Proteins. Die in natürlichen Geweben vorkommenden Proteine haben eine Masse von 10 000 bis 100 000 Da, welche wiederum durch nichtkovalente Wechselwirkungen miteinander verbunden sein können, woraus deutlich größere Moleküle entstehen. Zur Sekundärstruktur von Proteinen gehören rechtsdrehende  $\alpha$ -Helices und  $\beta$ -Faltblätter, welche durch das maximal mögliche Ausmaß an Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Carbonyl- und den Aminogruppen der Aminosäuren stabilisiert werden. Die Tertiärstruktur von Proteinen beschreibt die durch Wasserstoffbrückenbindungen, Disulfidbrücken, ionische und hydrophobe Wechselwirkungen bedingte dreidimensionale Anordnung aller Atome eines Moleküls. Sehr große Proteine bestehen oft aus mehreren Polypeptidketten, deren gesamtheitliche Anordnung als Quartärstruktur bezeichnet wird. Die Primärstruktur von Proteinen bedingt indirekt die Art der Faltung der Polypeptidketten im Raum (3-D-Struktur oder native Struktur), welche durch oben genannte Bindungen stabilisiert wird. Die biologische Aktivität und damit die Wirksamkeit dieser Stoffgruppe als Arzneimittel sind nur gegeben, wenn das Protein in seiner nativen Struktur vorliegt (Christen & Jaussi, 2005; Degim & Celebi, 2007).

Aminosäuren, die Bausteine der Proteine, sind Zwitterionen, d. h., sie enthalten sowohl positiv geladene Aminogruppen als auch negativ geladene Carboxylgruppen. Am isoelektrischen Punkt, welcher für jedes Protein spezifisch ist, liegt das Protein ungeladen vor und richtet sich im elektrischen Feld lediglich aus; es wandert jedoch nicht. Hier ist die Wasserlöslichkeit am geringsten, da aufgrund der entstandenen intramolekularen Ladungen keine stabile Hydrathülle mehr gebildet werden kann. Der isoelektrische Punkt ist für die Arbeit mit Proteinen von entscheidender Bedeutung. So können zwischen positiv und negativ geladenen Proteinen abhängig vom pH-Wert Komplexe gebildet werden (Selby, 1999; van de Weert, 2004).

Proteine in Form von rekombinant hergestellten Arzneimitteln erlangen in jüngerer Zeit eine immer größere Bedeutung. Betrachtet man alle rekombinant hergestellten Arzneimittel (von der Präklinik bis zum zugelassenen Arzneimittel), so macht der Anteil dieser Wirkstoffe ca. 25 % aller Wirkstoffe aus (Zündorf & Dingermann, 2008). Bedingt durch die komplexe Struktur der Proteine und der damit einhergehenden Gefahr von Wirksamkeitsverlusten durch Abbaureaktionen, Denaturierung, etc. stellt die Entwicklung von geeigneten Formulierungen eine Herausforderung für die pharmazeutische Technologie dar.

Die native Struktur von Proteinen kann durch chemische und physikalische Faktoren beeinflusst werden (Wang, 2005; Tabelle 2-2), wobei Denaturierung und Adsorptionsvorgänge wohl die größte Gefahr beim Umgang mit Proteinen darstellen.

Auslöser für Instabilitätsreaktionen von Proteinen können die Proteinkonzentration und die Temperatur (Guo et al., 2006), der pH-Wert und die Zusammensetzung des Lösungsmittels, die Ionenstärke und Grenzflächenphänomene sein (Chi et al., 2003). Eine Denaturierung des Proteins und damit eine Konformationsänderung kann u. a. beim Kontakt mit organischen Lösungsmitteln auftreten (Christen & Jaussi, 2005; Inoue & Timasheff, 2004; Miroliaei & Nemat-Gorgani, 2002). Aus diesen Gründen wird für die vorliegende Arbeit ein pH-neutrales System gewählt, das ohne die Verwendung von organischen Lösungsmitteln, hohen Salzkonzentrationen und thermischen Belastungen auskommt.

Tabelle 2-2: *Instabilitäten von Proteinen (nach Wang, 2005)*

<b>Chemische Instabilitäten</b>	<b>Physikalische Instabilitäten</b>
Hydrolyse	Denaturierung
Razemisierung	Aggregation
Oxidation	Präzipitation
Disulfidaustausch	Adsorption
$\beta$ -Eliminierung	

### 2.3.2 Lysozym

Lysozym wurde 1922 von Alexander Fleming entdeckt (Fleming, 1922). Es handelt sich hierbei um ein Enzym, welches das Murein von Bakterienzellwänden in Disaccharide spaltet und deshalb auch

als Muraminidase bezeichnet wird. Es kommt im Speichel, der Tränenflüssigkeit, und im Sekret von Nasen- und Darmschleimhäuten vor. Durch seine bakterizide Funktion ist Lysozym ein wichtiger Bestandteil des menschlichen Abwehrsystems zur Bekämpfung bakterieller Infektionen.

Als Modell-Protein wird in dieser Arbeit sowohl Lysozym aus Hühnereiweiß (HEW-Lysozym = Hen Egg White-Lysozyme) als auch Humanlysozym verwendet. Gründe für die Auswahl von Lysozym als Modellprotein sind sowohl die häufige Verwendung als preisgünstiges Modellprotein als auch dessen Molekülgröße, die in einem ähnlichen Größenbereich liegt wie die von therapeutisch wichtigen Proteinen, z. B. verschiedenen Bone Morphogenetic Proteinen (z. B. BMP 2 und BMP 14) .

Ein weiterer Grund ist seine – im Vergleich mit anderen Proteinen – hohe Stabilität gegenüber exogenen Faktoren, wie z. B. gegenüber thermischer Belastung und dem Einfluss von hoher Luftfeuchtigkeit. Lysozym besitzt in verdünnten Lösungen eine hohe Resistenz gegen thermische Belastungen bis ca. 60 °C (Guo et al., 2006). Weiterhin fanden Elkordy et al. (2004) eine hohe Stabilität (98 - 101 % enzymatische Aktivität) gegenüber hohen Luftfeuchtigkeiten von bis zu 65 %, wobei gefriergetrocknetes und umkristallisiertes Lysozym eine deutlich höhere Stabilität aufweisen als sprühgetrocknetes Lysozym. Aus diesem Grund wurde für alle Versuche dieser Arbeit lyophilisiertes Lysozym verwendet.

HEW-Lysozym besteht aus 129 Aminosäuren und besitzt eine molare Masse von 14,4 kDa. Der isoelektrische Punkt liegt bei pI 10 bis 11 (Feng, 2009; Hachem, 1996), das pH-Optimum bei ca. 5,5 und das Temperatur-Optimum bei ca. 40 °C (Brenda, 2009). Lysozym weist eine globuläre Struktur auf, die aus vier  $\alpha$ -Helices und drei  $\beta$ -Faltblättern aufgebaut ist und vier Disulfidbrücken besitzt (Schwalbe et al., 2001; Khalifeh et al., 2007) (Abbildung 2-12).



Abbildung 2-12: 3-D-Strukturmodell von Lysozym aus Hühnereiweiß

Humanlysozym ist mit 130 Aminosäuren dem Lysozym aus Hühnereiweiß strukturell sehr ähnlich: die Aminosäuresequenzen unterscheiden sich in 51 von 129 Aminosäuren mit einer zusätzlichen Aminosäure zwischen Position 47 und 48 im Humanlysozym (Mine et al., 2000). Die 3-D-Strukturformel von Humanlysozym ist in Abbildung 2-13 und die genauen Aminosäuresequenzen von HEW- und Humanlysozym sind vergleichend in Tabelle 2-3 dargestellt.

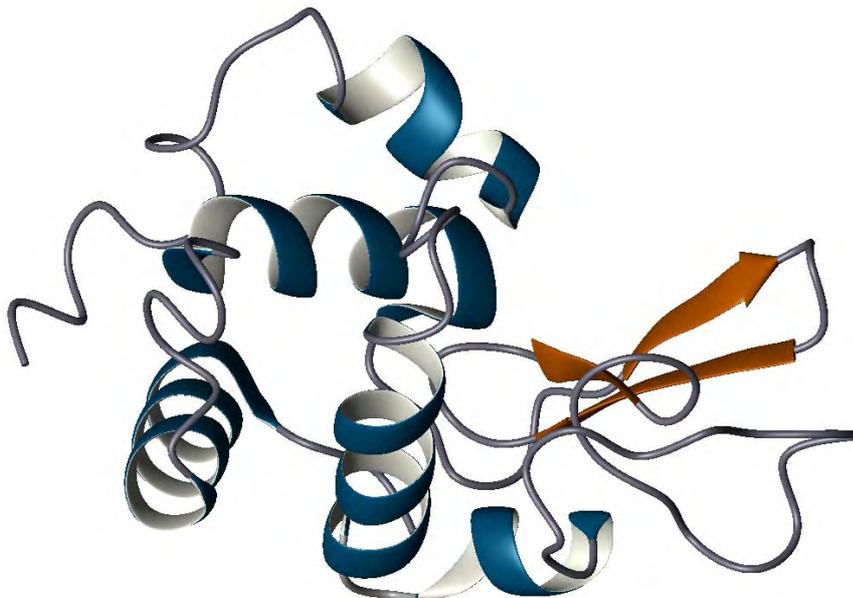


Abbildung 2-13 3-D-Strukturmodell von Humanlysozym

Tabelle 2-3: Vergleich der Aminosäuresequenzen von Humanlysozym (Hum.-Lys.) und Lysozym aus Hühnereiweiß (HEW-Lys.) (nach Mine et al., 2000)

				5					10					15				20		
Hum.-Lys.	K	V	F	E	R	C	E	L	A	R	T	L	K	R	L	G	M	D	G	Y
HEW-Lys.	-	-	-	G	-	-	-	-	-	A	A	M	-	-	H	-	I	-	N	-
				25					30					35				40		
Hum.-Lys.	R	G	I	S	L	A	N	W	M	C	L	A	K	W	E	S	G	Y	N	T
HEW-Lys.	-	-	V	-	-	G	-	-	V	-	A	-	-	F	-	-	N	F	-	-
				45					50					55				60		
Hum.-Lys.	R	A	T	N	Y	N	A	G	D	R	S	T	D	Y	G	I	F	Q	I	N
HEW-Lys.	Q	-	-	-	R	-	T	*	-	G	-	-	-	-	-	-	L	-	-	-
				65					70					75				80		
Hum.-Lys.	S	R	Y	W	C	N	D	G	K	T	P	G	A	V	N	A	C	H	L	S
HEW-Lys.	-	-	W	-	-	-	-	-	R	-	-	-	S	R	-	L	-	N	I	P
				85					90					95				100		
Hum.-Lys.	C	S	A	L	L	Q	D	N	I	A	D	A	V	A	C	A	K	R	V	Y
HEW-Lys.	-	-	-	-	-	S	S	D	-	T	A	S	-	N	-	-	-	K	I	V
				105					110					115				120		
Hum.-Lys.	R	D	P	Q	G	I	R	A	W	V	A	W	R	N	R	C	Q	N	R	D
HEW-Lys.	S	-	G	N	-	M	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-	K	G	T	-
				125					130											
Hum.-Lys.	V	R	Q	Y	V	Q	G	C	G	V										
HEW-Lys.	-	Q	A	W	I	R	-	-	R	L										

In dieser Arbeit wurde sowohl unverändertes Lysozym aus Hühnereiweiß als auch fluoreszenzmarkiertes Lysozym (ebenfalls aus Hühnereiweiß) verwendet. Diese fluoreszenzmarkierte Variante ermöglicht die Quantifizierung von Lysozym mit Hilfe fluorimetrischer Messungen. Lysozym und der Fluoreszenz-Farbstoff Chromeo 494 bilden ein Konjugat, das aus der Verbindung der Carboxylgruppe des Farbstoffs mit einer Aminogruppe des Proteins hervorgeht. Die Summenformel des Farbstoffs lautet  $C_{26}H_{32}N_2O_4$  und die molare Masse beträgt 437 g/mol und ist damit gegenüber dem Proteingewicht vernachlässigbar. Chromeo 494 kann durch einen grünen Laser mit einer Wellenlänge von 494 nm angeregt werden und emittiert daraufhin Licht mit einer Wellenlänge von 630 nm. In Abbildung 2-14 ist sowohl das Exzitations- als auch das Emissionsspektrum des Farbstoffs Chromeo 494 angegeben.

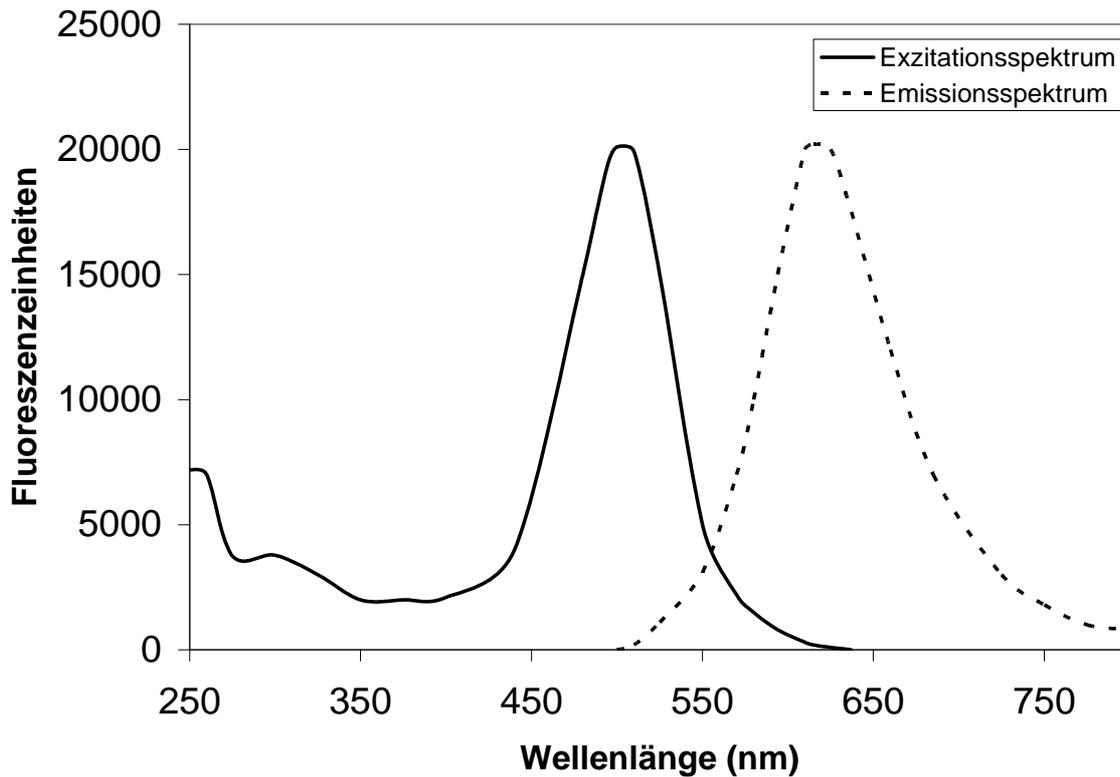


Abbildung 2-14: *Exzitations- (links) und Emissionsspektrum (rechts) des Farbstoffs Chromeo 494*

### 2.3.3 FITC-Dextran 70

Für den Einschluss in Mikropartikel und die Untersuchung der Freisetzungskinetik wurde außer Lysozym auch FITC-Dextran 70 eingesetzt. Die Abkürzung FITC steht für Fluorescein Isothiocyanat (fluoreszierender Farbstoff). Die molare Masse von FITC-Dextran 70 beträgt ca. 70 000 Da und ist damit ca. 5-mal schwerer als Lysozym. Durch die unterschiedliche Stoffklassenzugehörigkeit lässt sich jedoch keine endgültige Aussage über den Größenunterschied bezogen auf die Raumstruktur machen. In Abbildung 2-15 ist ein Ausschnitt aus der Strukturformel von FITC-Dextran dargestellt.

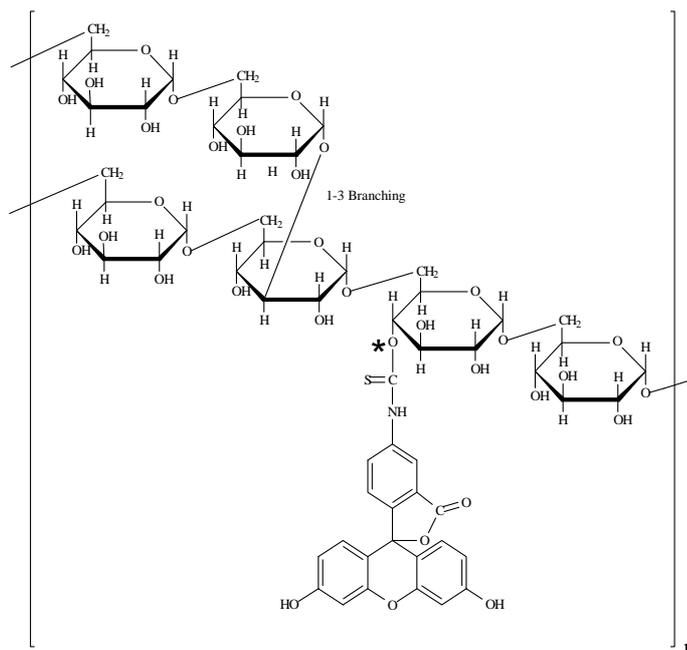


Abbildung 2-15: Ausschnitt aus der Strukturformel von FITC-Dextran

Dextran ist ein hochmolekulares, verzweigtes, nichtionogenes Polysaccharid aus Glucosemonomeren. In dem verwendeten fluoreszenzmarkierten Dextran-Derivat sind pro Mol Glucose zwischen 0,003 und 0,020 mol FITC mit den Hydroxylgruppen des Dextrans verbunden. Das Exzitations-Maximum liegt bei 490 nm und das Emissions-Maximum liegt bei 520 nm. Die Fluoreszenz-Intensität nimmt mit steigendem pH-Wert zu und erreicht ab einem pH-Wert von ca. 8 ein Maximum, was sich positiv auf die Vermessung pH-neutraler Proben auswirkt (Produktinformation der Fa. Sigma-Aldrich, 2009).

Durch die nichtproteinogene Struktur und dem damit verbundenen anderen Eigenschaften von FITC-Dextran im Vergleich zu Lysozym ist eine Verknüpfung der erhaltenen Ergebnisse aus den Freisetzungsversuchen nur zum Teil möglich. Beispielsweise weist FITC-Dextran im Gegensatz zu Lysozym keine ionogenen Gruppen und keine Grenzflächenaktivität auf, was sich sowohl bei der Einschussrate als auch bei den Freisetzungsergebnissen bemerkbar machen kann.

## 2.4 Stabilisatoren für den Gefriertrocknungsprozess

Ein wichtiger Aspekt, den es bei der Lagerung von Proteinen zu beachten gilt, ist der Schutz vor hydrolytischer Spaltung dieser komplexen Moleküle, da eine Hydrolyse in nahezu allen Fällen mit einem Wirksamkeitsverlust einhergeht. Aus diesem Grund werden Proteine in der Regel als

gefriergetrocknete Produkte gelagert und auch in dieser Form in den Handel gebracht. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich aus diesem Grund u. a. mit der Verteilung von Stabilisatoren für die Gefriertrocknung im Zweiphasensystem aus HES und PEG. Weiterhin enthalten die hergestellten Mikropartikel als Stabilisator Saccharose in verschiedenen Konzentrationen. Aus diesem Grund soll hier kurz auf die Wirkmechanismen von Stabilisatoren bei der Gefriertrocknung eingegangen werden.

Die Gefriertrocknung (Lyophilisation) ist ein komplexer Prozess, bei dem es einige Dinge zu beachten gibt, deren Relevanz mit dem Einfrier- und Auftauvorgang erklärt werden können: Beim Einfrieren einer gepufferten Proteinlösung kommt es anfangs zum Einfrieren des reinen Wassers, wodurch es zu einer Gefrierpunktkonzentration und damit einer Gefrierpunktserniedrigung kommt, da sich nach und nach die Salz- und Proteinkonzentration in der flüssigen Phase erhöhen. Durch die unterschiedlichen Sättigungslöslichkeiten der Puffersalze kann es zu einer pH-Wert-Änderung kommen, wodurch die Gefahr der Proteindenaturierung erhöht wird und es zur Proteinaggregation bis hin zur Präzipitation kommen kann. Beim Auflösen des Lyophilisats kehrt sich dieser Ablauf um: je nach Löslichkeit gehen bestimmte Salze zuerst in Lösung, wodurch sich der pH-Wert erneut ungünstig auf die Proteinstruktur auswirken kann. Diesem Phänomen kann man beispielsweise durch Schockgefrieren und Schockauftauen entgegen treten. Durch das schockartige Einfrieren und der damit zusammenhängenden zeitlichen Verhinderung der Ausbildung von Kristallen wird zudem ein amorphes Gerüst ausgebildet, das sich sehr leicht rekonstituieren lässt.

Weiterhin gibt es Substanzen, die einen Schutz bei der Gefriertrocknung bieten. Diese lassen sich in die Gruppe der Kryoprotektoren (Schutz beim Einfrieren) und die Gruppe der Lyoprotektoren (Schutz beim Trocknungsprozess) einteilen, wobei es Substanzen gibt, die sowohl Lyoprotektoren als auch Kryoprotektoren sein können. Oftmals ist eine eindeutige Zuordnung der Funktion im Endprodukt nicht möglich, da die Übergänge zwischen diesen beiden Funktionen fließend sind.

### **2.4.1 Kryoprotektoren**

Kryoprotektoren sind Stoffe, die Proteine beim Einfriervorgang durch eine präferentielle Hydratation („preferential exclusion“) stabilisieren. Der Schutzmechanismus kann mit Hilfe von Abbildung 2-16 erklärt werden.

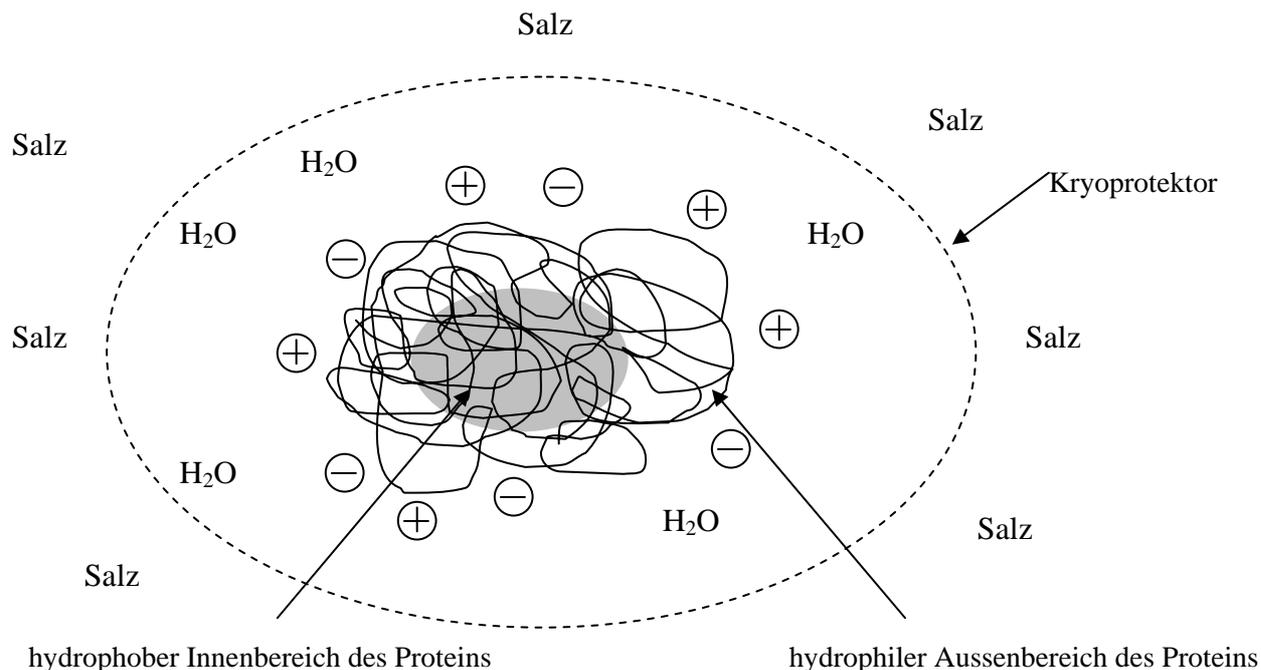


Abbildung 2-16: Schematische Darstellung des Schutzmechanismus von Kryoprotektoren

Befindet sich ein geknäultes Protein in einer Lösung aus Wasser, Salzen und Proteinen, umgibt sich das Protein mit einer Hydrathülle, indem der Kryoprotektor die Wassermoleküle dichter an das Protein herandrängt. In der Lösung enthaltene Salze reichern sich daraufhin in der Bulkphase an. Durch die räumliche Verdrängung der Salze in die Bulkphase ist das Protein von dem pH-Shift beim Einfriervorgang nicht unmittelbar betroffen und es kommt somit nicht zum Wirkungsverlust des Proteins (Mohammed et al., 2007; Carpenter & Crowe, 1988).

Substanzen, die für die Verwendung als Kryoprotektoren geeignet sind, sollten wasserlöslich und hydrophil sein und eine Vielzahl von Hydroxylgruppen aufweisen. Die dafür gebräuchlichsten Stoffe sind Aminosäuren (Glycin), Zucker (Trehalose, Saccharose), Polyole (Mannitol, Sorbitol) (Bakaltcheva et al., 2007), Polymere (PVP, PEG), anorganische Salze ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) und organische Salze (Natriumacetat, Natriumlactat). Weiterhin sind hochmolekulare Stoffe wie HES, PEG, Dextran u. a. ebenfalls kryoprotektiv (Bakaltcheva et al., 2000).

## 2.4.2 Lyoprotektoren

Lyoprotektoren sind Substanzen, die der Stabilisierung von Proteinen beim Trocknungsprozess dienen („water replacement“) und dem Lyophilisat seine Stabilität verleihen. Die Funktionsweise der Lyoprotektoren ist in Abbildung 2-17 näher dargestellt und wird im Weiteren genauer erklärt.

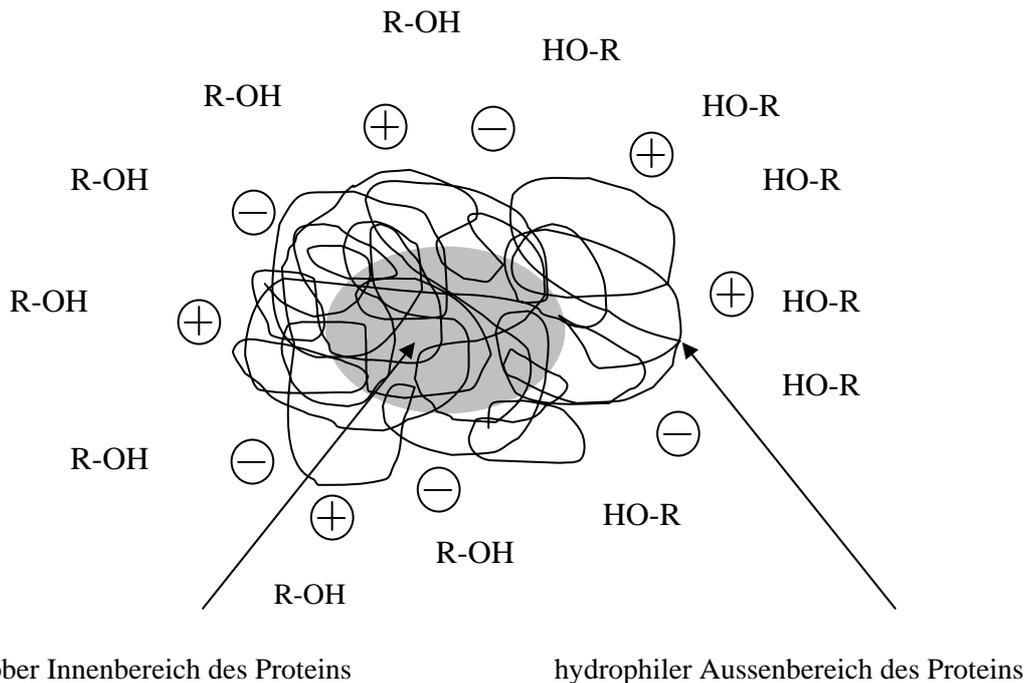


Abbildung 2-17: Schematische Darstellung des Schutzmechanismus von Lyoprotektoren (R-OH)

Beim Trocknungsprozess wird dem Protein Wasser entzogen, wobei der Anteil des Wassers, der fest an das Protein gebunden ist, durch die Primärtrocknung nicht entzogen werden kann. Dadurch sinkt die Glasübergangstemperatur des Proteins, was sich negativ auf dessen Stabilität auswirken kann, da das Protein oberhalb der Glasübergangstemperatur sehr beweglich ist. Saccharose besitzt beispielsweise eine Glasübergangstemperatur von 57 °C (Feststoff) bzw. -32 °C (Lösung). Das bedeutet, dass sich Saccharose in Lösung durch seine hohe Beweglichkeit bei Raumtemperatur gut um das Protein herumlagern kann. Wird dem System Wasser entzogen, bewirken Lyoprotektoren eine Erhöhung der Glasübergangstemperatur des Proteins, indem sie Wasserstoffbrücken zum Protein ausbilden und so die Hydrathülle des Proteins ersetzen. Da die Glasübergangstemperatur des höher konzentrierten Stoffes die Glasübergangstemperatur des Gesamtsystems bestimmt, wird diese somit beim Wasserentzug erhöht. Durch den sterischen Schutz des Proteins durch den Lyoprotektor und die Erhöhung der Glasübergangstemperatur wird die Beweglichkeit des Proteins reduziert, es „erstarrt“ in seiner nativen Struktur in einem amorphen, glasartigen Gerüst (Hinrichs et al., 2001; Bakaltcheva et al., 2000).

Als Lyoprotektoren werden wegen ihrer ringförmigen Struktur vor allem Disaccharide eingesetzt. Polyole wie Mannitol und Sorbitol sind aufgrund ihrer linearen Struktur als Lyoprotektoren nicht geeignet.

## 2.5 Auswertungsmethoden für Freisetzungsversuche

Zur besseren Vergleichbarkeit der Ergebnisse aus den Freisetzungsversuchen von Lysozym und FITC-Dextran 70 aus den hergestellten Mikropartikeln wurden diese mit Hilfe des Quadratwurzelgesetzes nach Higuchi und des Power Laws dargestellt und ausgewertet. Durch das Quadratwurzelgesetzes nach Higuchi ist der Vergleich der Freisetzungsgeschwindigkeiten der verschiedenen Mikropartikelchargen und mit Hilfe des Power Law ist eine mechanistische Interpretation der Ergebnisse möglich.

### 2.5.1 Quadratwurzelgesetz nach Higuchi

Das Quadratwurzelgesetz nach Higuchi (Wurzel-t-Gesetz) beschreibt die Freisetzung von Stoffen als Fick'schen Diffusionsvorgang aus unlöslichen, porenhaltigen Matrices (Higuchi, 1961 und 1963; Chen et al., 2005 und 2006) und wurde 1961 von Higuchi für die Wirkstofffreisetzung aus Salbengrundlagen aufgestellt (Higuchi, 1961). Gleichung 2-4 zeigt das Quadratwurzelgesetz nach Higuchi mit den zugehörigen Parametern.

$$\frac{M_t}{M_\infty} = \sqrt{D \cdot C_s \cdot \frac{\varepsilon}{\tau} \cdot (2C_D - \varepsilon \cdot C_s) \cdot t} = k_H \cdot \sqrt{t} \quad \text{Gleichung 2-4}$$

$M_t$  freigesetzte Wirkstoffmenge zum Zeitpunkt  $t$

$M_\infty$  freigesetzte Wirkstoffmenge zum Zeitpunkt  $t = \infty$

$D$  Diffusionskoeffizient des Arzneistoffs im Medium

$C_s$  Sättigungslöslichkeit des Arzneistoffs in der Matrix

$\varepsilon$  Porosität

$\tau$  Krümmung der Poren

$C_D$  Gehalt an Arzneistoff in der Matrix

$t$  Zeit

$k_H$  rezepturabhängige Proportionalitätskonstante

Voraussetzung für die Anwendbarkeit des Gesetzes ist, dass die vorliegende Konzentration im System (hier: Beladung der Mikropartikel) deutlich größer als die Sättigungskonzentration im

Medium ist und der Wirkstoff dispergiert vorliegt. Ist der in den Mikropartikeln verbleibende Anteil so klein, dass dieser die Sättigungslöslichkeit unterschreitet, liegt der Wirkstoff gelöst vor und die Gesetzmäßigkeiten für Dispersionen finden keine Anwendung mehr. Aus diesem Grund verliert das Quadratwurzelgesetz nach Higuchi ab einem freigesetzten Wirkstoffanteil von 60 % definitionsgemäß seine Gültigkeit.

Mit Hilfe von Abbildung 2-18 soll der Fick'sche Diffusionsvorgang erläutert werden. Das Wirkstoffreservoir innerhalb des Mikropartikels wird im Laufe der Zeit von der Oberfläche zum Inneren der Matrix abgebaut, da der Wirkstoff durch Diffusion aus dem Mikropartikel heraus transportiert wird. Damit nimmt die Distanz  $h$  zwischen der Oberfläche der Matrix und der Wirkstofffront im Inneren der Matrix zu. Direkt an der Wirkstofffront wird die Sättigungskonzentration aufrechterhalten, d. h. die Konzentrationsdifferenz zwischen der Wirkstofffront und der Partikeloberfläche (und damit dem Medium) bleibt konstant. Dabei stellt der Konzentrationsunterschied die treibende Kraft dar und es gilt das Fick'sche Gesetz. Aus dieser immer größer werdenden Distanz  $h$  und dem gleich bleibenden Konzentrationsunterschied  $\Delta C$  ergibt sich mit der Zeit ein sinkender Konzentrationsgradient  $\Delta C/h$ . Damit kann erklärt werden, warum die Freisetzungsgeschwindigkeit nach einer bestimmten Zeit abnehmen muss. Die Gültigkeit des Gesetzes ist eingeschränkt, da ein konstanter Diffusionskoeffizient  $D$  zugrunde gelegt wird.  $D$  könnte sich jedoch infolge Quellung der Mikropartikel während der Freisetzung ändern. Weiterhin wird eine evtl. stattfindende Erosion des Mikropartikels nicht berücksichtigt.

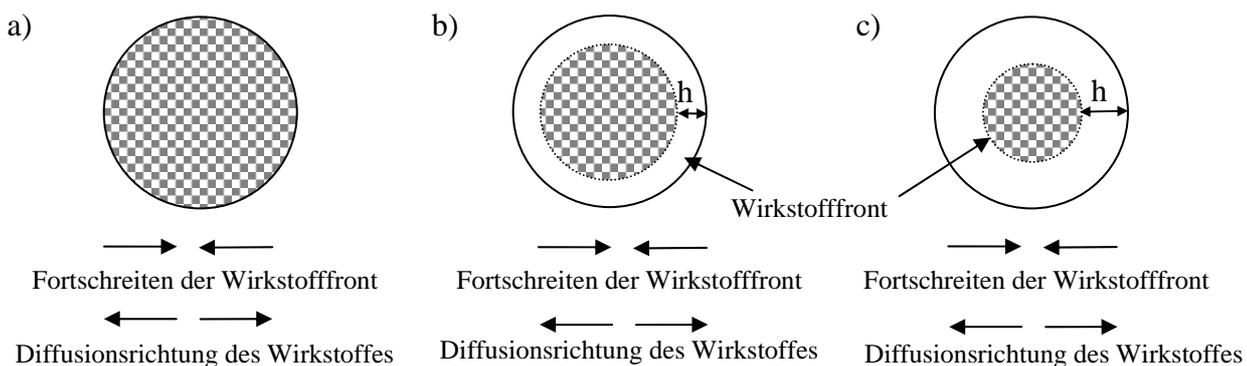


Abbildung 2-18: Schematische Darstellung des Fick'schen Diffusionsvorganges am Beispiel eines Mikropartikels

Da die Wurzel-t-Gleichung nur für die Freisetzung von eingelagertem Wirkstoff Gültigkeit besitzt und nicht für den Teil des Proteins, der auf der Oberfläche aufgelagert ist und zur Initialfreisetzung

führt (Franssen et al., 1999; Zhang & Chu, 2002), wird die Initialfreisetzung bei der graphischen Darstellung nach Higuchi und für den Geschwindigkeitsvergleich nicht mit einbezogen.

## 2.5.2 Power Law

Bei Auswertung der Ergebnisse nach dem Power Law (Peppas, 1985; Ritger & Peppas, 1987; Lee, 1985; Rinaki et al., 2003) wird der freigesetzte Wirkstoffanteil in logarithmierter Form gegen den Logarithmus der Zeit dargestellt. In Gleichung 2-5 ist das Power Law nach Peppas (1985) mit den zugehörigen Parametern dargestellt.

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k * t^n \quad \rightarrow \quad \lg \left( \frac{M_t}{M_\infty} \right) = \lg k + n * \lg t \quad \text{Gleichung 2-5}$$

$M_t$  freigesetzte Wirkstoffmenge zum Zeitpunkt  $t$

$M_\infty$  freigesetzte Wirkstoffmenge zum Zeitpunkt  $t = \infty$

$t$  Zeit

$k$  rezepturabhängige Proportionalitätskonstante

$n$  Steigung = Power Law-Exponent

Durch dieses Gesetz ist es möglich, über die Steigung der Geraden, die dem Freisetzungsverhalten des Wirkstoffs entspricht, den Freisetzungsmechanismus des Wirkstoffs aus den Mikropartikeln zu erklären und besser miteinander vergleichen zu können. Mit Hilfe von Abbildung 2-19 soll der theoretische Hintergrund des Power Law erläutert werden.

Penetriert Wasser oder eine wässrige Flüssigkeit in eine trockene wirkstoffhaltige Hydrogelmatrix (a), quillt die Matrix und der Wirkstoff diffundiert durch die hydratisierte Quellungsschicht ins umgebende Medium. Dabei trennt die eindringende Flüssigkeit die gummiartige, gequollene Schicht von der glasartigen Schicht und es entsteht eine scharfe Trennschicht zwischen diesen beiden Zustandsformen der Hydrogelmatrix (b). Die Trennschicht schreitet nach innen immer weiter fort. Zur gleichen Zeit vergrößert sich der Partikel durch den Quellungsvorgang; die Grenzsicht des Partikels zum umgebenden Medium wandert dabei nach außen (c). Das heißt, dass sich die beiden Grenzsichten in gegensätzlicher Richtung voneinander weg bewegen, abhängig vom Ausmaß der Diffusions- bzw. der Relaxationsgeschwindigkeit der Polymerketten. Dabei überwiegt entweder die Polymer-Relaxation (Quellung) bzw. die Erosion oder die Diffusionsrate des gelösten Wirkstoffes (Peppas et al., 2000).

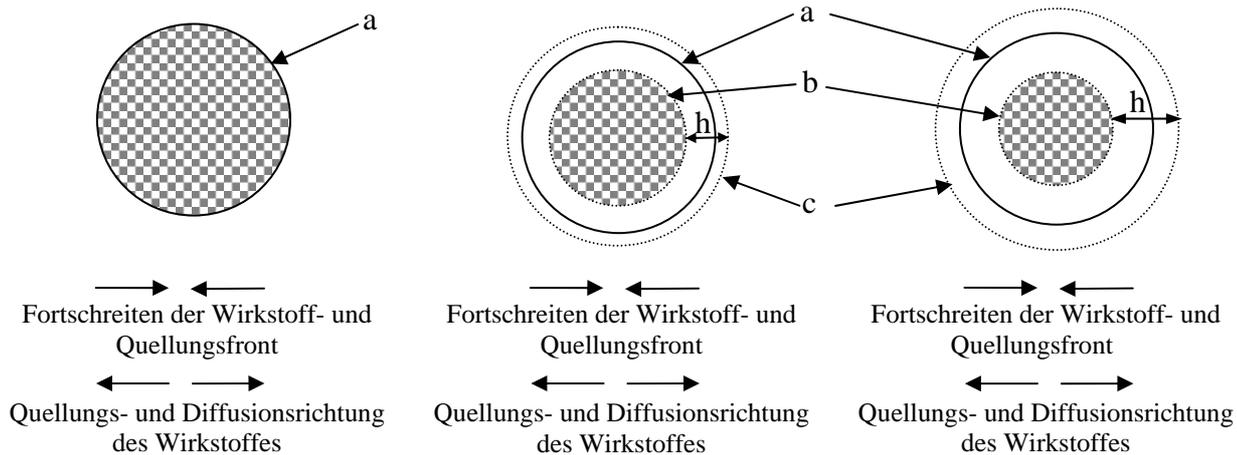


Abbildung 2-19: Schematische Darstellung der Wirkstofffreisetzung aus quellbaren Mikropartikeln

So kommt es entweder zum Case-I-Transport (Fick'sche Diffusion) oder zum Case-II-Transport (Quellung bzw. Erosion (van Dijk-Wolthuis et al., 1997)). Welcher der Prozesse vorliegt, ergibt sich aus der Auswertung des Exponenten  $n$  des Power Law: es können dabei Exponenten von  $n = 0,5$ ;  $0,5 < n < 1$  oder  $n = 1$  erhalten werden.

Für einen Power Law-Exponenten  $n < 0,5$  sind in der Literatur keine Daten zu finden. Dies kann ein Hinweis auf ein komplexes Freisetzungsverhalten sein, z. B. eine behinderte Fick'sche Diffusion. Für  $n = 0,5$  gilt, dass der Prozess rein diffusionsgesteuert ist (Fick'sche Diffusion) und Quellung und Erosion der Matrix vernachlässigt werden können.  $0,5 < n < 1$  bedeutet, dass sowohl Quellung und Erosion als auch die Fick'sche Diffusion an der Freisetzung beteiligt sind und für  $n = 1$  ergibt sich, dass die Freisetzung quellungs- bzw. erosionskontrolliert ist und die Freisetzung des Wirkstoffs unabhängig von der Konzentration stattfindet. Es liegt im letztgenannten Fall also eine Freisetzung nach 0.-Ordnung vor, da die Reaktionsgeschwindigkeit konstant ist.

### 3 Materialien und Methoden

#### 3.1 Materialien

Es werden in der vorliegenden Arbeit die in Tabelle 3-1 aufgeführten Substanzen eingesetzt.

Tabelle 3-1: Übersicht über die verwendeten Substanzen

Substanz	Bezugsquelle	Qualität	Bestellnummer/ Chargen-Bezeichnung
$\alpha$ -Amylase from <i>Bacillus subtilis</i>	Fluka über die Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München	analytische Qualität	Ch.-B.: 1323905 Best.-Nr.: 10069
AssayMax Human Lysozyme ELISA Kit	Assaypro, St. Charles, Montana, USA, bezogen über Hölzel Biotech, Köln, Deutschland	analytische Qualität	Ch.-B.: 0788816 Best.-Nr.: EL3010-1
FITC-Dextran 70 (Fluorescein Isothiocyanat-Dextran), Mr 70 000 g/mol	Sigma Aldrich, München	analytische Qualität	Ch.-B.: 015K5311 Best.-Nr.: FD70S-250MG
F-Lysozym, 0,2 %ige Lösung (Farbstoff: Chromeo 494; Absorption: 494 nm/Emission: 628 nm)	Active Motif Chromeon GmbH, Tegernheim	-	Labeling-Ch.-B.: 1110
Glucose (D(+))	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe	analytische Qualität	Ch.-B.: 09677532 Best.-Nr.: X997.2
Glycin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe	Ph. Eur., USP, BP	Ch.-B.: 51576221 Best.-Nr.: T873.1
HES-HEMA (DS 0,01488)	TU Braunschweig*	-	interne Ch.-B.: STH197A
HES-HEMA (DS 0,07878)	TU Braunschweig*	-	interne Ch.-B.: STH197B
Humanserum (converted)	PAA Laboratories GmbH, Pasching Österreich	diagnostic grade	Ch.-B.: C00105-0473 Best.-Nr.: C15-051
Hydroxyethylstärke (HES) 130/0,4 (Mr = 130 000 g/mol)	Fresenius Kabi GmbH Bad Homburg	-	Ch.-B.: 130-02-01-P
Hydroxyethylstärke (HES) 200/0,5 (Mr = 200 000 g/mol)	Fresenius Kabi GmbH Bad Homburg	-	Ch.-B.: 31222

<b>Substanz</b>	<b>Bezugsquelle</b>	<b>Qualität</b>	<b>Bestellnummer/ Chargen-Bezeichnung</b>
Igacure 2959	Ciba, Lampertheim	analytische Qualität	Ch.-B.: 0037373S Best.-Nr.: 4031085
Lysozym (from chicken egg white)	Fluka über die Sigma- Aldrich Chemie GmbH, München	analytische Qualität	Ch.-B.: 1292029 Best.-Nr.: 62970
Lysozym (recombinant from human milk, expressed in rice)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München	analytische Qualität	Ch.-B.: 058K0811 Best.-Nr.: L1667-1G
Mannitol	Roquette, Lestrem Frankreich	analytische Qualität	Ref.-Nr. 685234
Natriumazid	Sigma Aldrich, München	analytische Qualität	Ch.-B.: 1172478 Best.-Nr.: 71290
Polyethylenglykol (PEG 8 000, Pluriol E 8 000) Mr = (8 000 g/mol)	BASF AG Ludwigshafen	analytische Qualität	Ch.-B.: 03652-90H0 und 59613-90H Art.-Nr.: 50844528
Polyethylenglykol 40 000 (PEG 40 000 (Mr = 40 000 g/mol)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg	analytische Qualität	Ch.-B.: 17976 Best.-Nr.: 33139
Saccharose (D(+))	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe	Ph. Eur.	Ch.-B.: 31787440 Best.-Nr.: 4661.1
Trehalose (D(+))-Dihydrat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe	99 %, für die Bio- chemie	Ch.-B.: 19679068 Best.-Nr.: 5151.2
U- <sup>14</sup> C- $\alpha$ -D Trehalose (3,7 MBq/ml)	American Radiolabeled Chemicals Inc., St. Louis, Missouri, USA über Biotrend, Köln	analytische Qualität	Ch.-B.: 060721 Best.-Nr.: ARC 1249
U- <sup>14</sup> C-Glycin (1,85 MBq/ml)	Amersham Biosciences München	analytische Qualität	Ch.-B.: 101 Best.-Nr.: CFB66
U- <sup>14</sup> C-Saccharose (7,4 MBq/ml)	Amersham Biosciences, München	analytische Qualität	Ch.-B.: 90 Best.-Nr.: CFB146
Ultima Gold Szintillations-Cocktail	PerkinElmer, Waltham, USA	-	Ch.-B.: 77-070102 und 77-070201 Best.-Nr.: 6013327

---

\* = Das HEMA-Derivat der Hydroxyethylstärke (HES-HEMA) wird in Anlehnung an Van Dijk-Wolthuis et al. (1997) und Heim et al. (2007) vom Institut für Technische Chemie, Abt. TC Makromolekularer Stoffe der TU Braunschweig, synthetisiert und charakterisiert. Der Substitutionsgrad entspricht dem Anteil der substituierten Anhydroglucoseeinheiten an der Gesamtanhydroglucose-Anzahl \* 100. Das bedeutet, dass im Mittel pro 100 Anhydroglucoseeinheiten 1,488 bzw. 7,878 substituierte Anhydroglucoseeinheiten vorliegen. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit werden die Substitutionsgrade der HES-HEMA-Derivate mit „DS 1,5“ und „DS 7,8“ abgekürzt.

Alle weiteren verwendeten Substanzen werden in analytischer Qualität bezogen und verwendet.

Das verwendete Wasser wird mit Umkehrosmose hergestellt (HEMO-RO von Fa. Millipore, Schwalbach oder Purelab Option Q von Fa. ELGA LabWater, Celle) und entspricht in seiner Qualität mindestens *Aqua purificata* nach Ph. Eur. Für spezielle Zwecke wird das Wasser autoklaviert (Labstar 3-4-7, Zirbus technology, Bad Grund, Deutschland; Programm 5: 121 °C, 2,1 bar, 15 min).

### **3.2 Herstellung des Zweiphasensystems**

In Abbildung 3-1 ist die Herstellung eines Zweiphasensystems schematisch dargestellt. Es werden Stammlösungen von Hydroxyethylstärke, Polyethylenglykol und den zu untersuchenden Substanzen hergestellt (die Konzentrationsangaben sind bei den einzelnen Versuchen aufgeführt). Die beiden Polymerstammlösungen werden zusammengegeben (Mengenverhältnisse sind bei den einzelnen Versuchen aufgeführt) und anschließend durch Vortexen (Vibrofix VF 1, IKA-Werke Deutschland) homogenisiert. Nach dem ersten Vortexen werden ggf. weitere Substanzen zugefügt und anschließend wird erneut gevortext. Nach der Phasenseparation, welche durch Zentrifugieren bei 5000 rpm für 5 min beschleunigt wird, werden die beiden Phasen getrennt und analysiert.

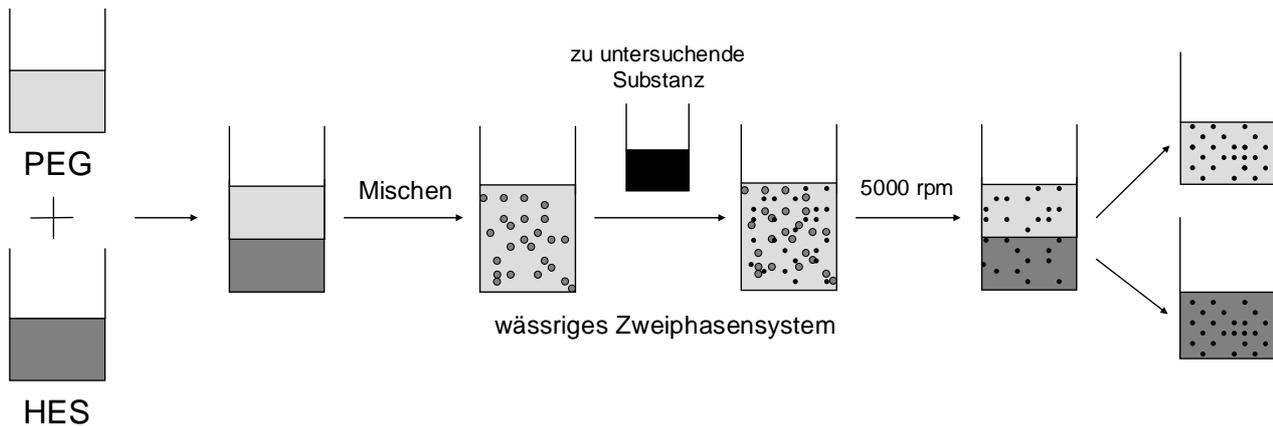


Abbildung 3-1: Herstellungsschema eines wässrigen Zweiphasensystems aus HES und PEG

### 3.3 Untersuchung physikochemischer Einflussfaktoren auf das ATPS aus HES und PEG

#### 3.3.1 Temperatureinfluss

Um den Einfluss der Temperatur auf die Lage der Binodalkuven von Zweiphasensystemen zu ermitteln, werden folgende Temperaturen untersucht: 10 °C, 23 °C (Raumtemperatur), 30 °C und 40 °C. Dazu werden eine 30 %ige (m/m) HES 130/0,4-Lösung und eine 20 %ige PEG 8 000-Lösung als Stammlösungen hergestellt. Die HES-Lösung wird mit definierten Mengen Wasser verdünnt, anschließend temperiert und so eine Konzentrationsreihe erstellt. Zu jeder der HES-Lösungen der Konzentrationsreihe wird nach der Temperierung tropfenweise ebenfalls temperierte PEG-Lösung zugegeben bis eine Trübung zu erkennen ist. Nach jedem Tropfen wird ca. 5 s gevortext. Die Temperierung der Stammlösungen erfolgt mit einem Thermostaten (Colora NB, Deutschland). In gleicher Weise wird der Temperatureinfluss auf ein Zweiphasensystem aus HES 200/0,5 und PEG 8 000 untersucht.

#### 3.3.2 pH-Wert-Einfluss auf das Phasen-Volumen-Verhältnis

Um den Einfluss des pH-Wertes auf das Phasen-Volumen-Verhältnis von Zweiphasensystemen zu untersuchen, werden pH-Reihen des Zweiphasensystems im Bereich pH 1 bis 6 untersucht. Dazu werden eine 4 %ige HES- und eine 30 %ige PEG-Lösung hergestellt und im Verhältnis 43 T + 57 T (m/m) gemischt. Anschließend wird der pH-Wert des ATPS mit 1 N HCl auf den gewünschten pH-Wert eingestellt. Da zur pH-Einstellung auf pH 1 die größte Menge HCl benötigt wird, wird bei

allen anderen Versuchen mit höherem Ziel-pH-Wert die Differenz mit Wasser aufgefüllt, um immer das gleiche Verhältnis HES/PEG/Wasser zu erhalten. 30,0 g der entsprechend eingestellten Zweiphasensysteme werden in 100 ml Erdölgläschen gefüllt und bis zur vollständigen Phasenseparation erschütterungsfrei gelagert. Parallel dazu wird die Dichte des eingestellten ATPS mit dem Dichtemessgerät DMA 4500 (Anton Paar Germany GmbH, Ostfildern, Deutschland) gemessen, um das Volumen der im Erdölgläschen befindlichen Zweiphasenmischung zu errechnen. Nach ca. 5 bis 7 Tagen wird das Volumen der HES-Phase abgelesen und der prozentuale Anteil im Bezug zum Gesamtvolumen berechnet.

### 3.3.3 Einfluss von Kryoprotektoren auf das wässrige Zweiphasensystem

In diesem Versuch soll der Einfluss von Kryoprotektoren (Saccharose, Trehalose, Mannitol, Sorbitol und Glycin) auf das wässrige Zweiphasensystem untersucht werden. Dies geschieht sowohl durch die Bestimmung der Dichte als auch des Trocknungsrückstandes.

Als Stammlösungen werden eine wässrige 20 %ige (m/m) HES 130/0,4-Lösung und eine wässrige 20 %ige (m/m) PEG 8 000-Lösung verwendet, die in gleichen Massenanteilen zusammengegeben werden. Das entstandene Zweiphasensystem wird auf dem Magnetrührer fortlaufend gerührt und davon jeweils 15 g in tarierte Reagenzgläser pipettiert. Zu dieser Mischung werden, wie bei den einzelnen Versuchen beschrieben, definierte Mengen der Kryoprotektoren-Lösungen gegeben.

#### 3.3.3.1 Dichte

Für die Untersuchung der Dichteänderung der beiden Phasen mit zunehmendem Gehalt an Kryoprotektoren werden Stammlösungen mit der maximal löslichen Konzentration (Merck-Katalog, 2002) hergestellt und anschließend so verdünnt, dass die in Tabelle 3-2 beschriebenen Lösungen mit äquidistanten Konzentrationsstufen erhalten werden.

*Tabelle 3-2: Verdünnungsreihen der untersuchten Kryoprotektoren*

	<b>Saccharose- Konz. [m/m]</b>	<b>Mannitol- Konz. [m/m]</b>	<b>Glucose- Konz. [m/m]</b>	<b>Trehalose- Konz. [m/m]</b>	<b>Glycin- Konz. [m/m]</b>
1	6,47	2,05	4,40	1,94	2,08
2	12,82	4,10	8,87	3,85	4,01
3	19,26	6,07	13,49	5,78	5,98

	<b>Saccharose- Konz. [m/m]</b>	<b>Mannitol- Konz. [m/m]</b>	<b>Glucose- Konz. [m/m]</b>	<b>Trehalose- Konz. [m/m]</b>	<b>Glycin- Konz. [m/m]</b>
4	25,60	8,02	17,76	7,75	7,99
5	32,10	9,98	22,11	9,61	9,97
6	38,25	11,99	26,49	11,59	11,99
7	44,86	14,06	30,94	13,57	14,02
8	51,36	15,99	35,66	15,42	16,02
9	57,67	17,97	40,12	17,28	17,95
Stammlösung	64,00	20,06	44,46	19,31	20,00

Von diesen Lösungen werden jeweils 1,6 g zu 15 g der homogenisierten Zweiphasenmischung gegeben (Referenz enthält stattdessen 1,6 g Wasser) und intensiv gevortext. Nach der Phasenseparation (ca. 5 Tage) werden die Phasen getrennt und die Dichte mittels Dichtemessgerät (DMA 4500, Anton Paar Germany GmbH) bestimmt, indem die Proben in das Messgerät injiziert und anschließend nach der Biegeschwingermethode bei Raumtemperatur (23,00 °C) vermessen werden.

### 3.3.3.2 Trocknungsverlust/Trocknungsrückstand

Die Präparation der Proben erfolgt wie bereits in Kap. 3.3.3.1 beschrieben. Nach der Phasenseparation werden die Phasen getrennt, in 2 ml-PP-Mikrozentrifugenröhrchen mit Deckel überführt und genau gewogen. Die Mikrozentrifugenröhrchen werden geöffnet bei 80 °C im Trockenschrank getrocknet. Nach Saccharose- und Glucosezusatz wird die HES-Phase 48 h, nach Mannitol-, Trehalose- und Glycinzusatz 120 h bis zum Erreichen der Massenkonstanz getrocknet. Die PEG-Phase wird 48 h getrocknet, da kurzkettige Polyethylenglykole flüchtig sind. Anschließend werden die Gefäße nach der Entnahme aus dem Trockenschrank sofort fest verschlossen und nach Abkühlung auf Raumtemperatur erneut gewogen. Der Trocknungsverlust (TV) bzw. Trocknungsrückstand (TR) ergibt sich aus Gleichung 3-1 bzw. Gleichung 3-2.

$$TV = \frac{100}{\text{Einwaage}} \cdot (\text{Einwaage} - \text{Auswaage})$$

Gleichung 3-1

$$TR = \frac{100}{\text{Einwaage}} \cdot (\text{Auswaage})$$

Gleichung 3-2

### 3.3.3.3 Bestimmung der Verteilungskoeffizienten von Kryoprotektoren

Ziel der Untersuchung ist, eine Aussage über das Verteilungsverhalten von Kryoprotektoren im wässrigen Zweiphasensystem und damit zu deren Affinität zu einer der beiden Phasen machen zu können. Diese Untersuchung erfolgt mit Hilfe der radioaktiv markierten Kryoprotektoren Saccharose, Trehalose und Glycin.

Um den Einfluss größerer Mengen Kryoprotektor zu untersuchen, werden die radioaktiv markierten Stammlösungen von Trehalose, Saccharose und Glycin mit nicht radioaktiv markierten Lösungen derselben verschnitten. Dazu werden 10,00 g der unter Punkt 3.3.3.1 genannten 20 %igen (m/m) Stammlösungen von Glycin und Trehalose und der 64 %igen (m/m) Saccharoselösung mit so viel  $^{14}\text{C}$  markierter Lösung versetzt, dass eine Gesamtaktivität der Lösungen von 370 kBq resultiert (siehe Tabelle 3-3).

Tabelle 3-3: Aktivität der (verschnittenen) Kryoprotektorlösungen

	Aktivität der Ausgangs- lösung	Zusatz zu 10,00 g Stammlösung	Aktivität der erhaltenen Lösung
Saccharose	7,4 MBq/ml	50 $\mu\text{l}$	370 kBq
Trehalose	3,7 MBq/ml	100 $\mu\text{l}$	370 kBq
Glycin	1,85 MBq/ml	200 $\mu\text{l}$	370 kBq

Je 15 g der homogenisierten Zweiphasenmischung werden mit steigenden Mengen (0,2 g bis 1,6 g in 0,2 g-Schritten) verschnittener Kryoprotektorlösung versetzt. Nach dem Vortexen werden die Lösungen zur Phasenseparation 5 Tage stehen gelassen, danach getrennt und jeweils 0,5 g in 20 ml LSC-Vials eingewogen. Nach dem Zufügen von 15 ml Szintillations-Cocktail Ultima Gold werden die Proben 1 min mit dem Liquid Scintillation Counter Tri-Carb 2500TR (Packard Instruments, Meriden, USA) vermessen.

Beispielhaft wird in Abbildung 3-2 die Kalibriergerade mit zugehörigem Vertrauensbereich und in Tabelle 3-4 die Kalibrierparameter von  $\text{U-}^{14}\text{C}$ -Trehalose gezeigt. Die zugehörigen Residuenplots sind dem Anhang (ab Seite 177) zu entnehmen.

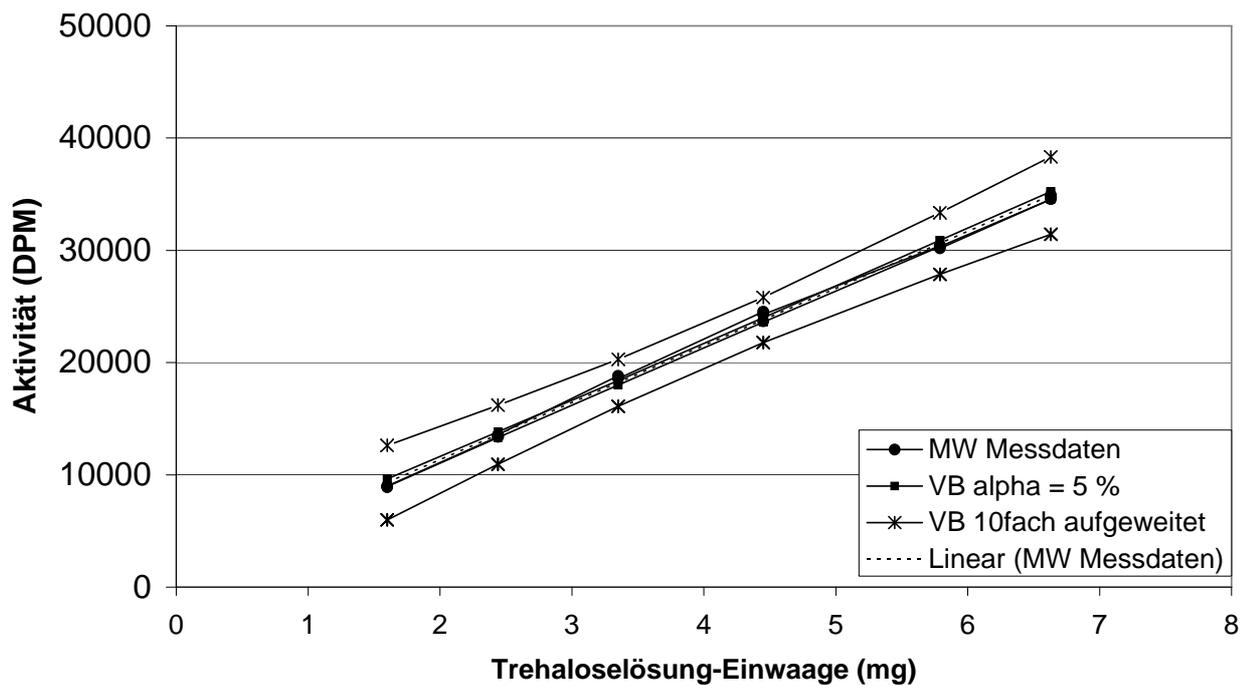


Abbildung 3-2: Kalibriergerade der Trehalosebestimmung ( $n = 3$ )

Tabelle 3-4: Kalibrierparameter der Trehalosebestimmung

Messbereich	1,6 – 6,63 mg
Anzahl Kalibrierpunkte	6
Anzahl Proben je Kalibrierpunkt	3
Freiheitsgrade (Probenanzahl – 2)	16
Kalibrierfunktion	$y = 5085,6 x - 1167,9$
Reststandardabweichung $s_y$	391,0
Verfahrensstandardabweichung $s_{x0}$	0,077
rel. Verfahrensstandardabweichung $V_{x0}$	1,90 %
Korrelationskoeffizient $r$	0,9991
Bestimmtheitsmaß $r^2$	0,9983

### 3.3.3.4 Einfluss von Lysozym auf die Verteilungskoeffizienten von Kryoprotektoren

Um den Einfluss von Lysozym auf die Verteilung von Kryoprotektoren im Zweiphasensystem zu untersuchen, werden die Verteilungskoeffizienten sowohl mit als auch ohne Lysozymzusatz bestimmt und miteinander verglichen. Wie bei Versuch 3.3.3.3 wird auch hier die Verteilung von Saccharose, Trehalose und Glycin untersucht.

#### 3.3.3.4.1 Verteilung von Kryoprotektoren im ATPS aus 10 T HES, 10 T PEG und 80 T Wasser

Es wird ein Zweiphasensystem aus gleichen Teilen einer 20 %igen (m/m) HES 130/0,4-Lösung und einer 20 %igen (m/m) PEG 8 000-Lösung hergestellt, so dass ein Gehalt von 10 % (m/m) HES und 10 % (m/m) PEG im System resultiert. Das entstandene Zweiphasensystem wird auf dem Magnetprüher fortlaufend gerührt. Das Verschneiden der Lösungen der Kryoprotektoren mit den [U-14C]-Kryoprotektoren erfolgt mit dem Ziel, eine Gesamaktivität der Lösungen von jeweils 74 kBq zu erhalten.

Dazu werden die 1 %igen Lösungen wie folgt mit den radioaktiven Lösungen versetzt:

- 3,0 g einer 1 %igen Saccharoselösung + 10 µl [U-14C]-Saccharoselösung mit 7,4 MBq/ml
- 3,0 g einer 1 %igen Trehaloselösung + 20 µl [U-14C]-Trehaloselösung mit 3,7 MBq/ml
- 3,0 g einer 1 %igen Glycinlösung + 40 µl [U-14C]-Glycinlösung mit 1,85 MBq/ml

Die Präparation der Proben erfolgt nach dem in Tabelle 3-5 angegebenen Schema.

*Tabelle 3-5: Präparationsschema von Zweiphasenmischungen zur Bestimmung des Lysozymeinflusses auf die Kryoprotektorenverteilung im ATPS aus 10 T HES, 10 T PEG und 80 T Wasser*

Homogene Zwei- phasenmischung [g]	Zugabe 1 %ige Lysozymlösung [g]	Zugabe verschnittener Lösung der Kryo- protektoren [g]	Zugabe Wasser [g]
2,42	0,08	0	0,0798
2,42	0,08	0,0133	0,0665
2,42	0,08	0,0266	0,0532
2,42	0,08	0,0399	0,0399

Homogene Zwei- phasenmischung [g]	Zugabe 1 %ige Lysozymlösung [g]	Zugabe verschnittener Lösung der Kryo- protektoren [g]	Zugabe Wasser [g]
2,42	0,08	0,0532	0,0266
2,42	0,08	0,0665	0,0133
2,42	0,08	0,0798	0

Nach der Phasenseparation werden die Phasen getrennt und jeweils 0,300 g von jeder Phase vermessen wie in Kapitel 3.3.3.3 beschrieben.

#### 3.3.3.4.2 Verteilung von Kryoprotektoren im ATPS aus 1,72 T HES, 17,2 T PEG und 81 T Wasser

Um den Konzentrationsverhältnissen bei der Herstellung von Mikropartikeln gerecht zu werden, wird der o. g. Versuch dahingehend angepasst, dass eine 4 %ige (m/m) HES 130/0,4-Lösung und eine 30 %ige (m/m) PEG 8 000-Lösung im Verhältnis 43 % (m/m) HES-Lösung und 57 % (m/m) PEG-Lösung zusammengegeben werden, so dass ein Verhältnis von PEG zu HES von 10+1 entsteht. Das entstandene Zweiphasensystem wird auf dem Magnetrührer fortlaufend gerührt. Das Verschneiden der Lösungen der Kryoprotektoren mit den [U-14C]-Kryoprotektoren erfolgt in der Weise, dass eine Gesamtaktivität der Lösungen von jeweils 444 kBq erhalten wird.

- 6,0 g einer 1 %igen Saccharoselösung + 60 µl [U-14C]-Saccharoselösung mit 7,4 MBq/ml
- 6,0 g einer 1 %igen Trehaloselösung + 120 µl [U-14C]-Trehaloselösung mit 3,7 MBq/ml
- 6,0 g einer 1 %igen Glycinlösung + 240 µl [U-14C]-Glycinlösung mit 1,85 MBq/ml

Die Präparation der Proben erfolgt nach dem in Tabelle 3-6 angegebenen Schema.

*Tabelle 3-6: Präparationsschema von Zweiphasenmischungen zur Bestimmung des Lysozymeinflusses auf die Kryoprotektorenverteilung im an die Konzentrationsverhältnisse der Mikropartikelherstellung angepassten ATPS*

<b>Homogene Zwei-phasenmischung [g]</b>	<b>Zugabe 1 %ige Lysozymlösung [g]</b>	<b>Zugabe verschnittener Lösung der Kryoprotektoren [g]</b>	<b>Zugabe Wasser [g]</b>
7,26	0,240	0	0,240
7,26	0,240	0,040	0,200
7,26	0,240	0,080	0,160
7,26	0,240	0,120	0,120
7,26	0,240	0,160	0,080
7,26	0,240	0,200	0,040
7,26	0,240	0,240	0

Nach der Phasenseparation werden die Phasen getrennt und jeweils ca. 0,150 g von jeder Phase vermessen wie in Kapitel 3.3.3.3 beschrieben.

### **3.3.4 Einfluss von Lysozym auf das wässrige Zweiphasensystem**

#### **3.3.4.1 Qualitative Bestimmung der Lysozymverteilung im wässrigen Zweiphasensystems durch Fluoreszenzmikroskopie**

0,3 g einer 0,1 %igen Lysozymlösung werden mit 13,6 µl einer 0,20 %igen Fluoreszenz-Lysozymlösung verschnitten. 0,3 g einer 4 %igen HES-Lösung werden mit der verschnittenen Lysozymlösung gemischt und 5 s gevortext. Anschließend werden 0,4 g 30 %ige PEG-Lösung hinzugefügt, der zur Erhöhung der Viskosität und damit zur langsameren Phasenseparation noch 2 % PEG 40 000 zugesetzt wurde, und nochmals 10 s gevortext. Danach wird die Mischung zur Viskositätserhöhung 10 min in ein Eisbad gestellt und anschließend mikroskopiert. Dazu wird ein Tropfen dieser Mischung auf einen Objektträger aufgebracht und mit der Fluoreszenz-Einheit des Axio Imager Z 1 (Carl Zeiss, Jena) untersucht. Die Lysozymkonzentration in diesem Versuch liegt bei ca. 0,03 % (m/m).

### **3.3.4.2 Quantitative Bestimmung der Verteilungskoeffizienten von Lysozym und Untersuchung des Saccharoseeinflusses**

Die Quantifizierung der Lysozymverteilung wird sowohl fluorimetrisch als auch durch einen lysozymspezifischen ELISA ermittelt. Die fluorimetrische Analyse ist eine spezifische Methode zur quantitativen Bestimmung von Proteinen. Ein ELISA-Test hat gegenüber der fluorimetrischen Bestimmung den Vorteil, dass nur der nativ vorliegende, aktive Proteinanteil bestimmt wird.

#### **3.3.4.2.1 Fluorimetrische Vermessung von Lysozym**

5,7 g einer wässrigen 30 %igen PEG-Lösung und 4,3 g einer wässrigen 4 %igen HES-Lösung, die jeweils 0 %, 5 %, 10 % bzw. 15 % Saccharose enthalten, werden gemischt, 30 Sekunden gevortext und zur Beschleunigung der Phasenseparation 10 min bei 5300 rpm zentrifugiert. Nach der Phasenseparation werden 8,0 g der PEG-Phase entnommen, mit 20 µl einer 0,20 %igen Fluoreszenz-Lysozymbilösung gemischt und die Konzentration der Mischung fluorimetrisch mit dem Plattenreader Synergy HT (BioTek Instruments, Bad Friedrichshall, Germany) bestimmt. Anschließend wird die mit Fluoreszenz-Lysozym verschnittene PEG-Phase genau gewogen und zum verbliebenen ATPS zurückgegeben. Diese Mischung wird intensiv gevortext und zur Beschleunigung der Phasenseparation erneut zentrifugiert (10 min bei 5300 rpm). Nach der Phasenseparation wird der Lysozymgehalt in der PEG-Phase erneut fluorimetrisch bestimmt und der Gehalt an Lysozym in der HES-Phase berechnet.

Beispielhaft werden in Abbildung 3-3 die Kalibriergerade mit zugehörigen Vertrauensbereich und in Tabelle 3-7 die Kalibrierparameter von Fluoreszenz-Lysozym in der PEG-Phase gezeigt. Die zugehörigen Residuenplots sind dem Anhang (ab Seite 177) zu entnehmen.

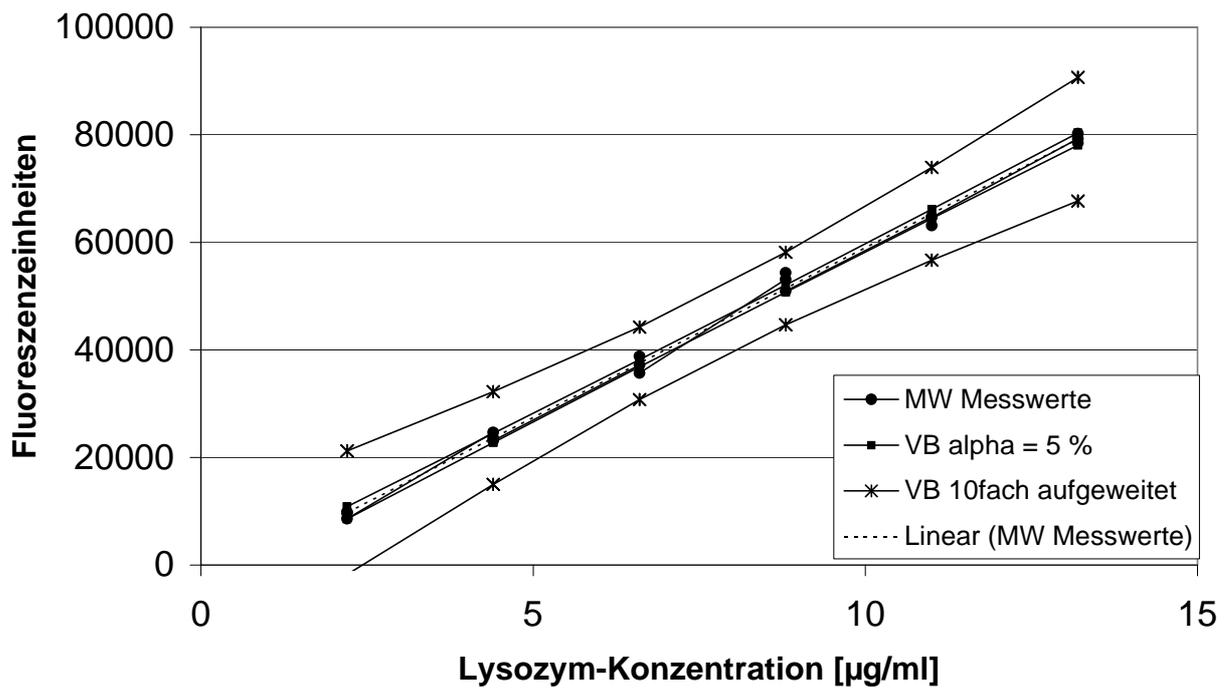


Abbildung 3-3: Kalibriergerade für Lysozym in der PEG-Phase im System mit 5 % Saccharose

Tabelle 3-7: Kalibrierparameter für Lysozym in der PEG-Phase im System mit 5 % Saccharose

Messbereich	2,2 – 13,2 mg
Anzahl Kalibrierpunkte	6
Anzahl Proben je Kalibrierpunkt	3
Freiheitsgrade (Probenanzahl – 2)	16
Kalibrierfunktion	$y = 6316,1 x - 4175,5$
Reststandardabweichung $s_y$	1296,9
Verfahrensstandardabweichung $s_{x0}$	0,21
rel. Verfahrensstandardabweichung $V_{x0}$	2,67 %
Korrelationskoeffizient $r$	0,9987
Bestimmtheitsmaß $r^2$	0,9973

### **3.3.4.2.2 Lysozym-ELISA**

#### **Probenvorbereitung**

5,7 g einer wässrigen 30 %igen PEG-Lösung und 4,3 g einer wässrigen 4 %igen HES-Lösung, die jeweils 0 %, 5 %, 10 % bzw. 15 % Saccharose enthalten, werden gemischt und mit 20 µl einer 0,20 %igen Humanlysozym-Lösung versetzt. Die Proben werden jeweils 30 Sekunden gevortext, 30 min bei Raumtemperatur stehen gelassen und anschließend zur Beschleunigung der Phasenseparation 10 min bei 5300 rpm zentrifugiert. Die Phasen werden getrennt und von jeder Phase werden 12,5 µl ad 50,0 ml mit Phosphatpuffer pH 7 verdünnt, um im messbaren Konzentrationsbereich des ELISA-Kits arbeiten zu können, der durch den mitgelieferten internen Standard bedingt ist. Für die Referenzproben wird das Zweiphasensystem anstelle von Lysozym mit Wasser versetzt und genauso aufbereitet wie die Proben.

#### **Durchführung des Versuchs**

Für den ELISA werden jeweils 50 µl der Probe, der Referenzproben und der Kalibrierlösung auf die mit Antikörpern beschichtete 96-Well-Platte aufgetragen, die Wells mit Dichtungsband verschlossen und die Proben für 2 Stunden inkubiert. Nach der Inkubationszeit werden die Wells 5-mal mit je 200 µl verdünntem Waschpuffer gewaschen. Durch das Wenden der Platte wird der Inhalt entfernt und Reste durch vorsichtiges Ausklopfen der Platte auf Zellstoff entfernt. Anschließend werden 50 µl des Biotin-markierten Lysozym-Antikörpers in jedes Well pipettiert und die Platte für eine weitere Stunde inkubiert. Nach dem 5-maligen Waschen der Wells und dem Ausklopfen der Reste werden 50 µl des Streptavidin-Peroxidase-Konjugates in jedes Well gegeben und die Platte für 30 Minuten inkubiert. Es folgen weitere Waschschrte und anschließend die Zugabe von 50 µl des Chromogen-Substrates in jedes Well bis die blaue Farbe nach ca. 8 Minuten optimal zu sehen ist. Die Platte wird nun zur Homogenisierung vorsichtig bewegt und alle Blasen mit einer Kanüle zerstochen. Um die Absorption bei 450 nm messen zu können, wird in jedes Well 50 µl 0,1 N Salzsäure pipettiert. Die Farbe wechselt von blau nach gelb und wird sofort am Plattenreader Synergy HT (BioTek Instruments, Bad Friedrichshall, Germany) vermessen.

## **3.4 HES-Mikropartikel**

### **3.4.1 Herstellung**

Die Mikropartikel werden durch eine Wasser-in-Wasser-Emulsionsmethode hergestellt (Albertsson et al., 1990; Franssen & Hennink, 1998; Scheibe, 2008). Das Konzentrationsverhältnis PEG 8 000

---

zu HES-HEMA beträgt 10+1. Alle Stammlösungen (HES-HEMA 4 % (m/m), Irgacure 2959 0,1 % (V/V), PEG 8 000 30 % (m/m), Saccharose 53 % (m/m)) werden mit Phosphatpuffer pH 7 hergestellt.

3,0 g der HES-HEMA Stammlösung werden mit 150 µl Fluoreszenz-Lysozym (0,20 % m/V), 2,0 g Phosphatpuffer bzw. Saccharoselösung und 0,6 g der Irgacure-Lösung versetzt. Die Saccharosekonzentrationen betragen 0 %, 5 %, 10 % und 15 % (m/m). Diese Mischungen werden vorsichtig mit PEG 8 000-Lösung überschichtet und zur Viskositätssteigerung für 10 min in Eiswasser gekühlt. Anschließend wird die entstandene Wasser-in-Wasser-Emulsion 1 min lang auf Stufe 1 mit dem Vortex-Genie (Scientific Industries, New York, USA) gevortext.

Die Emulsion wird 30 min lang mit UV-Licht (Wellenlänge: 366 nm) der Intensität 3,5 mW/cm<sup>2</sup> bestrahlt.

Nach Überführen der entstandenen Suspension in ein Zentrifugenröhrchen und Zentrifugation bei 5000 rpm für 5 min wird die überstehende PEG-Phase abdekantiert. Die Mikropartikel werden in Wasser (bzw. im Fall von saccharosehaltigen Mikropartikeln mit Saccharoselösung entsprechender Konzentration) resuspendiert, um sie von PEG-Rückständen und anderen verbleibenden Substanzen zu befreien, und erneut zentrifugiert. Diese Waschschrte werden 5-mal wiederholt. Der PEG-Überstand und alle Waschwässer werden für die Untersuchung der Einschluss-Effizienz (Massenbilanz-Methode) gesammelt. Abschließend werden die Mikropartikel lyophilisiert.

Alle beschriebenen Arbeitsschritte werden unter Lichtausschluss durchgeführt.

Nach der oben beschriebenen Vorgehensweise werden weiterhin Mikropartikel hergestellt, die anstelle mit Fluoreszenz-Lysozym mit der gleichen Menge FITC-Dextran 70 beladen werden. Dabei werden Saccharosekonzentrationen von 0 %, 5 %, 10 % und 15 % (m/m) eingesetzt und der Einfluss der Zuckerkonzentration untersucht.

Jede Charge wird dreimal hergestellt (außer unbeladene Mikropartikel: n = 1). Folgende 44 Chargen (siehe Tabelle 3-8) Mikropartikel werden dabei erhalten.

Tabelle 3-8: *Hergestellte Mikropartikel-Chargen*

Mit f-Lysozym beladene Mikropartikel	Mit FITC-Dextran beladene Mikropartikel
DS 1,5; Ohne Saccharose (n = 3)	DS 1,5; Ohne Saccharose (n = 3)
-	DS 1,5; Mit 5 % Saccharose (n = 3)
DS 1,5; Mit 10 % Saccharose (n = 3)	DS 1,5; Mit 10 % Saccharose (n = 3)
-	DS 1,5; Mit 15 % Saccharose (n = 3)
DS 7,8; Ohne Saccharose (n = 3)	DS 7,8; Ohne Saccharose (n = 3)
-	DS 7,8; Mit 5 % Saccharose (n = 3)
DS 7,8; Mit 10 % Saccharose (n = 3)	DS 7,8; Mit 10 % Saccharose (n = 3)
-	DS 7,8; Mit 15 % Saccharose (n = 3)
pro DS und Saccharosegehalt (n = 1) Referenz-MP, d. h. ohne Beladung	

### 3.4.2 Mikropartikel-Auswaage und -Ausbeute

Die Bestimmung der Auswaage an Mikropartikeln erfolgt gravimetrisch durch Differenzbildung der Gewichte der Herstellungs-Reaktionsgefäße mit Mikropartikeln (und ggf. Saccharose) und dem Gewicht der leeren Reaktionsgefäße.

Saccharosehaltige Mikropartikel enthalten außer der Mikropartikelmatrix zusätzlich einen großen Anteil eingebetteter und anhaftender Saccharose. Je größer der bei der Herstellung eingesetzte Saccharosegehalt ist, desto höher ist der eingebettete und anhaftende Saccharoseanteil in bzw. auf den Mikropartikeln und damit auch die Mikropartikel-Auswaage. Für alle weiteren Versuche, die mit den Mikropartikeln durchgeführt werden, soll die gleiche Menge Mikropartikel eingesetzt werden, um die einzelnen Chargen miteinander vergleichen zu können. Das bedeutet, dass von den saccharosehaltigen mehr eingesetzt werden muß als von den saccharosefreien Mikropartikeln. Ziel der genauen Auswaage der Mikropartikel ist es, einen Faktor zu berechnen, um den die Ausbeute durch den Saccharosezusatz – im Vergleich zu den saccharosefreien Mikropartikeln – höher ist. Dieser Faktor wird bei allen weiteren Untersuchungen benötigt, um die Einwaage saccharosehaltiger Mikropartikel an die Einwaage saccharosefreier Mikropartikel anzupassen.

Die Ausbeute der saccharosefreien Mikropartikel wird berechnet, indem deren Auswaage mit der theoretischen Auswaage ins Verhältnis gesetzt wird. Die theoretische Auswaage berechnet sich

dabei aus der eingesetzten Menge HES-HEMA und – bei einer angenommenen Einschlussrate von 100 % Wirkstoff – der eingesetzten Menge Lysozym bzw. FITC-Dextran. Das bedeutet eine theoretische Ausbeute von 120,33 mg saccharosefreier Mikropartikel. Die Berechnung der Ausbeute saccharosehaltiger Mikropartikel ist nicht möglich, da die eingebettete Menge Saccharose nicht bekannt ist und somit keine theoretische Auswaage berechnet werden kann.

### **3.4.3 Morphologie und Partikelgröße der Mikropartikel**

#### **3.4.3.1 Durchlicht-Mikroskopie**

Zur ersten Abschätzung der Partikelgröße werden je 15 mg Mikropartikel in 2 ml 10 %iger Tween 20-Lösung suspendiert. Diese Suspensionen werden mit dem Mikroskop Axio Imager Z 1 (Carl Zeiss, Jena, Deutschland) bei 100-, 200- und 400-facher Vergrößerung untersucht, um die Messergebnisse der Partikelgrößenmessung durch Laserbeugung (siehe Kapitel 3.4.3.4) zu verifizieren.

#### **3.4.3.2 Fluoreszenz-Mikroskopie**

Ein Aliquot der Mikropartikel, die mit fluoreszenzmarkiertem Lysozym bzw. FITC-Dextran (ca. 0,03 % (m/m) im System) beladen sind, wird auf einen Objektträger aufgebracht, in Glycerol 85 % dispergiert und mit der Fluoreszenz-Einheit des Axio Imager Z 1 (Carl Zeiss, Jena) untersucht.

Ziel dieses Versuchs ist es, die qualitative Verteilung von Lysozym und FITC-Dextran in bzw. auf den Mikropartikeln darzustellen. Dazu werden jeweils die Durchlichtbilder mit überlagertem Fluoreszenz-Auflicht den entsprechenden Fluoreszenz-Auflichtbildern gegenübergestellt, so dass eine eindeutige Zuordnung erfolgen kann.

Die Bildbearbeitung der erhaltenen Aufnahmen erfolgt mit der Software Ulead PhotoImpact XL, Fa. Ulead/Corel, Unterschleißheim.

#### **3.4.3.3 Rasterelektronen-Mikroskopie**

Auf eine einseitig mit Tempfix beschichtete Aluminiumfolie wird ein Aliquot Mikropartikel aus ca. 1 cm Höhe aufgestäubt und überschüssiges Pulver entfernt. Das Präparat wird bei ca. 50 °C fixiert. Die präparierte Folie wird mit leitendem doppelseitigem Klebeband auf einen Aluminiumniet geklebt und anschließend im Biorad E 5100 mit Gold bedampft. Die Bedingungen beim Sputtern sind wie folgt festgelegt:

- Druck: ca. 0,04 mbar
- Beschleunigungsspannung: 2,1 kV
- Stromstärke: 20 mA
- Sputterzeit: viermal 60 s

Die Proben werden bei der auf den Bildern angegebenen Beschleunigungsspannung mit dem Zeiss DSM 940 A (Oberkochen, Deutschland) mit integrierter Frame Grabber-Karte (Programm: Orion Vers. 5.25) untersucht.

#### **3.4.3.4 Partikelgrößenmessung durch Laserbeugung**

Zur Messung der Partikelgröße werden je 15 mg Mikropartikel in 2 ml 10 %iger Tween 20-Lösung suspendiert und im Mastersizer 2000 (Malvern Instruments GmbH, Herrenberg, Deutschland) vermessen. Pro Charge werden je 5 Wiederholungsmessungen von 3 verschiedenen Proben durchgeführt.

#### **3.4.4 Bestimmung der Einschlussrate**

Die Einschlussrate ist der Anteil des eingesetzten Wirkstoffs, der in den Mikropartikeln eingeschlossen vorliegt. Sie wird in dieser Arbeit zum einen durch die Massenbilanzmethode und zum anderen durch Vermessung des freigesetzten Wirkstoffanteils nach dem Abbau des Gelgerüsts durch Alpha-Amylase bestimmt.

##### **3.4.4.1 Lysozym**

###### **3.4.4.1.1 Massenbilanzmethode**

Bei dieser Methode werden die bei der Herstellung der Mikropartikel anfallenden PEG-Überstände und die Waschwasserfraktionen (bzw. Saccharoselösungen) untersucht. Dazu werden je 160 µl der Lösungen und eine Standard-Reihe des eingesetzten f-Lysozyms (7 Kalibrierpunkte) in eine 96-Well-Platte pipettiert und die Proben am Plattenreader Synergy HT (BioTek Instruments, Bad Friedrichshall, Germany) fluorimetrisch bei einer Extinktionswellenlänge von 485/20 nm und einer Emissionswellenlänge von 645/40 nm vermessen. Als Referenzproben werden jeweils die PEG-Überstände bzw. Waschwasserfraktionen der unbeladenen Mikropartikel eingesetzt. Die Berechnung der eingeschlossenen Fluoreszenz-Lysozym-Menge erfolgt durch Differenzbildung aus

---

der bekannten eingesetzten Menge und den in den Überständen bzw. Waschwasserfraktionen gemessenen Mengen nicht eingeschlossenen Fluoreszenz-Lysozyms.

#### **3.4.4.1.2 Alpha-Amylase-Methode**

Für die Herstellung einer geeigneten Alpha-Amylase-Lösung werden 30 mg Alpha-Amylase in 20 ml Carbonatpuffer pH 9,6 gelöst, so dass eine Endkonzentration von 0,15 % (m/V) (entspricht 595,5 U/ml) vorliegt. 5 mg Mikropartikel, genau gewogen (bzw. eine um den in Kapitel 4.2.1 beschriebenen Faktor erhöhte Menge, je nach Saccharosegehalt), werden in Epi-Caps eingewogen und mit 1,0 ml der Enzymlösung versetzt, so dass eine stark getriebene Suspension entsteht. Die Proben werden auf einem Kreisschüttler (vortex mixer SA8, Stuart, Bibby Scientific, Staffordshire, UK) bei 37 °C im Brutschrank inkubiert, bis keine Trübung mehr zu erkennen ist (nach 48 h). Die Fluoreszenz-Lysozym-Standards (n = 3) werden genauso behandelt wie die Mikropartikel, um die Stabilität des f-Lysozyms in dem verwendeten Medium zu ermitteln und einen Abbau des Wirkstoffs auszuschließen. In folgenden Medien werden jeweils 10 µg/ml (im Fall von Alpha-Amylase in Phosphatpuffer: 8 µg/ml) Fluoreszenz-Lysozym gelöst, inkubiert und untersucht:

- Alpha-Amylase in Carbonatpuffer pH 9,6 (595,5 U/ml)
- Carbonatpuffer pH 9,6
- Alpha-Amylase in Phosphatpuffer pH 7 (595,5 U/ml)
- Phosphatpuffer pH 7

Um einen Einfluss von Saccharose oder anderer an der Herstellung beteiligter Substanzen auf das Ergebnis auszuschließen, werden die als Referenzproben verwendeten unbeladenen Mikropartikel genauso behandelt wie beladene und die Proben in gleicher Weise analysiert.

Die Proben, die Standards und die Kalibrierlösungen (jeweils n = 3) werden zu je 160 µl in eine 96-Well-Platte pipettiert und am Plattenreader Synergy HT (BioTek Instruments, Bad Friedrichshall, Germany) fluorimetrisch bei einer Extinktionswellenlänge von 485/20 nm und einer Emissionswellenlänge von 645/40 nm vermessen.

### **3.4.4.2 FITC-Dextran**

#### **3.4.4.2.1 Massenbilanzmethode**

Die fluorimetrischen Vermessung der Rückstände und Waschwässer der Mikropartikelherstellung erfolgt wie in Kapitel 3.4.4.1 beschrieben, jedoch bei einer Extinktionswellenlänge von 485/20 nm und einer Emissionswellenlänge von 528/20 nm.

#### **3.4.4.2.2 Alpha-Amylase-Methode**

Die Ermittlung der Einschlussrate mit Hilfe der Alpha-Amylase erfolgt wie in Kapitel 3.4.4.1 beschrieben, jedoch werden die Proben bei einer Extinktionswellenlänge von 485/20 nm und einer Emissionswellenlänge von 528/20 nm vermessen. Da Vorversuche gezeigt haben, dass das Medium keinen Einfluss auf die Stabilität von FITC-Dextran hat, wird als Standard in diesem Versuch nur FITC-Dextran in Alpha-Amylase in Carbonatpuffer pH 9,6 (595,5 U/ml) untersucht und dessen Stabilität nachgewiesen.

### **3.4.5 Freisetzungsversuche**

Die im Folgenden beschriebenen Freisetzungsversuche werden sowohl in konvertiertem Humanserum als auch in Phosphatpuffer pH 7 durchgeführt. Beide Medien werden mit 0,02 % (m/V) Natriumazid konserviert, um eine mikrobiologische Kontaminierung durch den Probenzug während der Inkubation bei 37 °C zu vermeiden. Der Probenzug erfolgt unter aseptischen Bedingungen, d. h. alle produktberührenden Teile wie Pipettenspitzen, Glasbehältnisse, PP-Tubes und alle verwendeten Lösungen (außer Humanserum) werden vor dem Gebrauch autoklaviert (Labstar 3-4-7, Zirbus technology, Bad Grund, Deutschland; Programm 4 bzw. 5: 121 °C, 2,1 bar, 15 min) und der Probenzug erfolgt in einer Sicherheitswerkbank (NUAIRE, Class II, Integra Biosciences, Fernwald, Deutschland).

Als Referenzproben dienen jeweils unbeladene Mikropartikel, welche genauso behandelt werden wie beladene Mikropartikel. Als Standardlösungen dienen Lysozym- bzw. FITC-Dextran-Lösungen bekannter Konzentration, die ebenso inkubiert werden wie die Proben und zu den Probenzugszeitpunkten mit untersucht werden, um einen möglichen Abbau der Stoffe auszuschließen.

Der Probenzug in der Sicherheitswerkbank erfolgt grundsätzlich ohne zusätzliche Lichtquellen, um ein Ausbleichen der Fluoreszenz-Farbstoffe zu verhindern.

Um die Robustheit und Reproduzierbarkeit sowohl des Herstellungsverfahrens als auch der Analysenmethode zu zeigen, werden Mittelwert und Standardabweichungen der Ergebnisse aller Chargen gleicher Zusammensetzung gebildet, so dass die Streuung der Ergebnisse der Chargen gleicher Zusammensetzung deutlich wird.

#### **3.4.5.1 Lysozym**

Für die Freisetzungsversuche werden jeweils 20,0 mg Mikropartikel (bzw. eine um den in Kapitel 4.2.1 beschriebenen Faktor erhöhte Menge der saccharosehaltigen Mikropartikel) in braune 2 ml-Rotilabo-Reaktionsgefäße (Carl Roth, Karlsruhe) eingewogen und mit 1,0 ml FreisetzungsmEDIUM (konvertiertes Humanserum bzw. Phosphatpuffer pH 7) versetzt. Die Inkubation der Proben erfolgt bei 37 °C im Brutschrank, wobei die Proben auf einem Kreisschüttler kontinuierlich bewegt werden. Vor jedem Probenzug werden die Röhren 5 min lang bei 5300 rpm zentrifugiert, um einen klaren Überstand zu erhalten, aus dem die Proben gezogen werden können. Der Probenzug erfolgt ca. alle 24 h. Es werden 500 µl des Überstandes entnommen und zu je dreimal 160 µl (Dreifachbestimmung eines Messpunktes) am Plattenreader Synergy HT (BioTek Instruments, Bad Friedrichshall, Germany) fluorimetrisch bei einer Extinktionswellenlänge von 485/20 nm und einer Emissionswellenlänge von 645/40 nm vermessen. Das entnommene Volumen wird durch 500 µl frisches Medium ersetzt. Abschließend wird das Mikropartikel-Sediment mit dem Vortexer Vibrofix VF 1 (IKA-Werke GmbH, Staufen, Deutschland) 10 s lang bei 2500 rpm aufgeschüttelt und erneut inkubiert.

Beispielhaft wird in Abbildung 3-4 die Kalibriergerade mit zugehörigen Vertrauensbereich und in Tabelle 3-9 die Kalibrierparameter von Fluoreszenz-Lysozym in Humanserum gezeigt. Die zugehörigen Residuenplots sind dem Anhang (ab Seite 177) zu entnehmen.

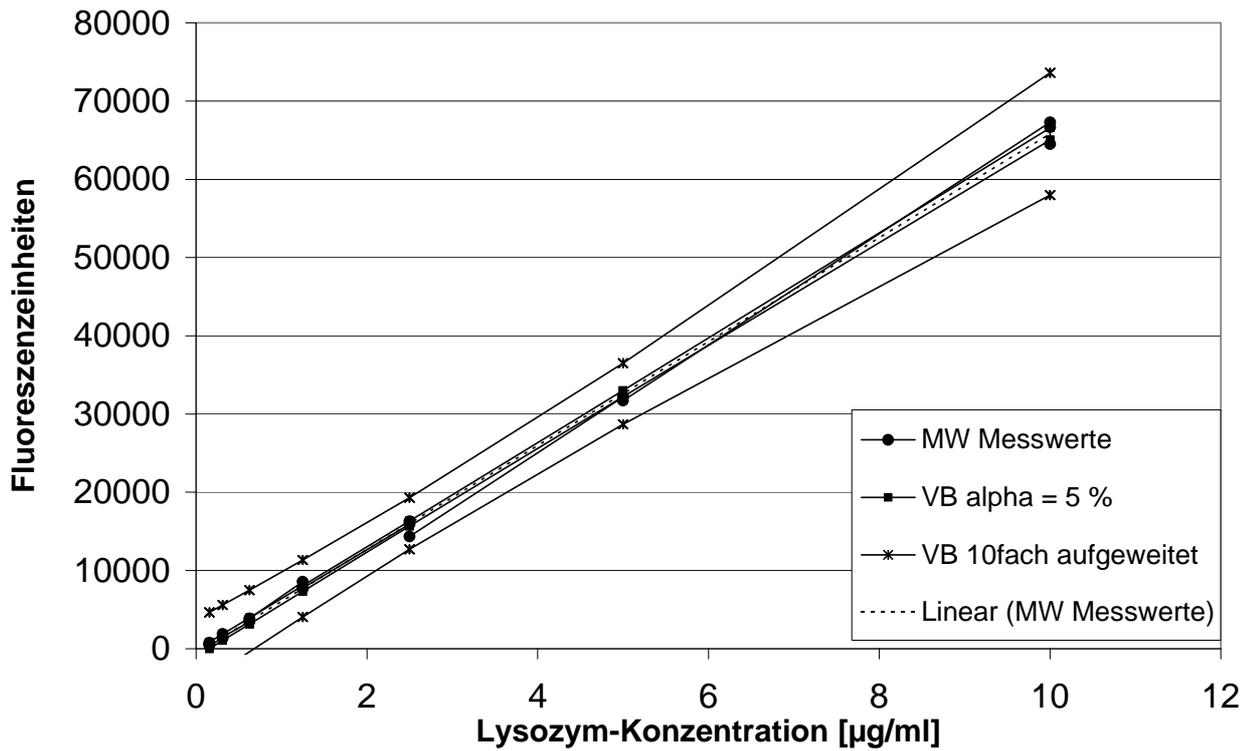


Abbildung 3-4: Repräsentatives Beispiel einer Kalibriergerade von Fluoreszenz-Lysozym in Humanserum

Tabelle 3-9: Repräsentatives Beispiel der Kalibrierparameter von Fluoreszenz-Lysozym in Humanserum

Messbereich	0.1563 – 10 µg/ml
Anzahl Kalibrierpunkte	7
Anzahl Proben je Kalibrierpunkt	3
Freiheitsgrade (Probenanzahl – 2)	19
Kalibrierfunktion	$y = 6641,8 x - 610,4$
Reststandardabweichung $s_y$	718,2
Verfahrensstandardabweichung $s_{x0}$	0,108
rel. Verfahrensstandardabweichung $V_{x0}$	3,81 %
Korrelationskoeffizient $r$	0,9995
Bestimmtheitsmaß $r^2$	0,9990

### 3.4.5.2 FITC-Dextran

Die Freisetzungsuntersuchungen von mit FITC-Dextran beladenen Mikropartikeln erfolgen wie in Kapitel 3.4.5.1 beschrieben, allerdings bei einer Extinktionswellenlänge von 485/20 nm und einer Emissionswellenlänge von 528/20 nm.

Beispielhaft werden in Abbildung 3-5 die Kalibriergerade mit zugehörigen Vertrauensbereich und in Tabelle 3-10 die Kalibrierparameter von FITC-Dextran in Humanserum gezeigt. Die zugehörigen Residuenplots sind dem Anhang (ab Seite 177) zu entnehmen.

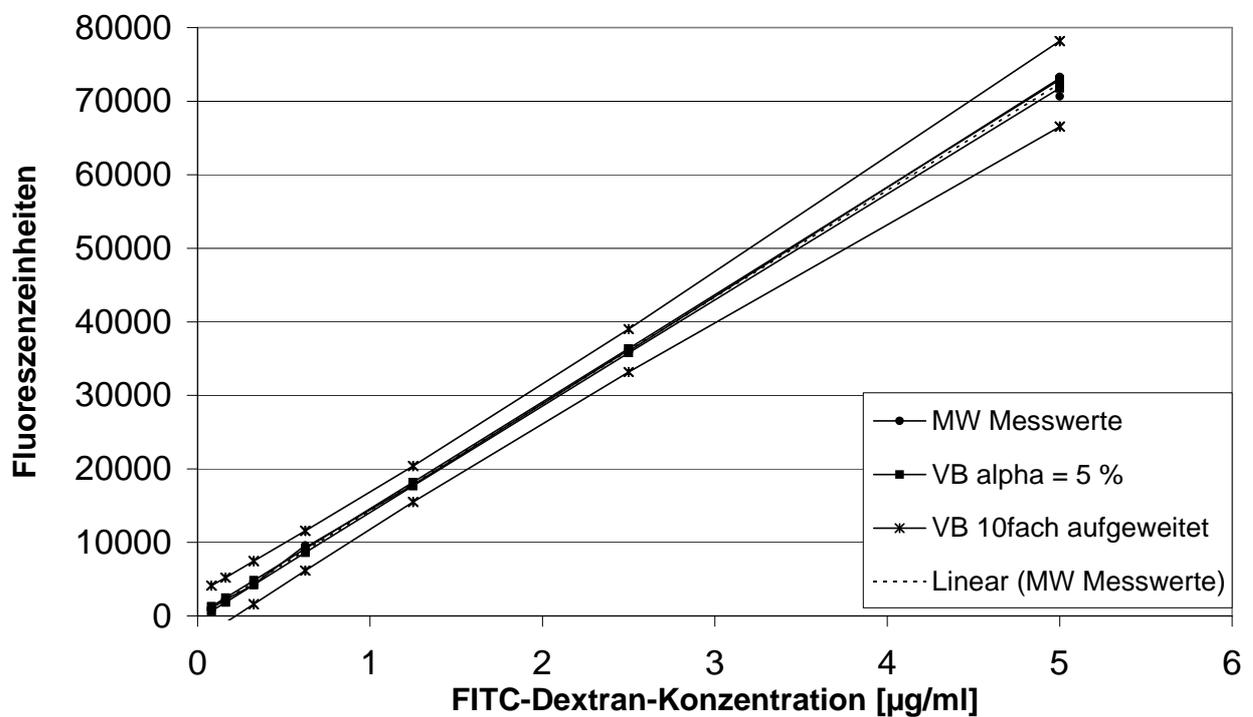


Abbildung 3-5: Repräsentatives Beispiel einer Kalibriergerade von FITC-Dextran in Humanserum

*Tabelle 3-10: Repräsentatives Beispiel der Kalibrierparameter von FITC-Dextran in Humanserum*

Messbereich	0,0813 – 5 µg/ml
Anzahl Kalibrierpunkte	7
Anzahl Proben je Kalibrierpunkt	3
Freiheitsgrade (Probenanzahl – 2)	19
Kalibrierfunktion	$y = 14510,4 x - 192,1$
Reststandardabweichung $s_y$	534,2
Verfahrensstandardabweichung $s_{x0}$	0,0368
rel. Verfahrensstandardabweichung $V_{x0}$	2,59 %
Korrelationskoeffizient $r$	0,9998
Bestimmtheitsmaß $r^2$	0,9996

### 3.4.6 Verhalten von Lysozym gegenüber Bestandteilen des Humanserums

#### 3.4.6.1 Durchlichtmikroskopie

Es werden lichtmikroskopische Bilder von Lysozym in Humanserum (5 mg/ml Lysozym in 1/10 verdünntem Humanserum) bei 100-, 200- und 400-facher Vergrößerung angefertigt (Axio Imager Z 1, Carl Zeiss, Jena, Deutschland):

#### 3.4.6.2 Gelpermeations-Chromatographie

Bei der Gelpermeation-Chromatographie werden die untersuchten Proteine nach ihrer Größe aufgetrennt, ohne vorher denaturiert werden zu müssen. Die Proteine werden in ihrer nativen Struktur erhalten und durch ein Größenausschlussverfahren aufgetrennt. Die verwendete Sephadex-Säule wird mit verschiedenen Proteinen kalibriert und die in Abbildung 3-6 dargestellte Kalibrierkurve wird erhalten.

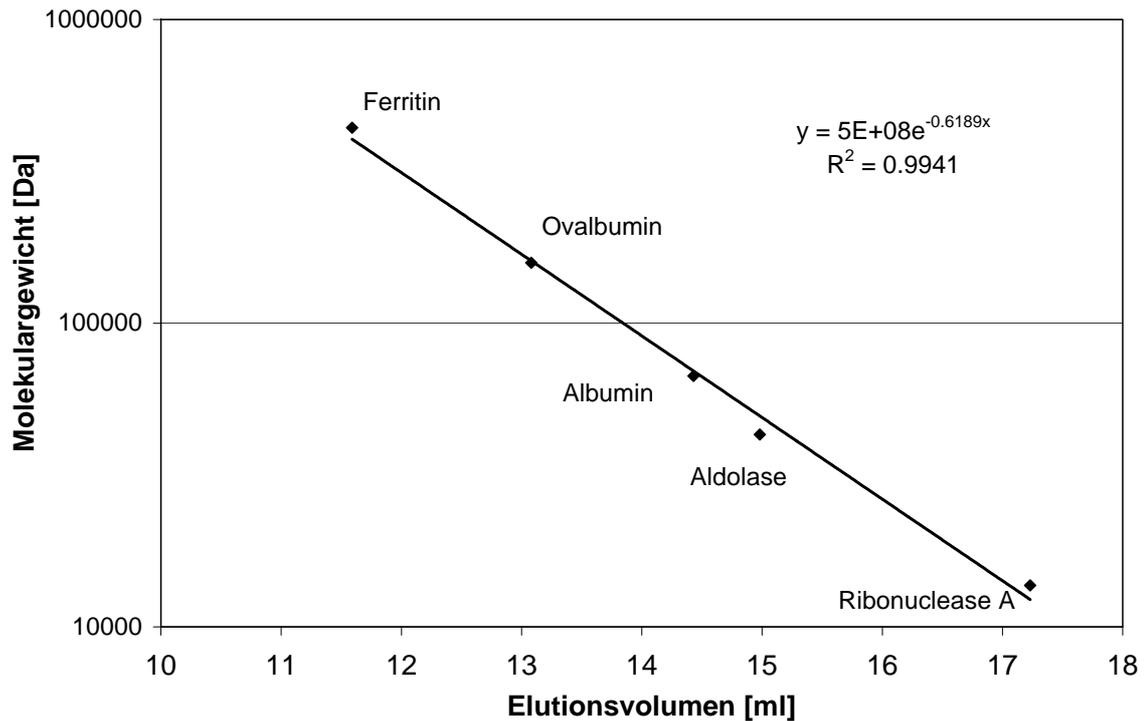


Abbildung 3-6: Kalibriergerade der Sephadex-Säule für die Gelpermeations-Chromatographie

Mit Hilfe dieser Kalibriergeraden ist eine Abschätzung der Elutionszeiten bzw. des Elutionsvolumens der im Humanserum enthaltenen Globuline und des Lysozyms möglich.

Folgende drei Proben werden untersucht:

- 5 mg/ml Lysozym in Wasser
- 5 mg/ml Lysozym in 1/10 verdünntem Humanserum
- Humanserum, 1/10 verdünnt

Das Humanserum wird 1/10 verdünnt, um es auf einen Albumingehalt von ca. 5 mg/ml einzustellen, der für die Vermessung optimal ist. Die Proben werden nach der Herstellung durch einen 0,22 µm Sterilfilter filtriert. Anschließend werden sie mit dem Äkta purifier (GE Healthcare, Uppsala, Schweden) mit folgenden Geräteparametern untersucht:

- Fließmittel: 8 mM Tris/HCl-Puffer mit 100 mM NaCl
- Säule: Superdex 200 HR 10/30 (Durchmesser: 10 mm, Betthöhe: 30 - 31 cm)
- Flussrate: 0,5 ml/min

- Probenvolumen: 100 µl
- Detektion bei 280 nm

### 3.4.7 Abschätzung der Netzwerk-Maschenweite

Die Abschätzung der Netzwerk-Maschenweite ist über die Berechnung des hydrodynamischen Durchmessers von Proteinen möglich. Der hydrodynamische Durchmesser eines Proteins kann nach der Gleichung von Stokes-Einstein (Gleichung 3-3) berechnet werden (Hennink et al., 1996), was hier am Beispiel von Lysozym gezeigt wird:

$$D_0 = \frac{k \cdot T}{3 \cdot \pi \cdot \eta \cdot d} \quad \rightarrow \quad d = \frac{k \cdot T}{3 \cdot \pi \cdot \eta \cdot D_0} \quad \text{Gleichung 3-3}$$

$K$  Boltzmann-Konstante =  $1,3806504 \cdot 10^{-23}$  J/K

$T$  absolute Temperatur = 293,15 K

$\eta$  Viskosität des Lösungsmittels (verdünnte wässrige Lösungen bei 20 °C:  $0,001002 \text{ N}\cdot\text{s}\cdot\text{m}^{-2}$ )

$D_0$  Diffusionskoeffizient von Lysozym in der Lösung =  $1,04 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$  (Merrill et al., 1993)

### 3.4.8 Berechnung des Diffusionskoeffizienten von Lysozym im Hydrogel

Die Berechnung des Diffusionskoeffizienten von Lysozym in Hydrogelen ist nach Baker et al. (1974) möglich (Gleichung 3-4). Die Gleichung kann bis zu einem  $M_t/M_\infty$  von 0,4 angewendet werden.

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 4 \cdot \sqrt{\frac{D_m \cdot t}{\pi \cdot r^2}} \quad \rightarrow \quad D_m = \left( \frac{M_t}{M_\infty \cdot 4} \right)^2 \cdot \frac{\pi \cdot r^2}{t} \quad \text{Gleichung 3-4}$$

$M_t$  freigesetzte Menge Lysozym zum Zeitpunkt  $t$  [µg]

$M_\infty$  eingeschlossene Menge Lysozym [µg]

$t$  Zeit [s]

$D_m$  Diffusionskoeffizient von Lysozym [ $\text{cm}^2/\text{s}$ ]

$r$  Radius des Mikropartikels [cm]

## 4 Ergebnisse und Diskussion

### 4.1 Physikochemische Einflussfaktoren auf das ATPS aus HES und PEG

Die Kenntnis verschiedener Einflussfaktoren auf das wässrige Zweiphasensystem aus HES und PEG ist sowohl indirekt für die Separierung von Proteinen als auch direkt für das Ziel dieser Arbeit, die Mikropartikelherstellung, von großer Bedeutung.

#### 4.1.1 Temperatureinfluss

Der Einfluss der Temperatur stellt einen wichtigen Parameter für die Arbeit mit Zweiphasensystemen dar. Aus diesem Grund werden die Binodalkurven von PEG 8 000 und zwei verschiedenen HES-Typen (HES 200/0,5 und HES 130/0,4) in einem Temperaturbereich zwischen 10 °C und 40 °C ermittelt und einander gegenübergestellt. Abbildung 4-1 und Abbildung 4-2 zeigen die Binodalkurven der untersuchten Systeme bei verschiedenen Temperaturen.

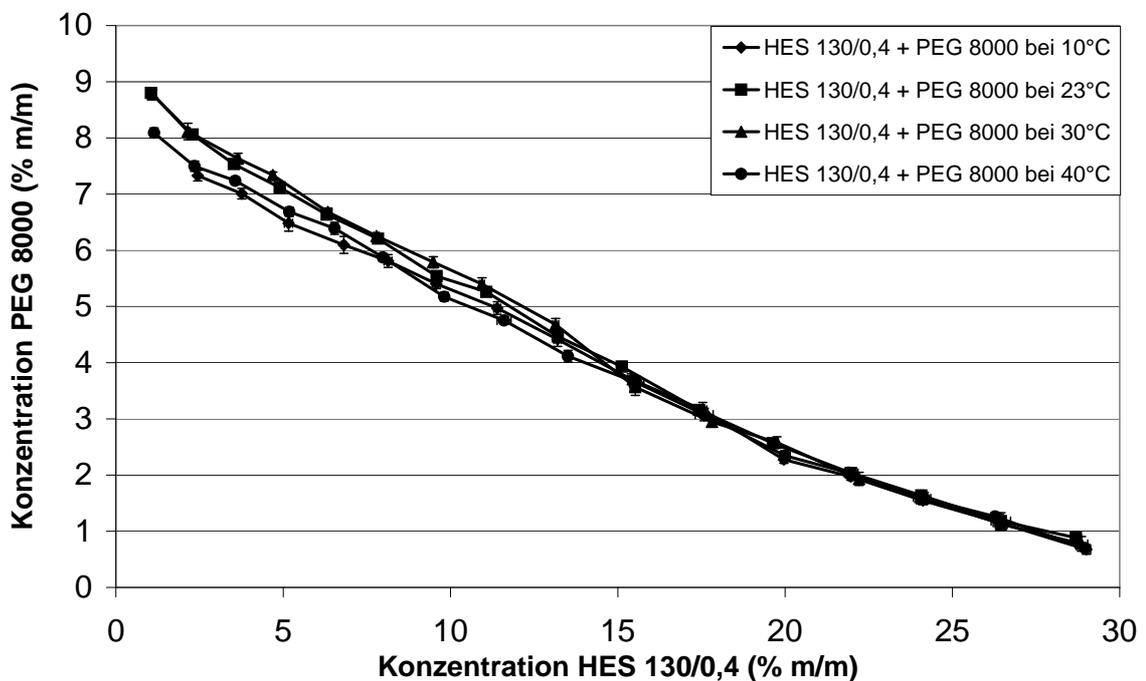


Abbildung 4-1: Binodalkurven des Systems HES 130/0,4 und PEG 8 000 bei 10, 23, 30 und 40 °C ( $n = 3$ , Fehlerbalken = Standardabweichung)

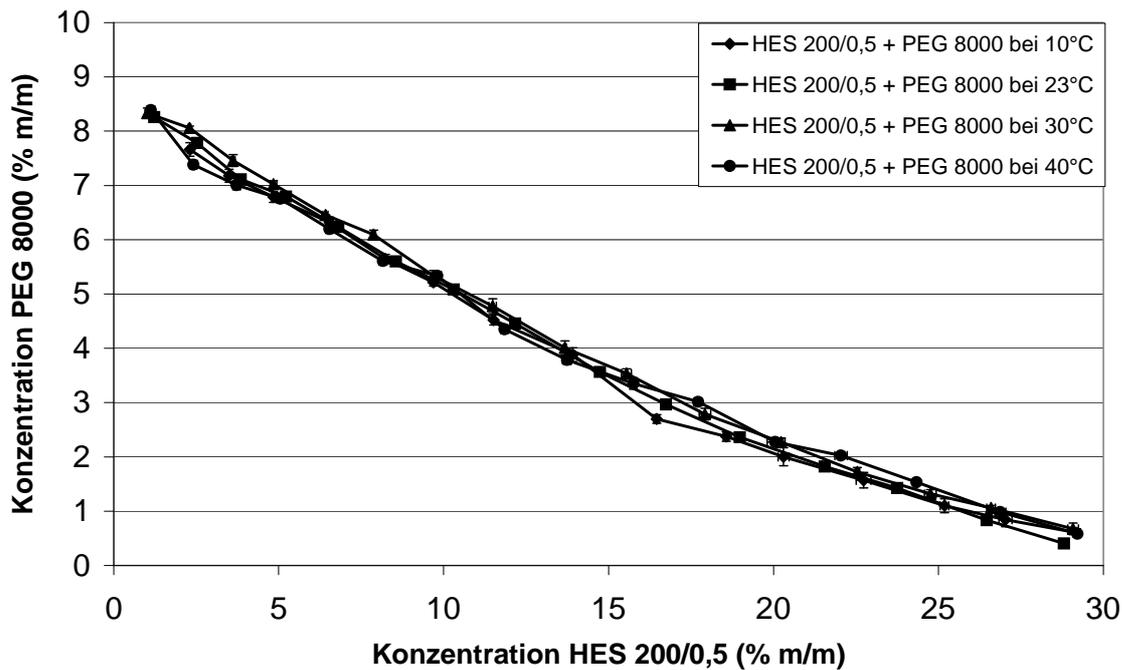


Abbildung 4-2: Binodalkurven des Systems HES 200/0,5 und PEG 8 000 bei 10, 23, 30 und 40 °C ( $n = 3$ , Fehlerbalken = Standardabweichung)

Die ermittelten Binodalkurven sind nahezu deckungsgleich, es ist kein signifikanter Unterschied zwischen den Binodalkurven aller untersuchter Temperaturen zu erkennen. Weiterhin ist kein Trend zu höheren oder niedrigeren Konzentrationen der Ausgangsstoffe HES und PEG in Abhängigkeit von der Temperatur zu erkennen. Daraus wird ersichtlich, dass es bezüglich der Ausbildung eines Zweiphasensystems weder im System HES 130/0,4 und PEG 8 000 noch im System HES 200/0,5 und PEG 8 000 einen Unterschied zwischen den untersuchten Temperaturen gibt. Somit erfolgt die Entstehung der Mischungslücke im untersuchten Bereich temperaturunabhängig.

Dies lässt darauf schließen, dass das Zweiphasensystem aus HES und PEG sehr robust gegenüber Temperatureinflüssen ist. Somit muss bei allen weiteren Versuchen, sofern sie bei einer Temperatur zwischen 10 °C und 40 °C stattfinden, keine engmaschige Temperaturkontrolle stattfinden.

#### 4.1.2 pH-Wert-Einfluss auf das Phasen-Volumen-Verhältnis

Für die Verarbeitung von Proteinen, deren Stabilität und Löslichkeit pH-abhängig ist, ist die Kenntnis der Auswirkungen des pH-Wertes auf das untersuchte wässrige Zweiphasensystem von großer Bedeutung. Mit dieser Versuchsreihe soll der Einfluss des pH-Wertes auf makroskopisch

erkennbare Auswirkungen (Flockungen, Trübungen etc.) sowie auf das Phasen-Volumen-Verhältnis untersucht werden.

Durch Veränderung des pH-Wertes des Systems kommt es makroskopisch weder zu Flockungen noch zu Trübungen o. ä. Die Auswirkungen des pH-Wertes auf das Phasenvolumenverhältnis sind in Abbildung 4-3 dargestellt. Die Abbildung zeigt den HES-Phasenanteil am Gesamtvolumen in Abhängigkeit vom pH-Wert des Systems. Der HES-Phasenanteil liegt im untersuchten pH-Bereich zwischen 1 und 6 bei etwa 2,6 % (V/V). Erwartungsgemäß ist keine Tendenz zu höheren oder niedrigeren Phasen-Volumen-Anteilen mit sinkendem pH-Wert zu erkennen.

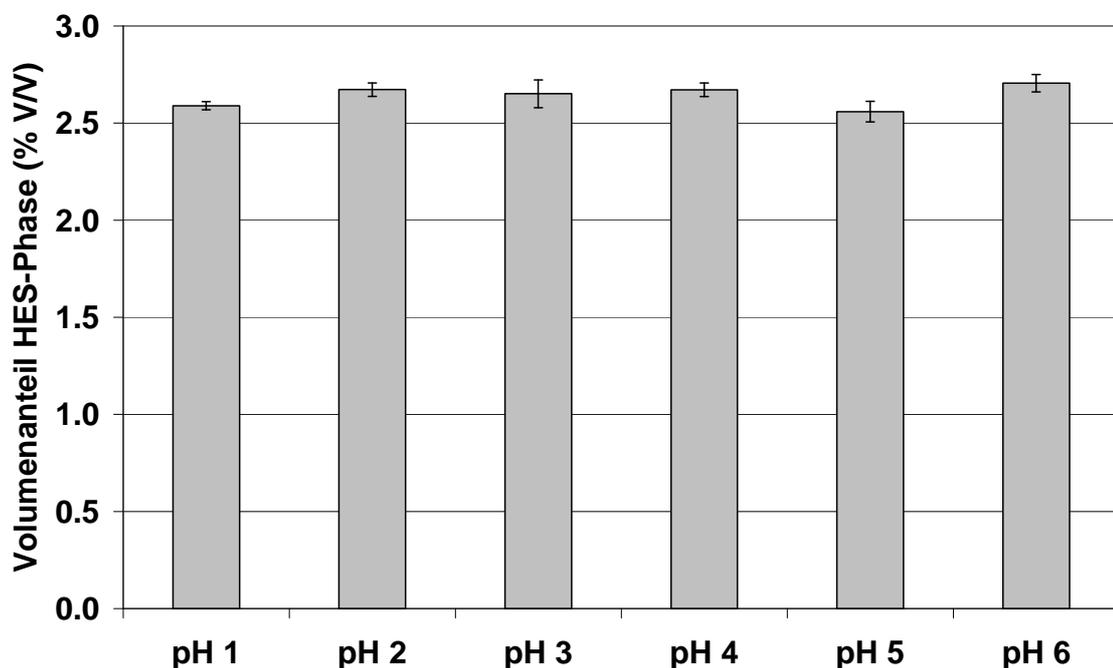


Abbildung 4-3: Volumenanteil der HES-Phase am Gesamtvolumen in Abhängigkeit vom pH-Wert (HCl) ( $n = 3$ , Fehlerbalken = Standardabweichung)

### 4.1.3 Einfluss von Kryoprotektoren auf das wässrige Zweiphasensystem

Um den Einfluss verschiedener Kryoprotektoren zu untersuchen, werden Glucose, Glycin, Mannitol, Saccharose und Trehalose in steigenden Konzentrationen zum wässrigen Zweiphasensystem zugegeben. Nach der Phasenseparation werden die Phasen getrennt und untersucht. Die Analytik erfolgt mit Hilfe der Dichtemessung und der Bestimmung des Trocknungsrückstandes beider Phasen. Die Auswertung der Messdaten erfolgt nach Gleichung 4-1 bzw. Gleichung 4-2.

$$DQ = \frac{\text{Dichte der PEG – Phase}}{\text{Dichte der HES – Phase}} \quad \text{Gleichung 4-1}$$

$$TRQ = \frac{\text{Trocknungsrückstand der PEG – Phase}}{\text{Trocknungsrückstand der HES – Phase}} \quad \text{Gleichung 4-2}$$

*DQ* Dichtequotient

*TRQ* Trocknungsrückstandsquotient

#### 4.1.3.1 Dichte

Abbildung 4-4 zeigt die aus diesen Daten gewonnenen Quotienten aus der Dichte der PEG-Phase und der Dichte der zugehörigen HES-Phase.

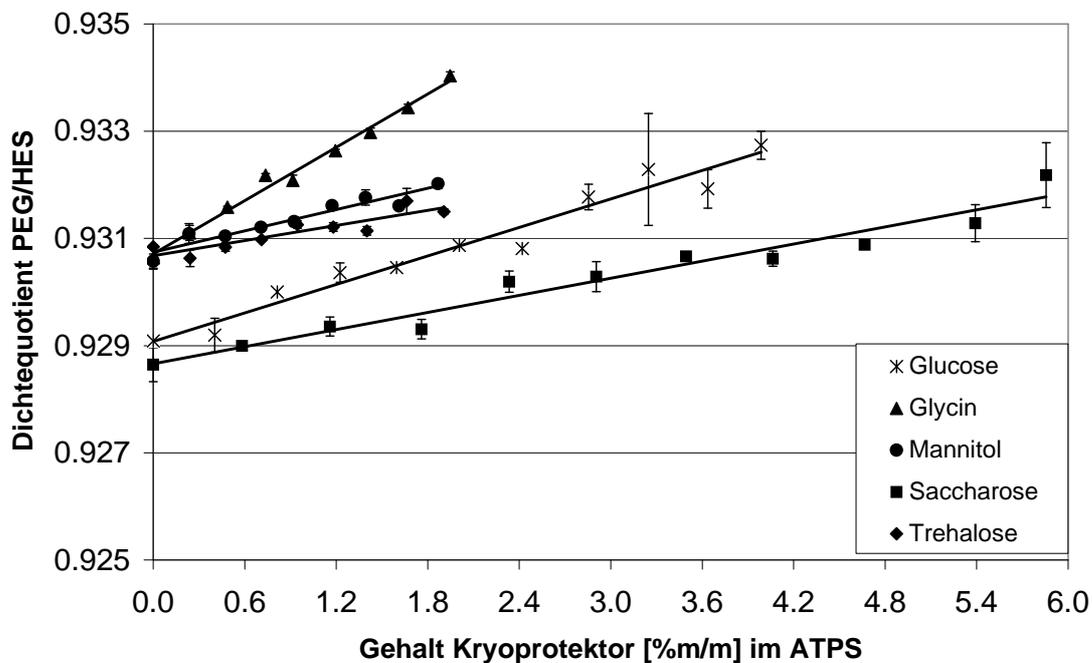


Abbildung 4-4: Dichtequotienten aus der PEG-Phase und der HES-Phase verschiedener Kryoprotektoren in Abhängigkeit von deren Konzentration

Die Dichte beider Phasen steigt mit zunehmendem Gehalt an Kryoprotektoren erwartungsgemäß linear an. Die Quotienten steigen in Abhängigkeit der zugesetzten Menge für alle getesteten Kryoprotektoren linear an (Tabelle 4-1).

Tabelle 4-1: Geradengleichungen und Bestimmtheitsmaße der Dichtequotienten (PEG/HES)

	Geradengleichung	Bestimmtheitsmaß $r^2$
Glucose	$y = 0,0009x + 0,9291$	0,9587
Glycin	$y = 0,0017x + 0,9307$	0,9881
Mannitol	$y = 0,0007x + 0,9307$	0,9169
Saccharose	$y = 0,0005x + 0,9287$	0,9531
Trehalose	$y = 0,0005x + 0,9307$	0,8069

Die unterschiedlichen Werte des y-Achsenabschnitts und damit der Quotienten der Dichten der PEG- und der HES-Phase ohne zugesetzte Kryoprotektoren resultieren daraus, dass die Versuche zum Teil mit unterschiedlichen Stammlösungen der beiden Polymere hergestellt werden. Dadurch kommt es zu unterschiedlichen Zusammensetzungen der resultierenden PEG- und HES-Phase und somit zu unterschiedlichen Dichtequotienten der kryoprotektorfreen Systeme.

Die relative Standardabweichung der einzelnen Messwerte liegt bei max. 0,1 %. Bei Betrachtung der Geradengleichungen fällt auf, dass die Steigungen von Mannitol, Saccharose und Trehalose nahezu gleich sind. Glycin weist eine im Vergleich zu den anderen Kryoprotektoren deutlich höhere Steigung auf.

#### 4.1.3.2 Trocknungsverlust/Trocknungsrückstandes

Die Bestimmung des Trocknungsrückstandes der beiden Phasen ergibt erwartungsgemäß ebenfalls einen Anstieg der Trocknungsrückstände beider Phasen mit zunehmendem Gehalt an Kryoprotektoren. Abbildung 4-5 zeigt die Quotienten aus dem Trocknungsrückstand der PEG-Phase und dem Trocknungsrückstand der zugehörigen HES-Phase mit zunehmendem Gehalt der Kryoprotektoren. Es ist ein linearer Anstieg der Trocknungsrückstandsquotienten zu beobachten. Die maximale relative Standardabweichung der einzelnen Messpunkte liegt bei 5,9 %. In Tabelle 4-2 sind die zugehörigen Geradengleichungen und Bestimmtheitsmaße zusammengefasst.

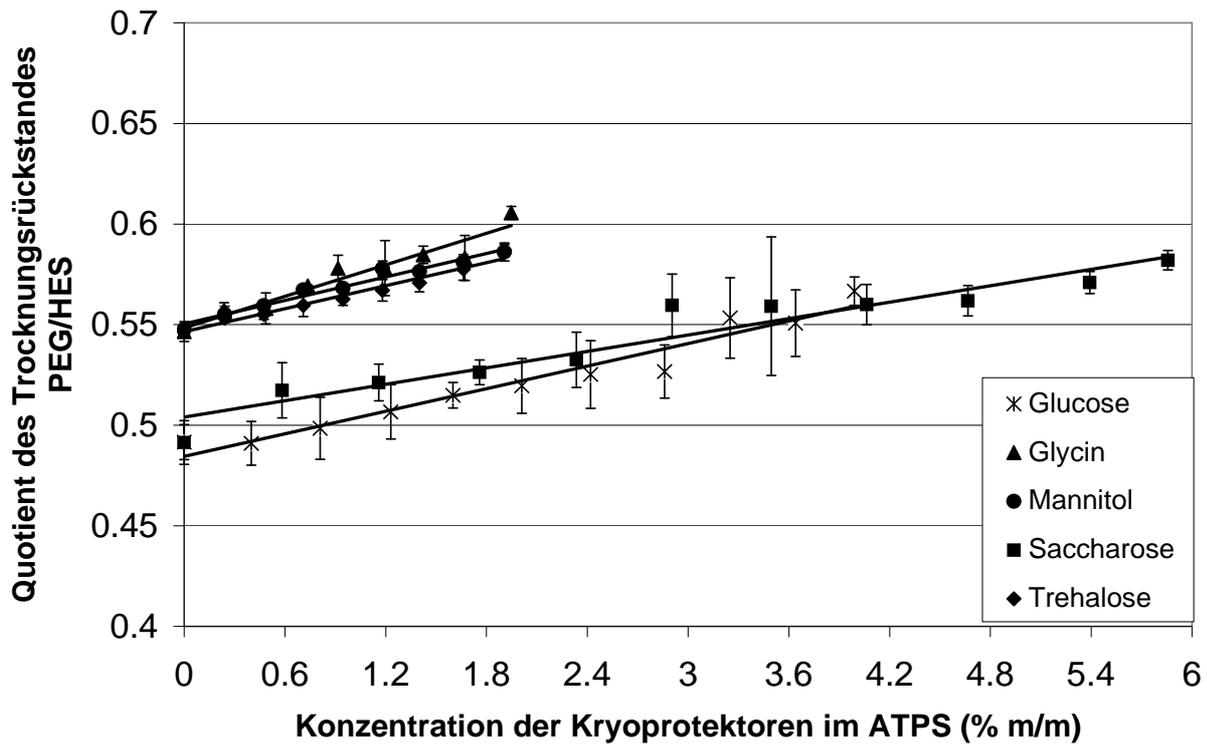


Abbildung 4-5: Quotient des Trocknungsrückstandes aus der PEG-Phase und der HES-Phase verschiedener Kryoprotektoren in Abhängigkeit von der Konzentration

Tabelle 4-2: Geradengleichungen und Bestimmtheitsmaße der Trocknungsrückstandsquotienten (PEG/HES)

	Geradengleichung	Bestimmtheitsmaß $r^2$
Glucose	$y = 0,0187x + 0,4845$	0,9492
Glycin	$y = 0,0261x + 0,5484$	0,9300
Mannitol	$y = 0,0195x + 0,5503$	0,9661
Saccharose	$y = 0,0136x + 0,5041$	0,9223
Trehalose	$y = 0,0191x + 0,5464$	0,9699

Auch hier fallen die unterschiedlichen Werte des y-Achsenabschnitts und damit der Quotienten der Trocknungsrückstände der PEG- und der HES-Phase ohne zugesetzte Kryoprotektoren auf. Dies liegt auch hier, wie in Kapitel 4.1.3.1 bereits beschrieben, wiederum an der Verwendung unterschiedlicher Stammlösungen der Polymere.

Mit diesem Versuch kann der bei der Dichtemessung (Kapitel 4.1.3.1) beobachtete Trend, dass die Steigung der Quotienten des Trocknungsverlustes von Glycin deutlich höher ist als die der anderen Kryoprotektoren, bestätigt werden.

Durch Vorversuche zur Bestimmung der Phasen-Volumen-Verhältnisse mit steigendem Gehalt an Kryoprotektoren kann ausgeschlossen werden, dass Wasser zwischen den Phasen wandert und es dadurch zu einer Verschiebung der Quotienten mit steigendem Gehalt an Kryoprotektoren kommt.

Die hier ermittelten Anstiege der Quotienten von Dichte und Trocknungsrückstand legen nahe, dass die zugesetzten Kryoprotektoren mit deren steigendem Gehalt in der PEG-Phase angereichert werden. Aus diesem Grund wird die Verteilung von Kryoprotektoren im Zweiphasensystem durch Einsatz radioaktiv markierter Substanzen sehr spezifisch bestimmt (siehe Kapitel 4.1.3.3).

#### 4.1.3.3 Bestimmung von Verteilungskoeffizienten von Kryoprotektoren

Zur Absicherung der Ergebnisse der Bestimmung der Dichte- und Trocknungsrückstandsquotienten kommt der Ermittlung von Verteilungskoeffizienten (VK) in wässrigen Zweiphasensystemen in dieser Arbeit eine besondere Bedeutung zu. Die Bestimmung der Verteilungskoeffizienten erfolgt, indem die Konzentration des zu analysierenden Stoffes in beiden Phasen bestimmt wird und die erhaltenen Konzentrationen ins Verhältnis gesetzt werden (siehe Gleichung 4-3).

$$VK_{\text{Kryoprotektor}} = \frac{C_{\text{Kryoprotektor in der PEG-Phase}}}{C_{\text{Kryoprotektor in der HES-Phase}}} \quad \text{Gleichung 4-3}$$

$$\begin{aligned} VK_{\text{Kryoprotektor}} &= \text{Verteilungskoeffizient der Kryoprotektoren} \\ C &= \text{Konzentration} \end{aligned}$$

Dabei bedeuten Verteilungskoeffizienten  $> 1$  eine Anreicherung des Stoffes in der PEG-Phase, Verteilungskoeffizienten  $< 1$  eine Anreicherung in der HES-Phase und Verteilungskoeffizienten  $= 1$  bedeuten eine Verteilung des Stoffes zu gleichen Teilen in beiden Phasen.

In Abbildung 4-6 sind die Verteilungskoeffizienten von Glycin, Saccharose und Trehalose in Abhängigkeit der Konzentration der Kryoprotektoren dargestellt. Die relative Standardabweichung liegt bei diesen Versuchen bei max. 2,6 %, was auf eine geringe Streuung der Werte hinweist und die Daten somit reproduzierbar sind. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Koeffizienten um 1 schwanken, die Konzentration der eingesetzten Kryoprotektoren aber offenbar keinen Einfluss auf

deren Verteilung hat. Saccharose und Trehalose reichern sich geringfügig in der PEG-Phase an, wohingegen Glycin in marginal höherer Konzentration in der HES-Phase vorliegt.

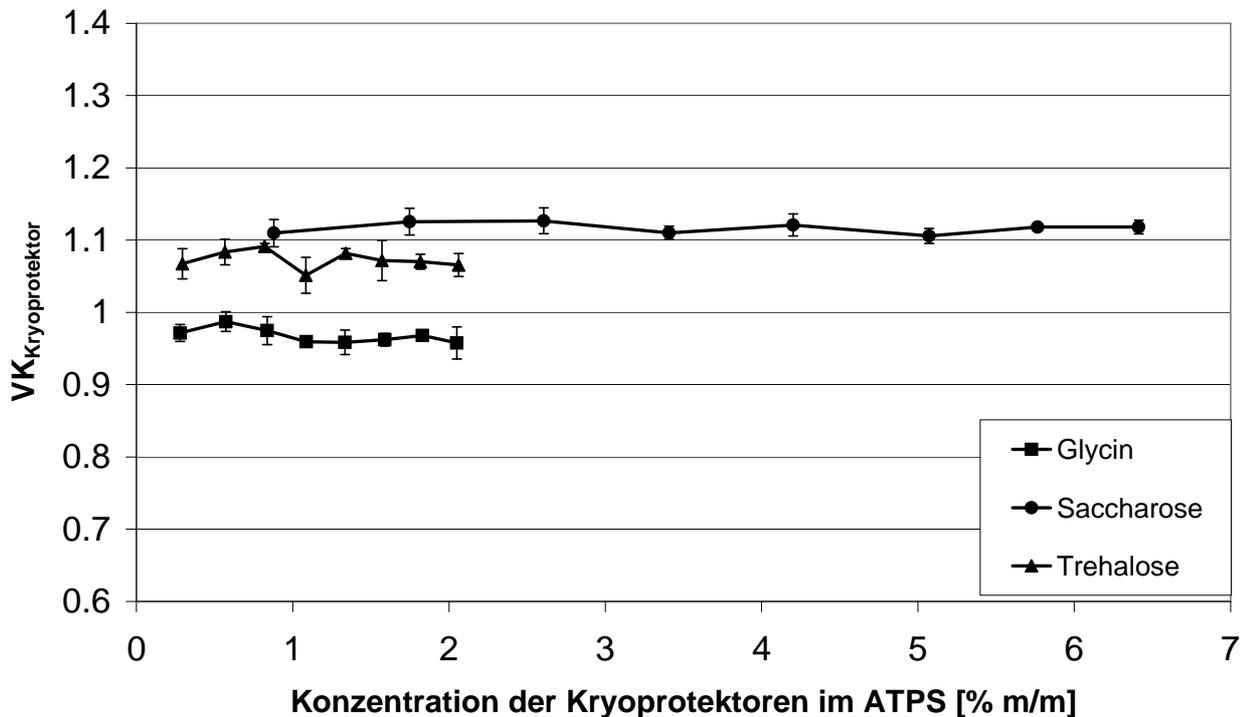


Abbildung 4-6: Verteilungskoeffizient von Saccharose, Glycin und Trehalose in Abhängigkeit von deren Konzentration im ATPS  
( $n = 3$ , Fehlerbalken = Standardabweichung)

Durch die hier erhaltenen Ergebnisse kann die Vermutung, dass sich die Kryoprotektoren mit steigender Konzentration vermehrt in der PEG-Phase anreichern, nicht bestätigt werden. Da nachweislich durch den Zusatz von Kryoprotektoren kein Wasser zwischen den Phasen wandert kann der Anstieg der Koeffizienten der Dichte und der Trocknungsrückstände nicht damit erklärt werden. Die Ergebnisse legen nahe, dass die Kryoprotektoren die Hydrophilie des Systems, insbesondere der PEG-Phase, erhöhen. Dadurch löst sich mehr HES in der PEG-Phase und es kommt dadurch zu einem überproportionalen Anstieg der Dichte und des Trocknungsrückstandes der PEG-Phase, wodurch der Quotient von PEG und HES ansteigt.

#### 4.1.3.4 Einfluss von Lysozym auf die Verteilungskoeffizienten von Kryoprotektoren

Mit diesen Versuchen soll ein evtl. vorhandener Einfluss von Lysozym auf die Verteilung von Kryoprotektoren ermittelt werden. Dazu werden die Versuche mit und ohne Lysozymzusatz

durchgeführt und die Verteilungskoeffizienten von Saccharose, Trehalose und Glycin untersucht. Die Konzentrationsverhältnisse der Kryoprotektoren und des Lysozyms werden so gewählt, dass weniger oder die gleiche Menge an Kryoprotektor wie Lysozym im System ist, da nur unter diesen Bedingungen ein evtl. vorhandener Einfluss von Lysozym auf die Verteilung von Kryoprotektoren ermittelt werden kann. Die Lysozym-Konzentration liegt bei 0,03 % (m/m), die Konzentration der Kryoprotektoren zwischen 0,005 und 0,03 % (m/m).

#### **4.1.3.4.1 Verteilung von Kryoprotektoren im ATPS aus 10 T HES, 10 T PEG und 80 T Wasser**

Zur spezifischen Bestimmung der Verteilungskoeffizienten von Saccharose, Glycin und Trehalose werden radioaktiv markierte Kryoprotektoren eingesetzt. Diese radioaktiv markierten Kryoprotektoren werden mit nicht aktiven Kryoprotektoren verschnitten, um dadurch die Verteilung von Saccharose, Trehalose und Glycin in einem System aus gleichen Teilen HES und PEG untersuchen zu können. Die für dieses ATPS erhaltenen Verteilungskoeffizienten sind in Abbildung 4-7 dargestellt.

Die Verteilungskoeffizienten liegen im lysozymhaltigen System im Mittel bei  $0,98 \pm 0,013$  für Glycin, bei  $1,10 \pm 0,016$  für Trehalose und bei  $1,12 \pm 0,009$  für Saccharose. Im lysozymfreien System liegen die Verteilungskoeffizienten bei  $0,99 \pm 0,013$  für Glycin, bei  $1,09 \pm 0,01$  für Trehalose und  $1,14 \pm 0,015$  für Saccharose. Die Kurven der Verteilungskoeffizienten der lysozymfreien und lysozymhaltigen Systeme sind nahezu deckungsgleich. An den Messpunkten, an denen dies nicht der Fall ist, überlappen sich die Standardabweichungen, so dass von einem nicht-signifikanten Einfluss von Lysozym auf die Verteilung von Kryoprotektoren ausgegangen werden kann.

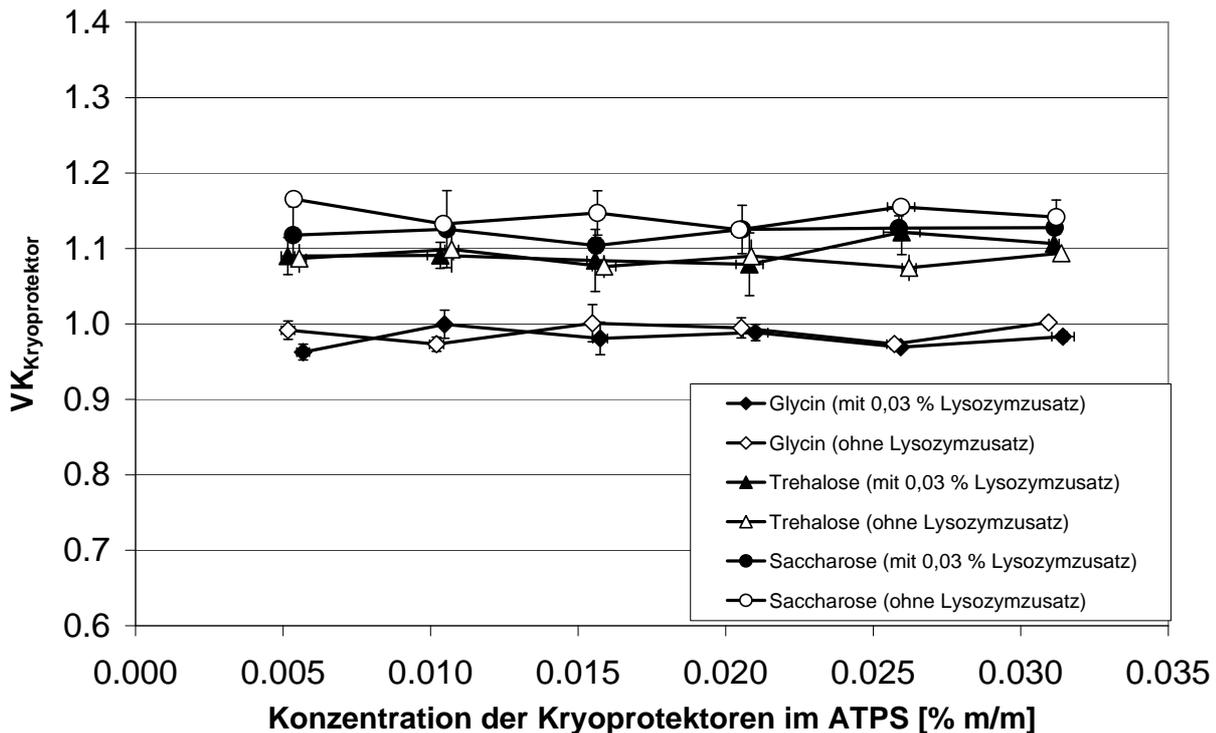


Abbildung 4-7: Verteilungskoeffizienten von Saccharose, Glycin und Trehalose ohne und mit 0,03 % (m/m) Lysozym im ATPS aus 10 T HES, 10 T PEG und 80 T Wasser ( $n = 3$ , Fehlerbalken = Standardabweichung)

Daraus lässt sich ableiten, dass sich Saccharose und Trehalose leicht in der PEG-Phase anreichern. Offensichtlich kommt es durch den Zusatz von Trehalose und Saccharose zu einer Erhöhung der Mischungsentropie des Systems: Da in der PEG-Phase pro Volumeneinheit mehr Moleküle PEG enthalten sind als HES-Moleküle pro Volumeneinheit in der HES-Phase, reichern sich die beiden Zucker zur weiteren Erhöhung der Entropie bevorzugt in der PEG-Phase an. Glycin weist im Gegensatz dazu zu beiden Phasen die gleiche Affinität auf. Dies legt nahe, dass Glycin offenbar nicht in der Lage ist, die Entropie des Systems in dem Maße zu erhöhen wie Saccharose und Trehalose.

#### 4.1.3.4.2 Verteilung von Kryoprotektoren im ATPS aus 1,72 T HES, 17,2 T PEG und 81 T Wasser

Ergänzend zu dem in Kapitel 4.1.3.4.1 beschriebenen Zweiphasensystem soll hier die Verteilung von Kryoprotektoren in einem ATPS untersucht werden, dessen Konzentrationsverhältnisse von HES und PEG an die Mikropartikelherstellung angepasst sind. Abbildung 4-8 zeigt die Verteilungskoeffizienten in Abhängigkeit von der zugesetzten Menge Kryoprotektor. Der

Verteilungskoeffizient liegt im Fall von Glycin um 1, die Verteilungskoeffizienten von Trehalose und Saccharose hingegen sind  $> 1$ , was wiederum auf eine leichte Anreicherung dieser Stoffe in der PEG-Phase hindeutet.

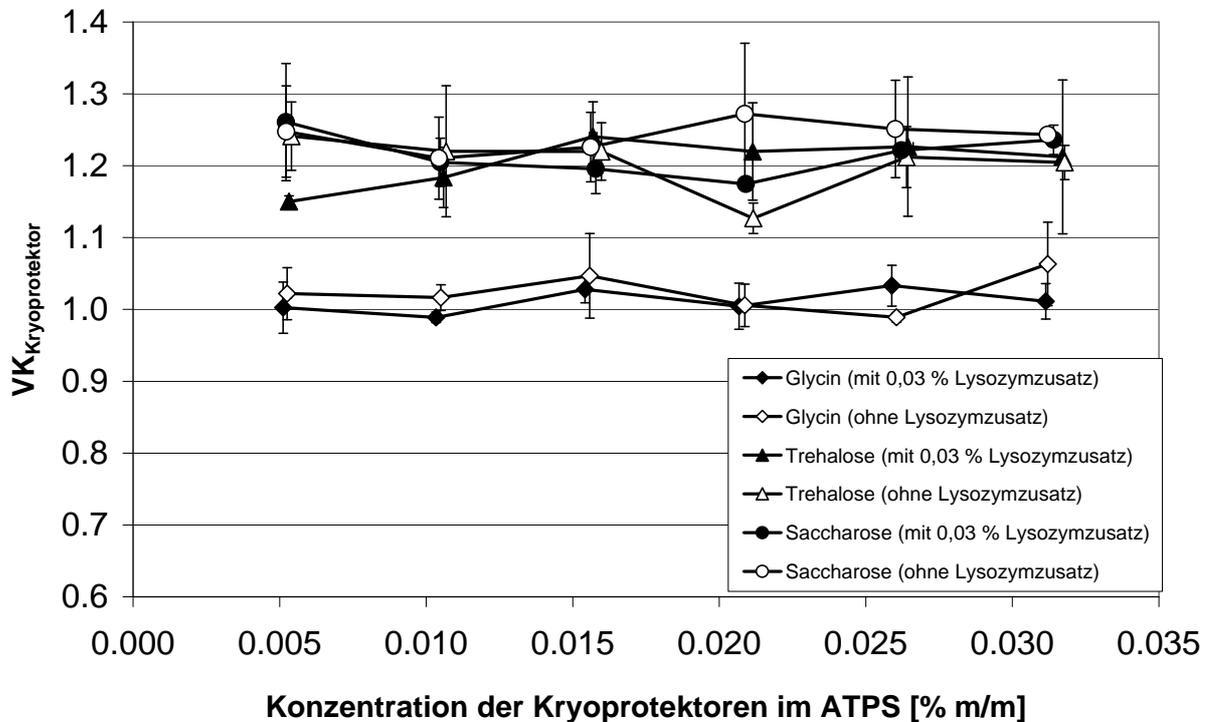


Abbildung 4-8: Verteilungskoeffizienten von Saccharose, Glycin und Trehalose ohne und mit 0,03 % (m/m) Lysozym im ATPS aus 1,72 T HES, 17,2 T PEG und 81 T Wasser ( $n = 3$ , Fehlerbalken = Standardabweichung)

Die Verteilungskoeffizienten sind offensichtlich auch hier nicht von der Menge der zugesetzten Kryoprotektoren abhängig.

Da offenbar die Konzentration keinen Einfluss auf die Verteilungskoeffizienten hat, wird auch hier der durchschnittliche Verteilungskoeffizient für alle eingesetzten Konzentrationen berechnet. Es werden Verteilungskoeffizienten im lysozymhaltigen System von  $1,01 \pm 0,017$  für Glycin,  $1,21 \pm 0,033$  für Trehalose und  $1,22 \pm 0,031$  für Saccharose erhalten. Die Verteilungskoeffizienten im lysozymfreien System betragen für Glycin  $1,02 \pm 0,027$ , für Trehalose  $1,20 \pm 0,040$  und für Saccharose  $1,24 \pm 0,021$ . Auch hier sind die Kurven der Verteilungskoeffizienten bei verschiedenen Konzentrationen an Kryoprotektor zwischen den lysozymfreien und lysozymhaltigen Systemen nahezu deckungsgleich und an den Stellen, an denen dies nicht der Fall ist, überlappen sich die Standardabweichungen. Offensichtlich verteilt sich auch in diesem System, das ein Verhältnis von

PEG zu HES von 10+1 aufweist, Glycin gleichmäßig in beiden Phasen. Saccharose und Trehalose hingegen reichern sich geringfügig in der PEG-Phase an.

Die Verteilungskoeffizienten dieses Versuchs liegen geringfügig über denen des ATPS aus gleichen Teilen HES und PEG (Kapitel 4.1.3.4.1). Dies deutet darauf hin, dass die Erhöhung der Entropie durch Trehalose und Saccharose in einem System mit höherem PEG-Anteil stärkere Auswirkungen auf die Verteilung der Kryoprotektoren hat.

Die in beiden Zweiphasensystemen gewonnenen Daten zur Verteilung der Kryoprotektoren legen nahe, dass Lysozym auf deren Verteilung keinen signifikanten Einfluss besitzt.

#### **4.1.4 Einfluss von Lysozym auf das wässrige Zweiphasensystem**

##### **4.1.4.1 Qualitative Bestimmung der Lysozymverteilung im wässrigen Zweiphasensystem durch Fluoreszenzmikroskopie**

Um die qualitative Verteilung von Lysozym im wässrigen Zweiphasensystem visualisieren zu können, wird in dieser Arbeit die Fluoreszenzmikroskopie eingesetzt.

Im Folgenden werden sowohl mehrdimensionale Bildaufnahmen, bei denen die Durchlichtaufnahmen und die Fluoreszenz-Auflichtaufnahmen überlagert werden, als auch Fluoreszenzauflicht-Aufnahmen des Zweiphasensystems gezeigt, da hierbei die Fluoreszenz-Intensität deutlich besser erkennbar ist.

Abbildung 4-9 und Abbildung 4-10 geben einen Überblick über die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen des wässrigen Zweiphasensystems.

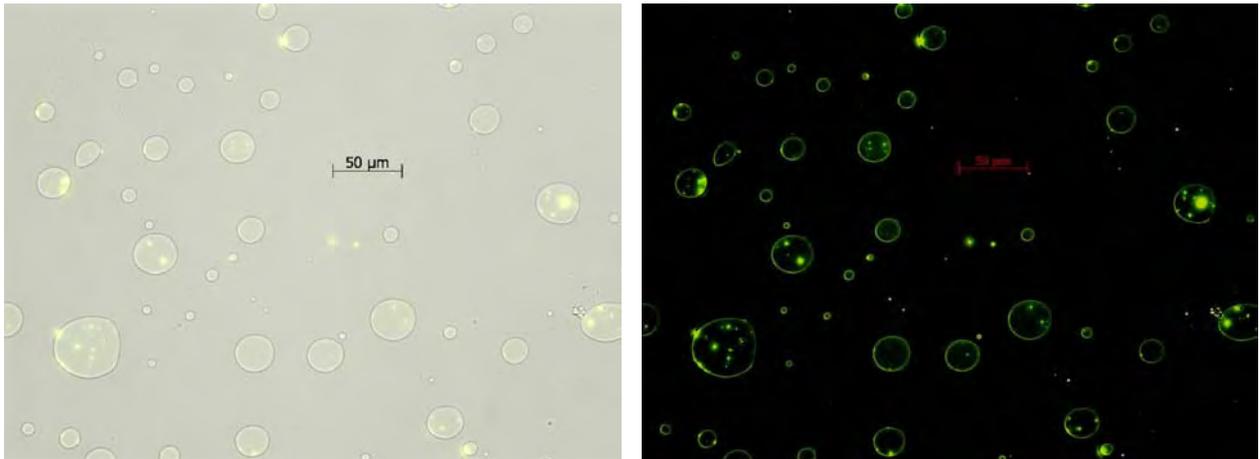


Abbildung 4-9: HES-Tröpfchen im Durchlicht mit überlagertem Fluoreszenz-Auflicht und dasselbe Bild mit Fluoreszenz-Auflicht aufgenommen

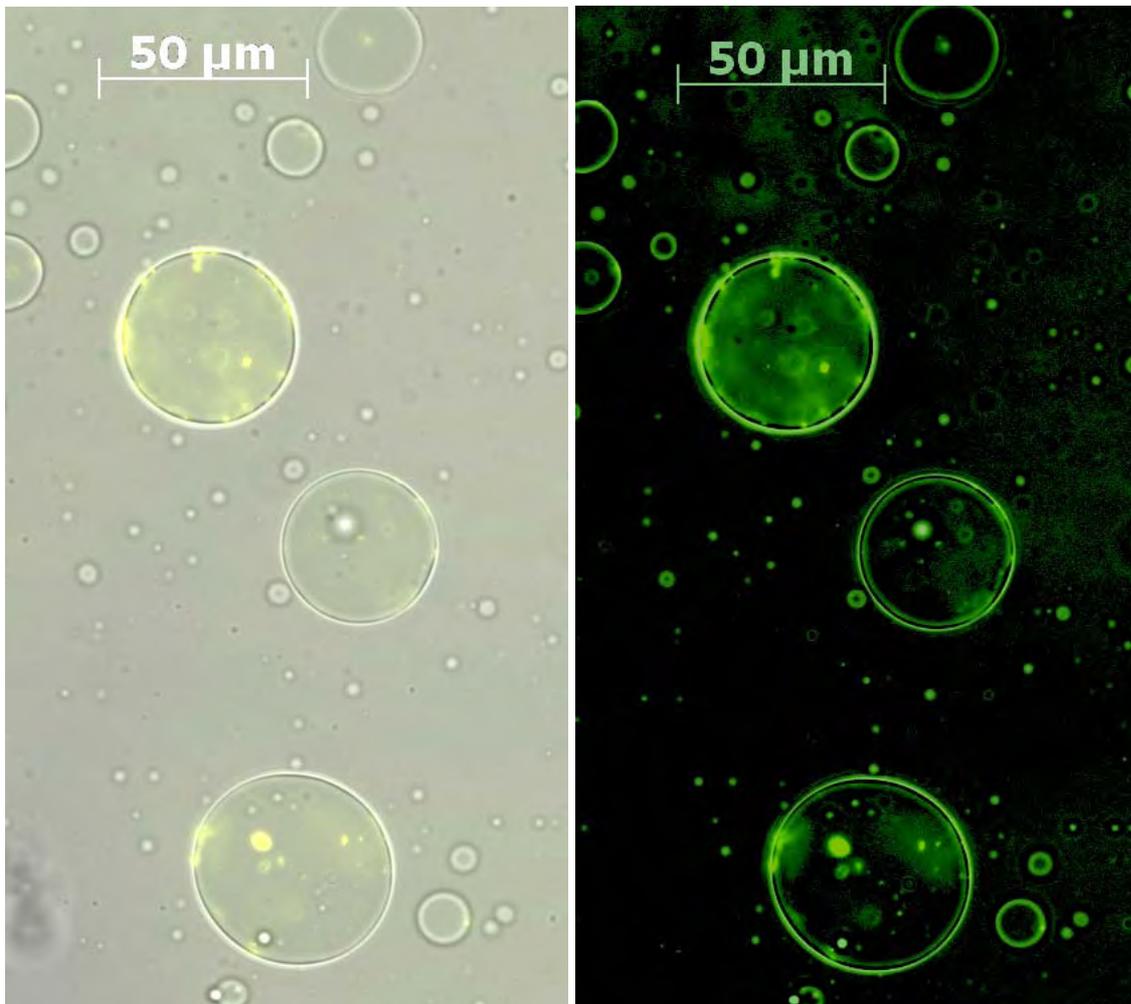


Abbildung 4-10: HES-Tröpfchen im Durchlicht mit überlagertem Fluoreszenz-Auflicht und dasselbe Bild mit Fluoreszenz-Auflicht aufgenommen

Es ist erkennbar, dass Lysozym sowohl gleichmäßig verteilt vorliegt als auch Lysozymagglomerate auf der Oberfläche der HES-Tröpfchen auftreten. Dies zeigt die oberflächenaktiven Eigenschaften von Lysozym, die durch dessen Struktur bedingt sind. Lysozym lagert sich daher auch an der Phasengrenzfläche zwischen der etwas polarerer HES- und der etwas weniger polaren PEG-Phase an. Die Agglomerationsneigung von Lysozym ab einer Konzentration von 0,01 % wurde bereits von Hussein (2007) festgestellt. Weiterhin könnten die Präzipitationsneigung von Lysozym in PEG-Lösungen (Atha et al., 1981) und die schlechte Löslichkeit von Proteinen in Polysaccharidlösungen (Laurent, 1963) Gründe für das hier beobachtete Phänomen der Agglomerationsneigung von Lysozym sein.

#### **4.1.4.2 Quantitative Bestimmung der Verteilungskoeffizienten von Lysozym und Untersuchung des Saccharoseeinflusses**

Für die quantitative Bestimmung der Verteilung von Lysozym in einem wässrigen Zweiphasensystem wird ein ATPS aus 1,72 T HES, 17,2 T PEG und 81 T Wasser ausgewählt, das an die Mikropartikelherstellung angelehnt ist. Weiterhin soll der Einfluss von Saccharose in einem für den Einsatz als Kryoprotektor gebräuchlichen Konzentrationsbereich auf den Verteilungskoeffizienten überprüft werden.

Zur Überprüfung der beiden verwendeten analytischen Methoden werden die in den Proben gefundenen Mengen Lysozym summiert und ins Verhältnis zur eingesetzten Lysozymmenge gesetzt. Dabei erhält man die in Abbildung 4-11 dargestellten Ergebnisse. Die Menge an Lysozym, die im Gesamtsystem gemessen wird, liegt bei beiden Methoden unter einem Wert von 100 %. Die durch ELISA bestimmte wiedergefundene Menge Lysozym im System liegt mit Werten zwischen 69 und 81 % tendentiell unter dem durch Fluorimetrie wiedergefundenen Anteil Lysozym von 72 bis 95 %. Dies kann an der höheren Spezifität des ELISAs oder an der alleinigen Erfassung von nativem Protein liegen. Wird bei der Analytik das Protein strukturell geringfügig verändert, wird es vom ELISA nicht erfasst und es kommt zu geringeren Messwerten. Der wiedergefundene Anteil von Lysozym scheint unabhängig vom Saccharosegehalt zu sein, was sich sowohl bei der Fluorimetrie als auch beim ELISA zeigt.

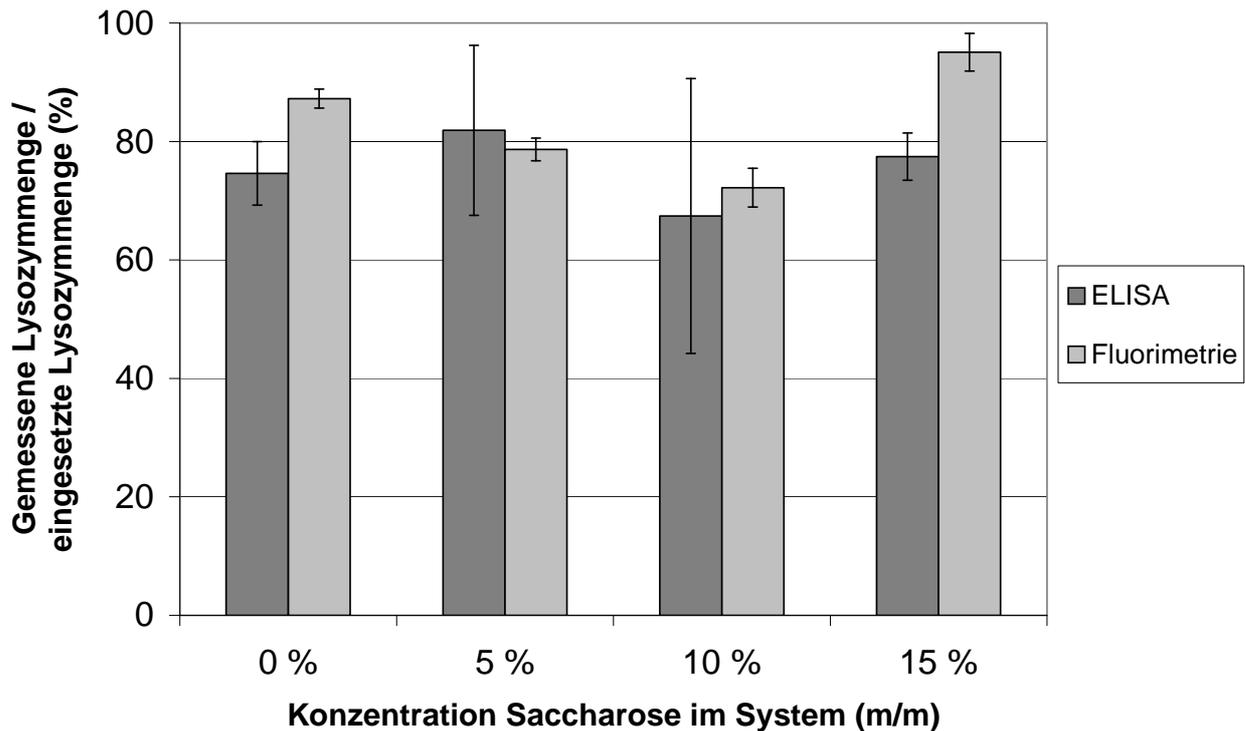


Abbildung 4-11: Anteil der summierten gemessenen Lysozymmenge im Verhältnis zur eingesetzten Lysozymmenge der fluorimetrischen Bestimmung und des ELISAs ( $n = 3$ , Fehlerbalken = Standardabweichung)

Die unvollständige Wiederfindung lässt sich folgendermaßen erklären: Neben der bereits beschriebenen möglichen strukturellen Veränderung des Proteins kommen weiterhin die Adsorption von Lysozym an Kunststoff und eine durch die oberflächenaktiven Eigenschaften von Lysozym bedingte Anreicherung an der Phasengrenze zwischen HES und PEG in Frage. Die beiden letztgenannten Gründe erscheinen in Anbetracht der Tatsache sehr wahrscheinlich, dass Lysozym bereits ab einer Konzentration von 0,01 % agglomeriert (Hussein, 2007). Die Fluoreszenzlysozym-Stammlösung mit einer Konzentration von 0,20 % zeigt bei fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen Agglomerationserscheinungen. Auch nach Verdünnung der Stammlösung sind diese Agglomerate sichtbar. In der Literatur ist außerdem eine starke Präzipitationsneigung von Lysozym in Gegenwart von PEG beschrieben, wobei die Präzipitation mit steigendem PEG-Gehalt linear zunimmt (Atha et al., 1981). Ein weiterer Grund kann die Ausfällung des Proteins in der HES-Phase durch seine schlechtere Löslichkeit sein, was für Proteine in Dextranlösungen von Laurent (1963) bereits beschrieben wird.

Lagern sich einige dieser Agglomerate oder gar Präzipitate an Kunststoffoberflächen oder der Phasengrenzfläche an, kommt es zu einem überproportionalen Verlust von Lysozym und zu einer Reduktion der messbaren Lysozymkonzentration in den Phasen. Der wiedergefundene Anteil liegt somit unter 100 %. Im Weiteren wird auf die Verteilung von Lysozym in der HES- und der PEG-Phase im Detail eingegangen.

Abbildung 4-12 zeigt die fluorimetrisch bestimmten Konzentrationen von Lysozym in der HES- und in der PEG-Phase in Abhängigkeit des Saccharosegehaltes. Die Lysozymkonzentration in der PEG-Phase liegt zwischen 1,5 und 2,3  $\mu\text{g/ml}$ . Die berechnete Konzentration an Lysozym in der HES-Phase ist mit Werten zwischen 69 und 87  $\mu\text{g/ml}$  deutlich größer.

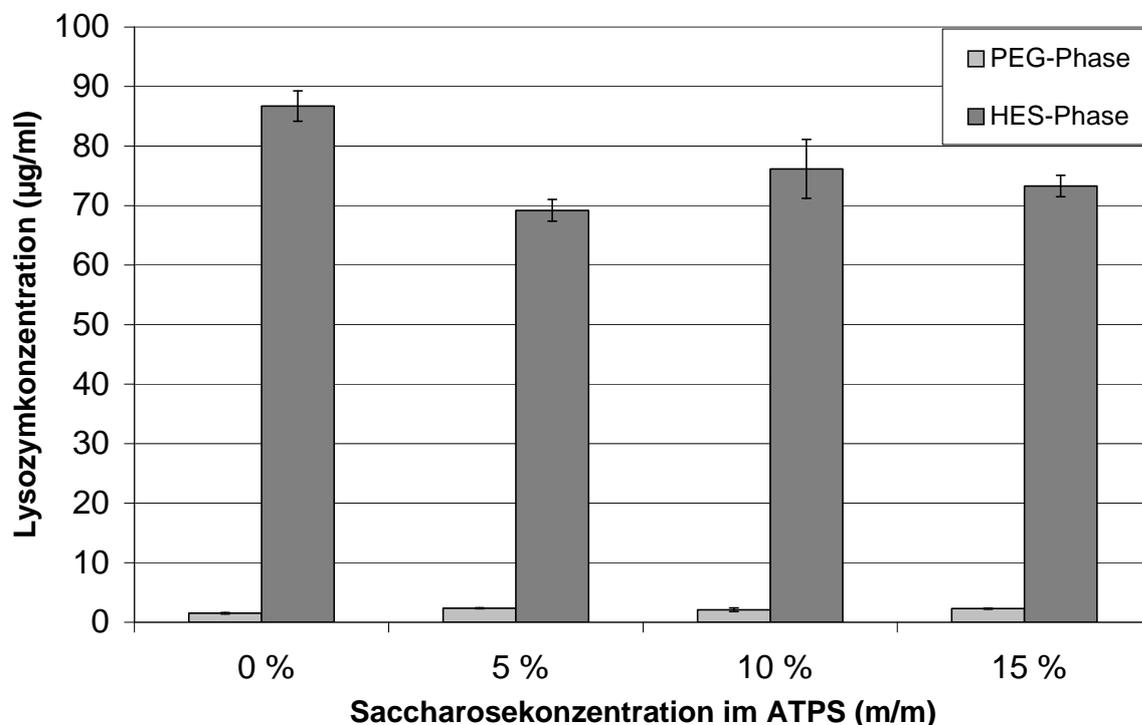


Abbildung 4-12: Lysozymkonzentration in der HES- und der PEG-Phase in Abhängigkeit von der Saccharosekonzentration, bestimmt durch fluorimetrische Messung ( $n = 3$ , Fehlerbalken = Standardabweichung)

Die Ergebnisse, die durch den ELISA erhalten werden, sind denen der fluorimetrischen Messung sehr ähnlich. In der HES-Phase werden, je nach Saccharosegehalt, Konzentrationen zwischen 52 und 63  $\mu\text{g/ml}$  und in der PEG-Phase zwischen 1,3 und 1,6  $\mu\text{g/ml}$  gemessen. Die Konzentrationen der HES- und der PEG-Phase sind in Abbildung 4-13 vergleichend dargestellt.

Die mit Hilfe des ELISAs bestimmten Ergebnisse liegen geringfügig unter denen der fluorimetrischen Messung. Dies kann an der größeren Spezifität des ELISAs zur Detektion von Proteinen im Vergleich zur fluorimetrischen Messung oder an der Erfassung von ausschließlich nativem Protein liegen (Crowther, 1995).

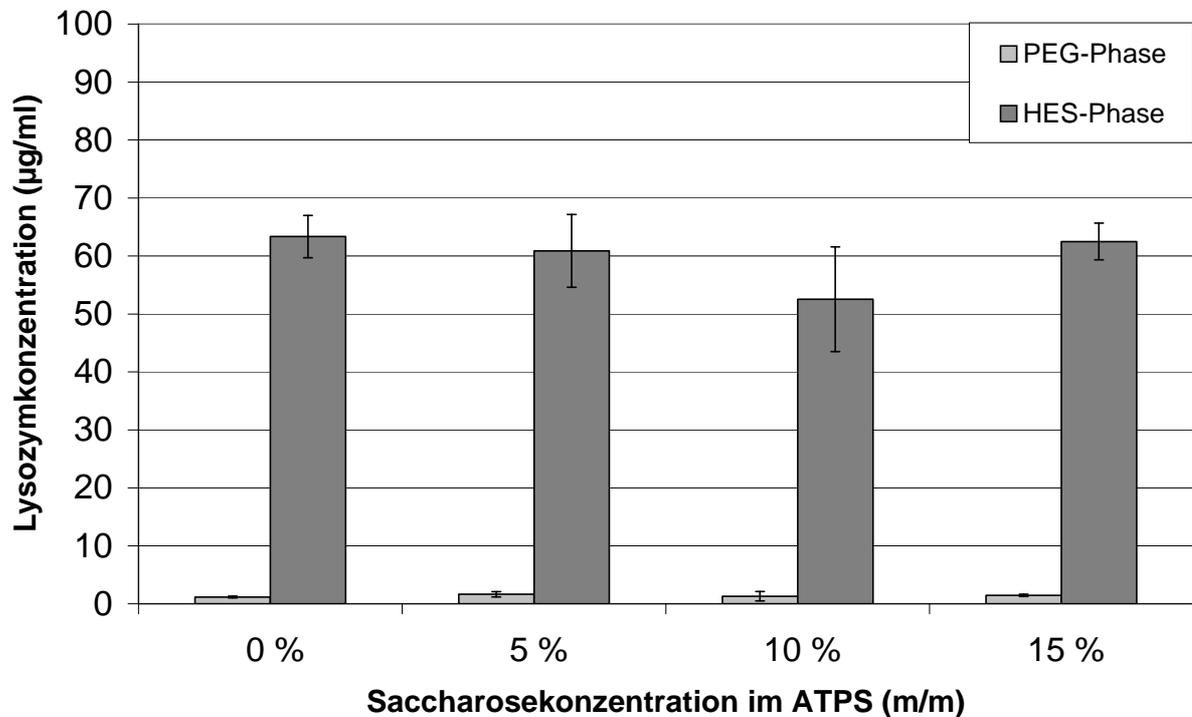


Abbildung 4-13: Lysozymkonzentration in der HES- und der PEG-Phase in Abhängigkeit von der Saccharosekonzentration, bestimmt durch ELISA  
( $n = 3$ , Fehlerbalken = Standardabweichung),

Anhand dieser Daten ist es möglich, den Verteilungskoeffizienten von Lysozym ( $VK_{\text{Lysozym}}$ ) zu berechnen (Gleichung 4-4).

$$VK_{\text{Lysozym}} = \frac{C_{\text{Lysozym in der PEG-Phase}}}{C_{\text{Lysozym in der HES-Phase}}} \quad \text{Gleichung 4-4}$$

$VK_{\text{Lysozym}}$  Verteilungskoeffizient von Lysozym  
 $C$  Konzentration

Der durch die fluorimetrische Messung erhaltene Verteilungskoeffizient im saccharosefreien System liegt bei ca.  $0,0176 \pm 0,0018$ , wohingegen die Verteilungskoeffizienten in den saccharosehaltigen Systemen zwischen  $0,028 \pm 0,0057$  und  $0,034 \pm 0,0021$  schwanken.

Die durch ELISA gemessenen Werte liegen in einer sehr ähnlichen Größenordnung wie die durch Fluorimetrie gemessenen Werte. Auch hier zeigt sich eine deutlich geringere Lysozym-Konzentration in der PEG- als in der HES-Phase. Im saccharosefreien System wird ein Verteilungskoeffizient von  $0,018 \pm 0,002$  bestimmt; in den saccharosefreien Systemen schwanken die Verteilungskoeffizienten zwischen  $0,023 \pm 0,003$  und  $0,032 \pm 0,007$ . Die Anreicherung in der HES-Phase im saccharosefreien System beträgt ungefähr das 60-fache gegenüber der PEG-Phase, während die Anreicherung in der HES-Phase im saccharosehaltigen System zwischen dem 30 - 40-fachen der PEG-Phase schwankt.

Eine vergleichende Darstellung der Ergebnisse des ELISA und der fluorimetrischen Messung ist in Abbildung 4-14 gezeigt.

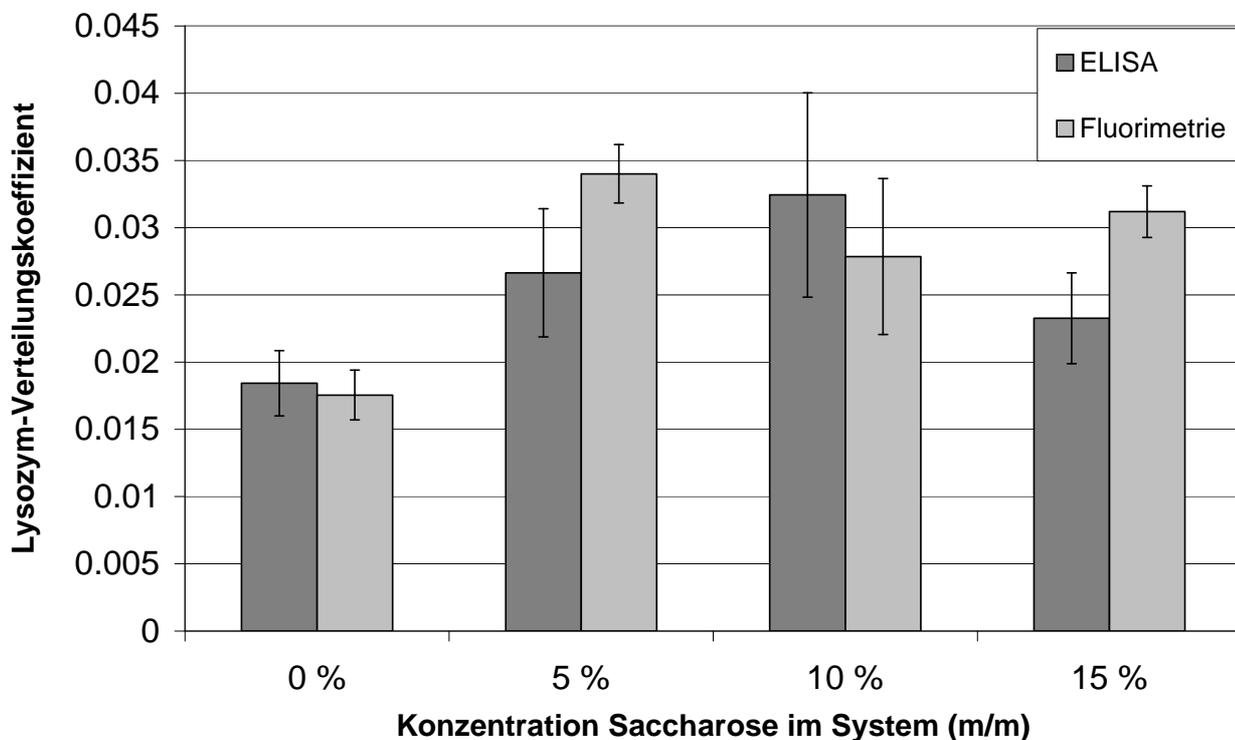


Abbildung 4-14: Verteilungskoeffizient von Lysozym in Abhängigkeit vom Saccharosegehalt, Vergleich der fluorimetrischen Messung und ELISA  
( $n = 3$ , Fehlerbalken = Standardabweichung)

Die Verteilungskoeffizienten des saccharosefreien Systems sind, unabhängig von der Messmethode, etwa halb so groß wie die der saccharosehaltigen Systeme. Die Saccharosekonzentration scheint dabei von untergeordneter Bedeutung zu sein. Es ist kein Trend in Abhängigkeit von der

---

Saccharosekonzentration zu beobachten. Somit ist der Verteilungskoeffizient lediglich davon abhängig, ob Saccharose im System vorhanden ist.

Eine Erklärungsmöglichkeit für dieses Phänomen ist, dass Saccharose in der Lage ist, die Polarität des Systems so zu erhöhen, dass Lysozym als eher unpolares Protein eine geringere Affinität zur HES-Phase aufweist als im saccharosefreien System. Eine weitere Ursache könnte eine durch Saccharose bedingte Konformationsänderung des Proteins sein, die dazu führt, dass das Protein hydrophober wird. Dadurch verteilt es sich besser in der hydrophoberen PEG-Phase und die Konzentration des Lysozyms in der HES-Phase sinkt. Dies wird für ein ATPS aus Dextran, PEG und hGH als Modellprotein in der Literatur bereits beschrieben (Vlugt-Wensink et al., 2007).

Alle in dieser Arbeit bestimmten Verteilungskoeffizienten sind deutlich niedriger als der Lysozym-Verteilungskoeffizient in einem aus Dextran und PEG bestehenden ATPS. Beispielsweise fanden Shanbhag & Axelsson (1975) einen Lysozym-Verteilungskoeffizienten von ca. 0,56 und Johansson (1974) einen Koeffizienten von 0,79. Dieser signifikante Unterschied der Literaturdaten zu den in dieser Arbeit erhaltenen Verteilungskoeffizienten kann mit der erniedrigten Hydrophilie von HES im Vergleich zu Dextran erklärt werden. Lysozym als relativ unpolares Protein besitzt somit eine deutlich höhere Affinität zu HES als zu Dextran. Es kann deshalb davon ausgegangen werden, dass das ATPS aus HES und PEG für die Verarbeitung unpolarer Proteine vorteilhafter ist als ein ATPS aus Dextran und PEG.

Die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse verdeutlichen, dass im untersuchten ATPS eine starke Anreicherung von Lysozym in der HES-Phase erfolgt, was durch beide verwendeten Methoden unabhängig voneinander gezeigt werden konnte. Weiterhin kann mit diesen Ergebnissen sowohl nachgewiesen werden, dass die Fluoreszenzmarkierung auf das Verhalten von Lysozym im Zweiphasensystem aus HES und PEG keinen Einfluss hat, als auch, dass menschliches Lysozym und Lysozym aus Hühnereiweiß ein ähnliches Verhalten im untersuchten ATPS aufweisen. Dies kann durch die nahezu deckungsgleichen Ergebnisse der fluorimetrischen Messung und des ELISAs belegt werden.

## **4.2 HES-Mikropartikel**

Für die Herstellung von Mikropartikeln wird das bisher beschriebene Zweiphasensystem aus HES und PEG dahingehend modifiziert, dass HES-HEMA anstelle von HES eingesetzt wird. Durch die

im HES-HEMA enthaltenen quervernetzbaaren Seitenketten werden Mikropartikel durch eine Photopolymerisationsreaktion hergestellt.

Von den erhaltenen Mikropartikeln werden die Partikelgröße, die Einschussrate und die Freisetzung der beiden Modellsubstanzen Lysozym und FITC-Dextran untersucht sowie licht-, fluoreszenz- und elektronenmikroskopische Aufnahmen angefertigt. Dadurch sollen sowohl der Einfluss des Substitutionsgrades von HES-HEMA als auch – am Beispiel der Saccharose – der Einfluss von Kryoprotektoren auf die Mikropartikel-Eigenschaften untersucht werden.

#### **4.2.1 Mikropartikel-Auswaage und -Ausbeute**

Die Auswaage an Mikropartikeln und deren Faktoren im Bezug auf saccharosefreie Mikropartikel sind für alle weiteren Versuche von großer Bedeutung. Die Daten werden dahingehend genutzt, dass die Einwaage saccharosehaltiger Mikropartikel in Bezug zu den saccharosefreien Mikropartikeln berechnet werden kann und damit immer mit der gleichen Wirkstoffmenge pro Versuchsansatz gearbeitet werden kann. So ist es möglich, die Ergebnisse miteinander zu vergleichen und den Einfluss von Saccharose auf alle untersuchten Parameter bestimmen zu können.

Die Ausbeute an saccharosefreien Mikropartikeln beträgt ca. 90 mg und steigt gleichmäßig mit zunehmendem Saccharosegehalt bis zu einer Auswaage von ca. 500 mg bei den mit 15 % Saccharose beladenen Mikropartikeln an.

Die erhaltene Menge Mikropartikel ist bei allen Chargen mit gleicher Rezeptur sehr ähnlich. Bei allen Rezepturen ist die Standardabweichung zwischen den jeweils drei hergestellten Chargen pro Rezeptur kleiner als 5 %, so dass der Herstellungsprozess im Bezug auf die Auswaage als robust und reproduzierbar angesehen werden kann (Tabelle 4-3). Weiterhin ist in Tabelle 4-3 der prozentuale Anteil Saccharose – bezogen auf die Masse der saccharosefreien Mikropartikel – angegeben, der in den Mikropartikeln eingebettet oder aufgelagert vorliegt. Die Masse an eingebetteter und aufgelagerter Saccharose ist in allen Fällen deutlich größer als die Masse der saccharosefreien Mikropartikelmatrix.

*Tabelle 4-3: Erhaltene Menge Mikropartikel und Faktoren zu saccharosefreien Mikropartikeln der hergestellten Mikropartikel-Chargen (n = 3)*

<b>Charge</b>	<b>Mittelwert der erhaltenen Menge Mikropartikel [mg]</b>	<b>Standardabweichung [mg]</b>	<b>Faktor zu saccharosefreien Mikropartikeln</b>	<b>Anteil Saccharose in den Mikropartikeln (bezogen auf die Masse saccharosefreier Mikropartikel) [%]</b>
1,5_Lys_0%Saccharose	87,40	1,87	1	-
7,8_Lys_0%Saccharose	89,83	1,36	1	-
1,5_Lys_10%Saccharose	328,73	2,77	3,76	276,1
7,8_Lys_10%Saccharose	331,10	6,35	3,69	268,6
1,5_FITC_0%Saccharose	86,87	4,24	1	-
7,8_FITC_0%Saccharose	92,03	1,89	1	-
1,5_FITC_5%Saccharose	218,23	3,29	2,51	151,2
7,8_FITC_5%Saccharose	225,37	6,79	2,45	144,9
1,5_FITC_10%Saccharose	354,65	5,73	4,08	308,3
7,8_FITC_10%Saccharose	356,60	2,99	3,87	287,5
1,5_FITC_15%Saccharose	497,23	2,50	5,72	472,4
7,8_FITC_15%Saccharose	500,57	7,75	5,44	443,9

Erwartungsgemäß ist die Auswaage an Mikropartikeln umso größer, je höher der Saccharosegehalt ist. Die Faktoren bezogen auf die saccharosefreien Mikropartikel nehmen mit steigendem Saccharosegehalt linear zu, was in Abbildung 4-15 am Beispiel von FITC-Dextran-haltigen Mikropartikeln gezeigt wird. Bezüglich der Ausbeute ist kein Unterschied zwischen den beiden Substitutionsgraden von 1,5 und 7,8 zu erkennen.

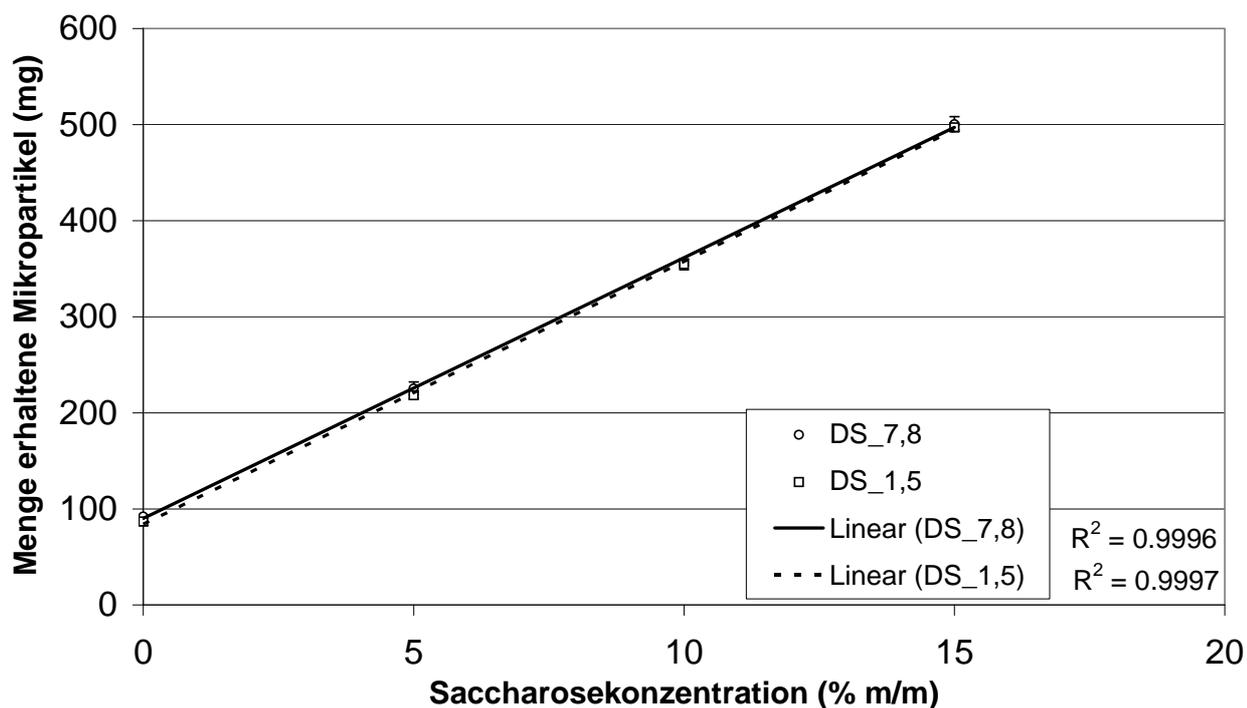


Abbildung 4-15: Auswaage an Mikropartikeln nach der Herstellung in Abhängigkeit vom Saccharosegehalt am Beispiel von FITC-Dextran-haltigen Mikropartikeln ( $n = 3$ , Fehlerbalken = Standardabweichung)

Bezieht man die in Tabelle 4-3 aufgeführten Auswaagen der saccharosefreien Mikropartikel auf die eingesetzte Menge HES-HEMA und den Wirkstoff (120,33 mg) erhält man die prozentuale Ausbeute der Mikropartikel. Die Ausbeute beträgt für lysozymhaltige Mikropartikel  $72,63 \% \pm 1,55 \%$  bzw.  $74,66 \pm 1,13 \%$  (DS 1,5 bzw. DS 7,8) und für FITC-Dextran-haltige Mikropartikel  $72,19 \pm 3,52 \%$  bzw.  $76,48 \pm 1,57 \%$  (DS 1,5 bzw. DS 7,8). Die nicht 100 %ige Ausbeute ist mit einer unvollständigen Polymerisation und Verlusten bei der Herstellung zu erklären. Die Bestimmung der Ausbeute von saccharosehaltigen Mikropartikeln ist aufgrund der unbekanntem eingebetteten Saccharosemenge – und damit der unbekanntem theoretischen Auswaage der Mikropartikel – nicht möglich.

## 4.2.2 Morphologie und Partikelgröße der Mikropartikel

### 4.2.2.1 Durchlicht-Mikroskopie

#### 4.2.2.1.1 Saccharosefreie Mikropartikel

Lichtmikroskopische Aufnahmen der Mikropartikel geben einen ersten Eindruck über deren Größe. In Abbildung 4-16 sind saccharosefreie Mikropartikel mit einer Größe zwischen 5 und 30  $\mu\text{m}$  zu erkennen. Nahezu alle Mikropartikel liegen einzeln vor, es sind kaum Agglomerate zu erkennen. Bei den weiterhin sichtbaren Fragmenten handelt es sich um HES-HEMA-Anteile, die zum Zeitpunkt des Polymerisationsvorgangs nicht als Tröpfchen vorliegen und ebenfalls quervernetzt werden. Dies kann im Herstellungsprozess nicht vollständig vermieden werden.

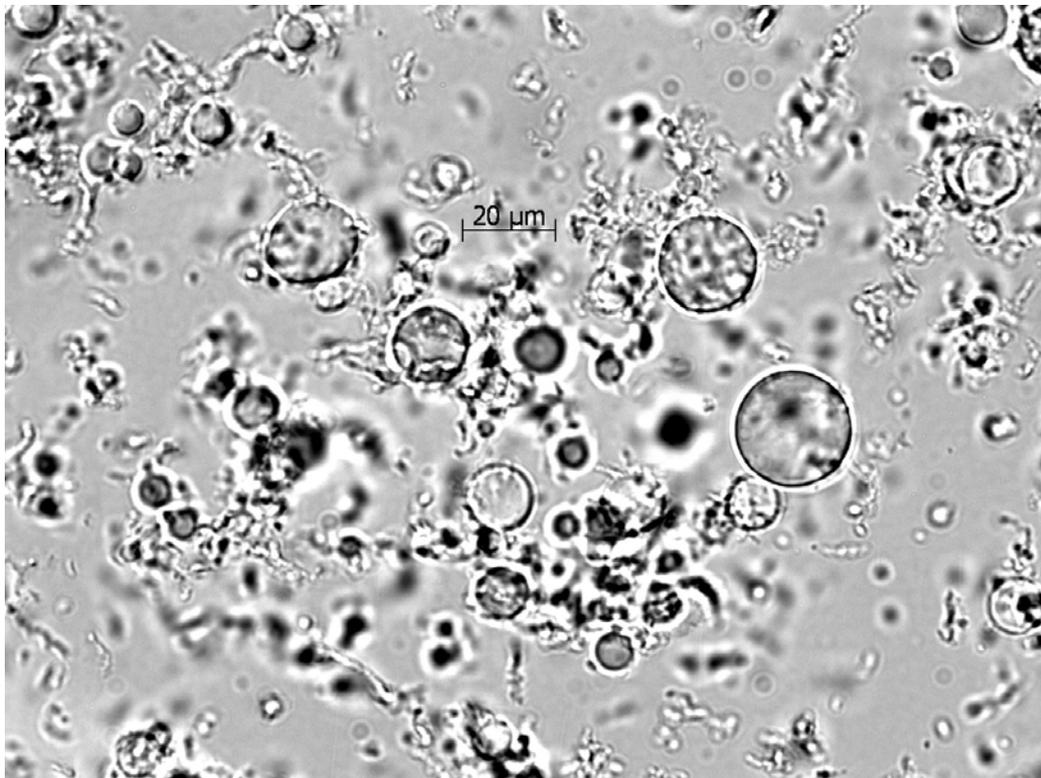
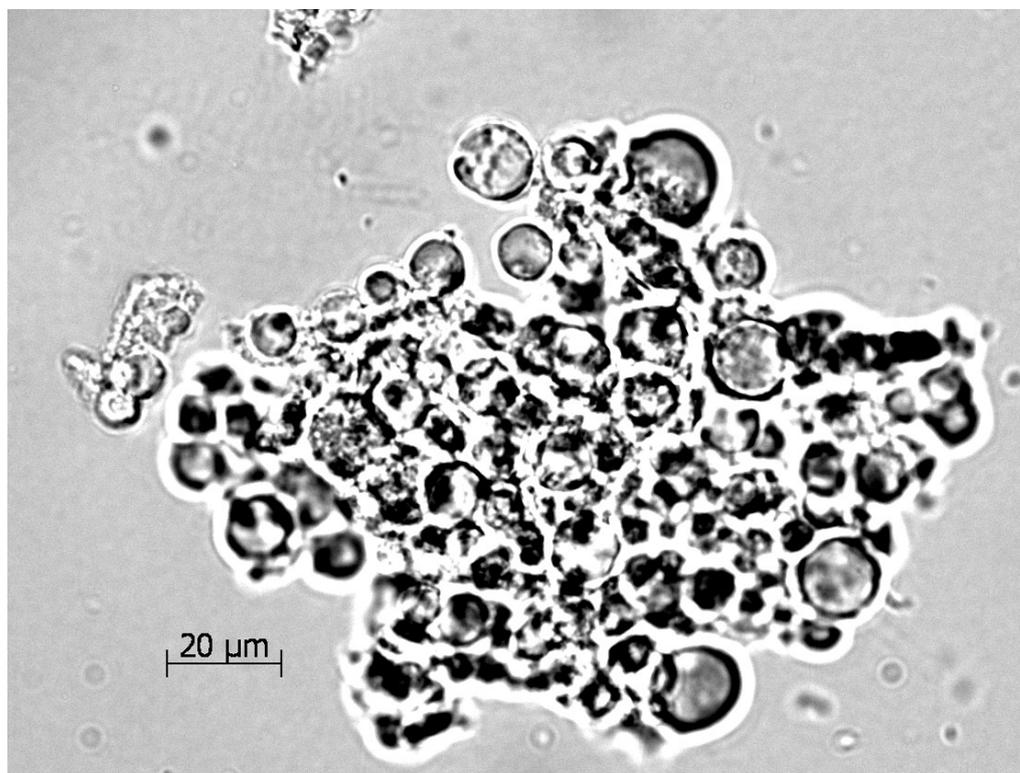


Abbildung 4-16: Durchlichtaufnahme saccharosefreier, nahezu frei vorliegender Mikropartikel

#### 4.2.2.1.2 Saccharosehaltige Mikropartikel

In Abbildung 4-17 sind saccharosehaltige Mikropartikel (5 % Saccharose) in einer durchlichtmikroskopischen Aufnahme dargestellt. Die Partikelgröße der primären Mikropartikel liegt mit ca. 5 bis 30  $\mu\text{m}$  in einem ähnlichen Bereich wie die der saccharosefreien Mikropartikel. Anders als bei den saccharosefreien Mikropartikeln liegen hier jedoch die Partikel nicht einzeln, sondern als große

Aggregate vor. Diese Aggregate können weder durch Dispergierung in Wasser noch durch intensives Rühren oder Ultraschall getrennt werden.



*Abbildung 4-17: Mikroskopische Aufnahme von nicht dispergierbaren Aggregaten saccharosehaltiger (5 %) Mikropartikel*

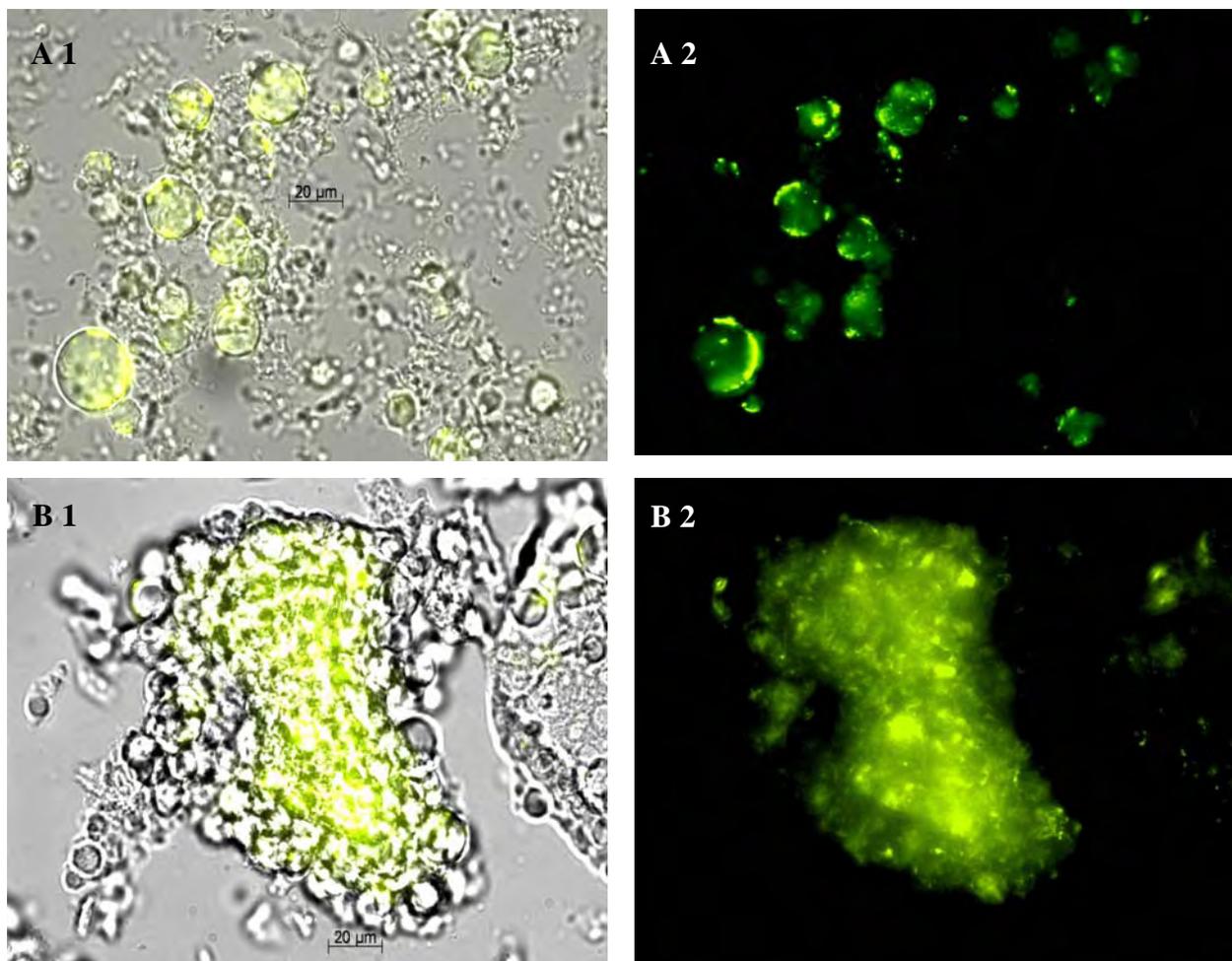
#### **4.2.2.2 Fluoreszenz-Mikroskopie**

Die Fluoreszenzmikroskopie wird in dieser Arbeit eingesetzt, um die qualitative Verteilung von Lysozym und FITC-Dextran in und auf den Mikropartikeln visualisieren zu können.

Es werden mehrdimensionale Bildaufnahmen dargestellt, bei denen die Durchlichtaufnahmen und die Fluoreszenz-Auflichtaufnahmen überlagert werden. Weiterhin werden Fluoreszenzauflicht-Aufnahmen der Mikropartikel gezeigt, da hierbei die Fluoreszenz-Intensität deutlich besser zu erkennen ist.

Abbildung 4-18 A1 und A2 zeigen fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der mit Fluoreszenz-Lysozym beladenen saccharosefreien Mikropartikel, während Abbildung 4-18 B1 und B2 die saccharosehaltigen Mikropartikel (10 % Saccharose) zeigen. Dabei fällt auf, dass die

saccharosefreien Mikropartikel frei vorliegen, die saccharosehaltigen Mikropartikel hingegen große Aggregate bilden.



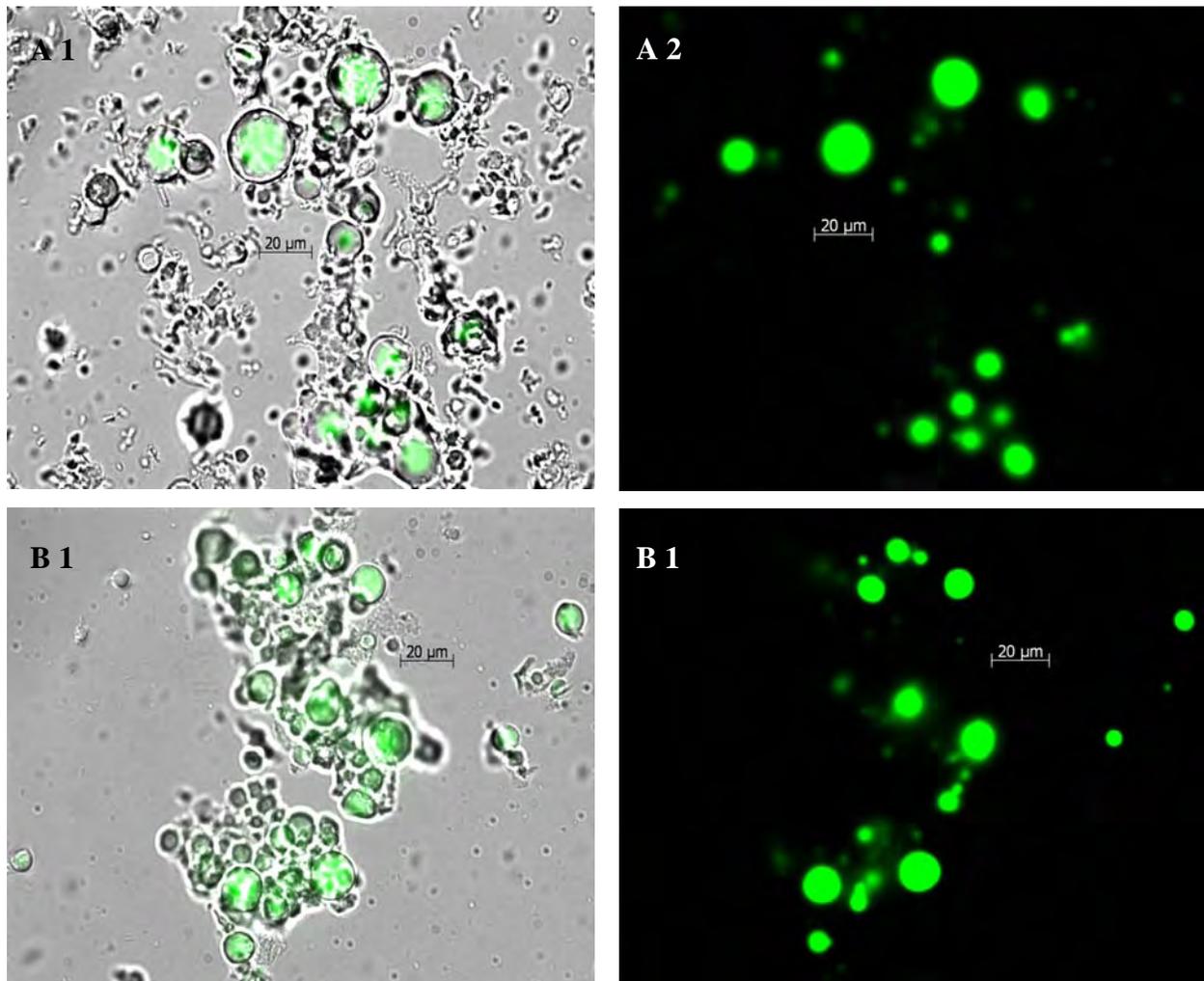
*Abbildung 4-18: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von mit Fluoreszenz-Lysozym beladenen saccharosefreien (A1 und A2) und saccharosehaltigen (10 %) Mikropartikeln (B1 und B2)*

*(links: mehrdimensionale Bildaufnahme mit der Überlagerung von Auflicht und Durchlicht; rechts: Auflichtaufnahme)*

Die fluoreszenzmikroskopischen Bilder der Mikropartikel zeigen, dass das Fluoreszenz-Lysozym zum Teil gleichmäßig auf den Mikropartikeln verteilt ist, ein Teil des Lysozyms jedoch agglomeriert vorliegt. Die punktuelle Verteilung kann mit einer erhöhten Agglomerationsneigung von hochkonzentrierten Proteinlösungen erklärt werden. In Vorversuchen wird bereits festgestellt, dass die Lysozym-Ausgangslösung ebenfalls zur Agglomeration neigt.

Auffällig an den Bildern ist, dass im Fall der saccharosefreien Mikropartikel nahezu alle Mikropartikel mit Fluoreszenz-Lysozym beladen sind, wohingegen nur ein Teil der saccharosehaltigen Mikropartikel mit Fluoreszenz-Lysozym beladen zu sein scheint. Die Fluoreszenz im mittleren Teil des Aggregates ist sehr stark ausgeprägt, an den Rändern und einzeln vorliegende Mikropartikel fluoreszieren jedoch scheinbar nicht. Vermutlich ist dies mit der starken Wasserstoffbrückenbindung von Lysozym und Saccharose erklärbar. Das Innere des Aggregates enthält einen hohen Saccharoseanteil. In diesem Bereich reichert sich Lysozym vorrangig an, so dass es zu einer starken Fluoreszenz kommt. In den saccharosearmen oder -freien Bereichen erfolgt jedoch ebenfalls eine Beladung mit Lysozym, wie anhand der saccharosefreien Mikropartikel gezeigt werden kann. Phototechnisch bedingt kommt es beim stärkeren Hervorheben der Fluoreszenz der hier unterbelichteten Bereiche der scheinbar unbeladenen Mikropartikel zu einer vollständigen Überstrahlung des Bildes, so dass hier bezüglich der Belichtungsintensität und -dauer der Probe ein Kompromiss gefunden werden muss.

Ein anderes Bild zeigen die mit FITC-Dextran beladenen Mikropartikel (Abbildung 4-19). Hier kommt es sowohl bei den saccharosefreien als auch bei den saccharosehaltigen Mikropartikeln zu einer homogenen Verteilung des FITC-Dextrans. Weiterhin wird hier das FITC-Dextran sowohl in den saccharosehaltigen als auch in den saccharosefreien Mikropartikeln gleichmäßig verteilt. Hier zeigt sich besonders in den Auflichtaufnahmen eine gleichmäßige Verteilung des FITC-Dextrans. Es tritt im Gegensatz zu Lysozym keine Agglomerationsneigung des Fluorophors auf. Die Aggregationsneigung der saccharosehaltigen Mikropartikel ist jedoch auch hier deutlich zu erkennen.



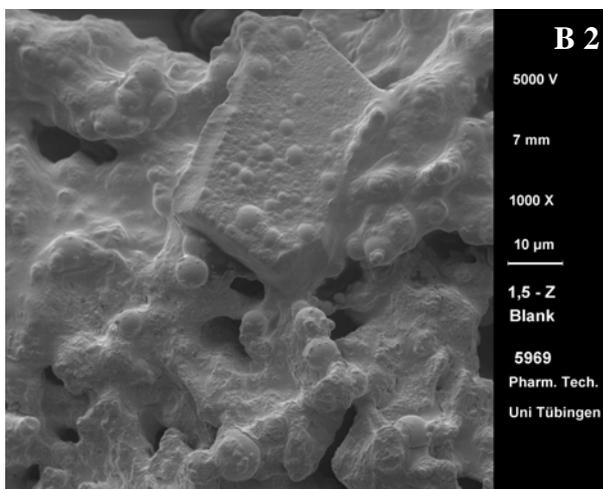
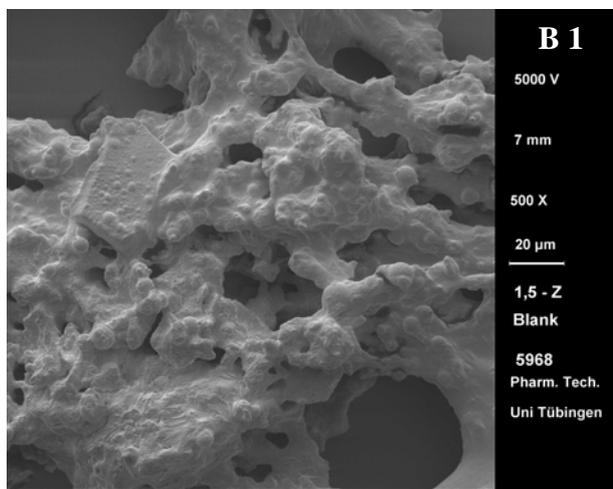
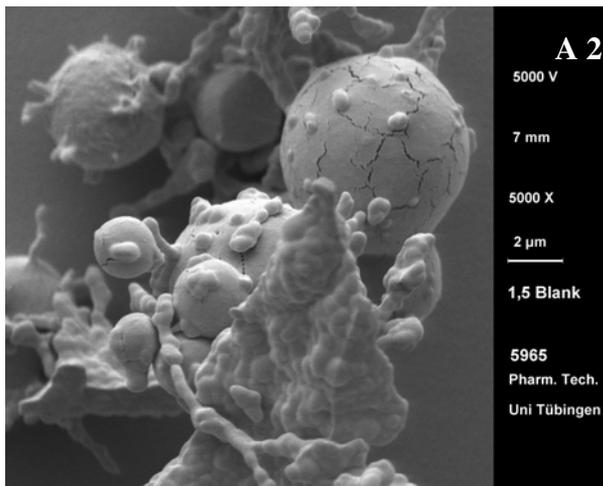
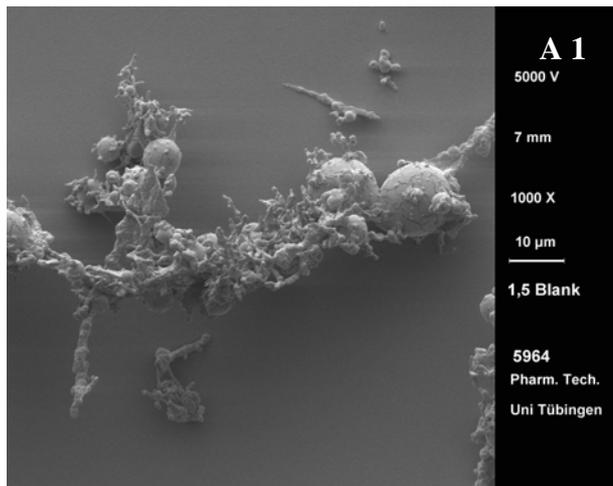
*Abbildung 4-19: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von mit FITC-Dextran beladenen saccharosefreien (A1 und A2) und saccharosehaltigen (10 %) Mikropartikeln (B1 und B2)*  
*(links: mehrdimensionale Bildaufnahme mit der Überlagerung von Auflicht und Durchlicht; rechts: Auflichtaufnahme)*

#### 4.2.2.3 Rasterelektronen-Mikroskopie

Es wurden Rasterelektronische Aufnahmen der saccharosefreien und der saccharosehaltigen (10 % Saccharose) Mikropartikel angefertigt. Es wird untersucht, ob sich die mikroskopischen Bilder der mit Lysozym beladenen und der unbeladenen Partikel unterscheiden. Wie sich in den Bildern (Abbildung 4-20 A-D und Abbildung 4-21 A-D) erkennen lässt, gibt es einige Unterschiede zwischen den einzelnen Chargen. Die Bilder der saccharosefreien Mikropartikelchargen zeigen zum großen Teil freiliegende Mikropartikel in einer Größenordnung zwischen 1 und 20 µm. Anders sieht jedoch das Bild der saccharosehaltigen Mikropartikel aus. Hier ist deutlich zu erkennen, dass die

Mikropartikel durch die Saccharose fest miteinander verbunden sind (Aggregatbildung). Einzeln liegende Mikropartikel sind kaum zu sehen und die Mikropartikel sind mit einer Zuckerschicht überzogen. Weiterhin erkennt man plättchenförmige Gebilde, die von der Kristallstruktur der Saccharose kommen könnten.

Es ist kein Unterschied der mit Lysozym beladenen und der unbeladenen Mikropartikel zu erkennen.



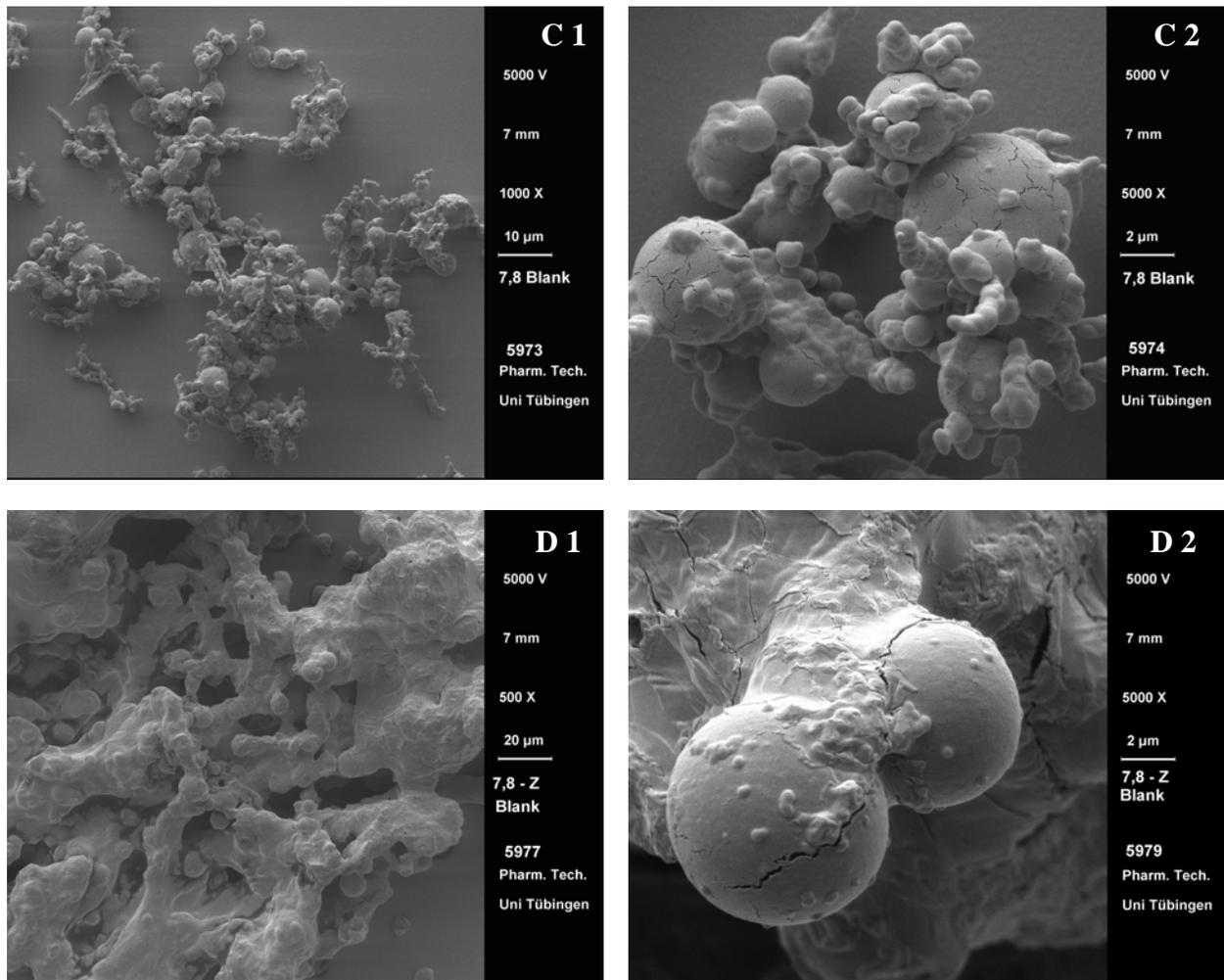
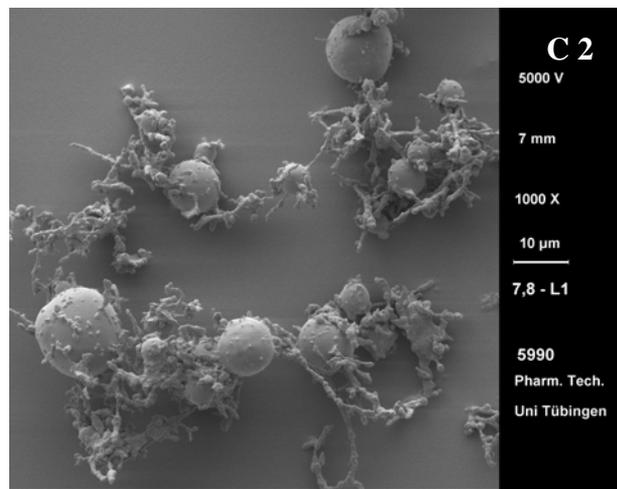
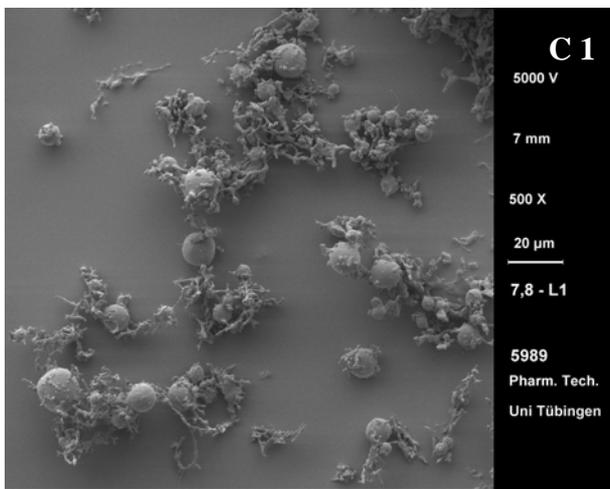
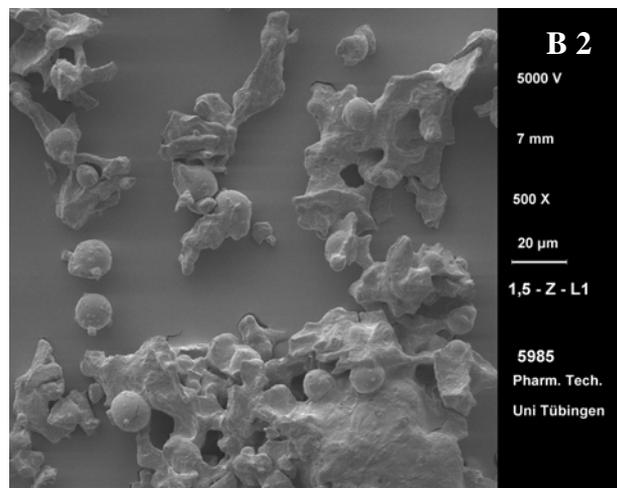
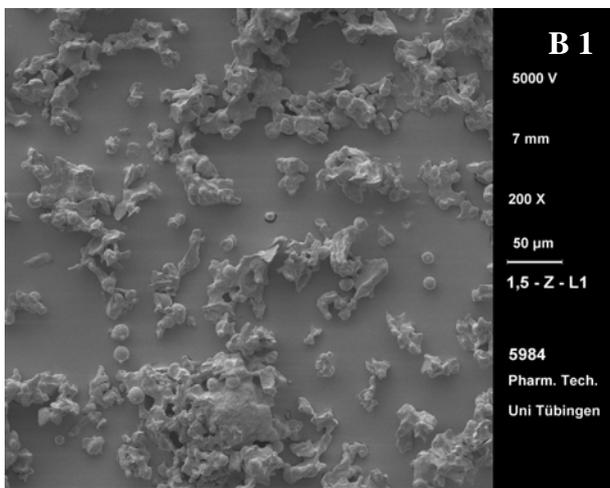
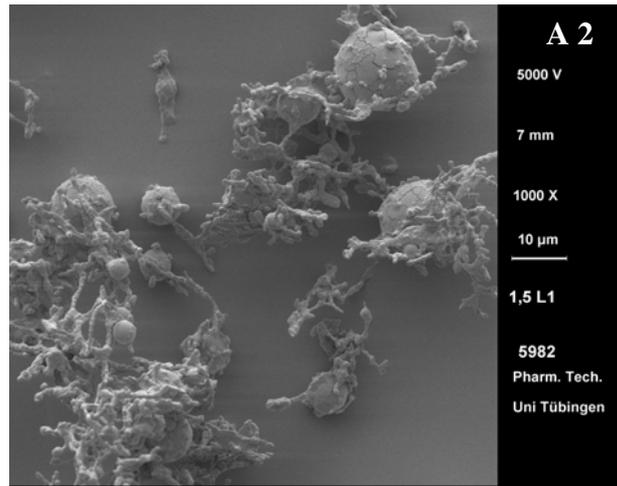
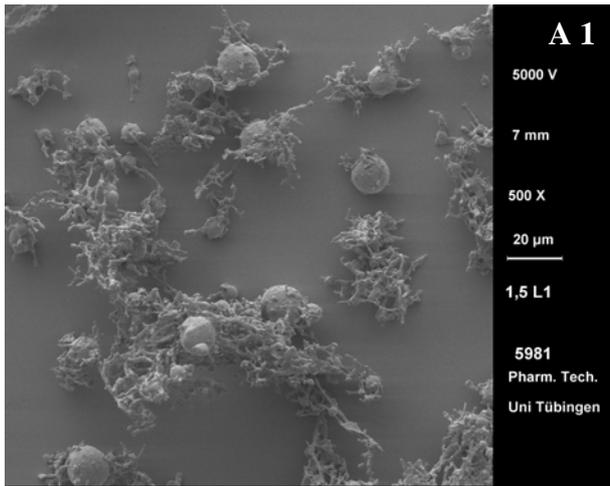


Abbildung 4-20: Übersicht der REM-Bilder der unbeladenen Mikropartikel  
 A1-A2: saccharosefreie Mikropartikel,  $DS = 1,5$   
 B1-B2: saccharosehaltige Mikropartikel (10 %),  $DS = 1,5$   
 C1-C2: saccharosefreie Mikropartikel,  $DS = 7,8$   
 D1-D2: saccharosehaltige Mikropartikel (10 %),  $DS = 7,8$



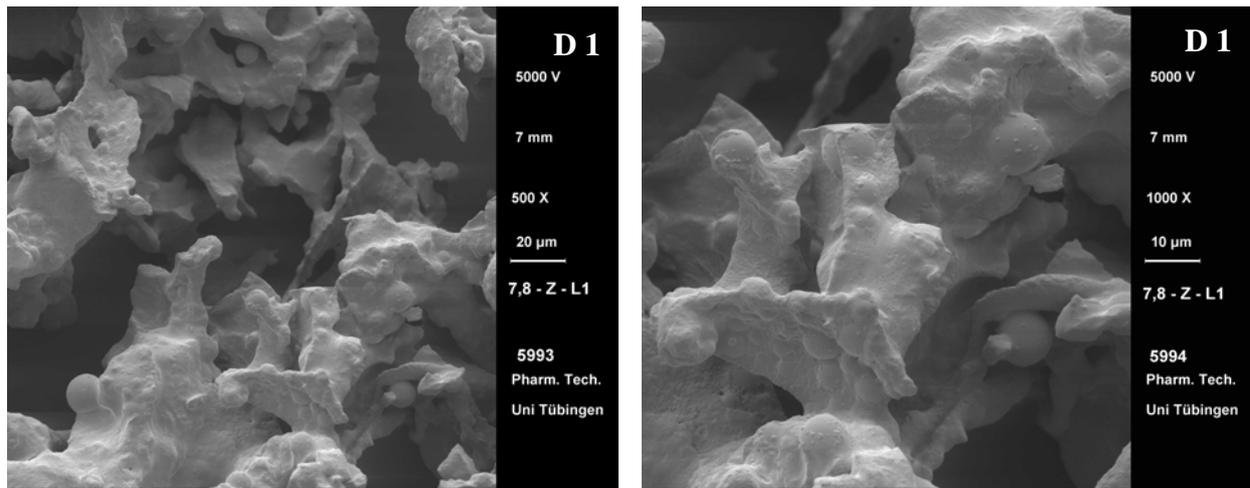


Abbildung 4-21: Übersicht der REM-Bilder der mit Lysozym beladenen Mikropartikel

A1-A2: saccharosefreie Mikropartikel,  $DS = 1,5$

B1-B2: saccharosehaltige Mikropartikel (10 %),  $DS = 1,5$

C1-C2: saccharosefreie Mikropartikel,  $DS = 7,8$

D1-D2: saccharosehaltige Mikropartikel (10 %),  $DS = 7,$

Abbildung 4-22 zeigt den Bruch durch einen Mikropartikel. Man erkennt eine kompakte innere Struktur, die jedoch durch viele kleine Kanälchen durchzogen ist.

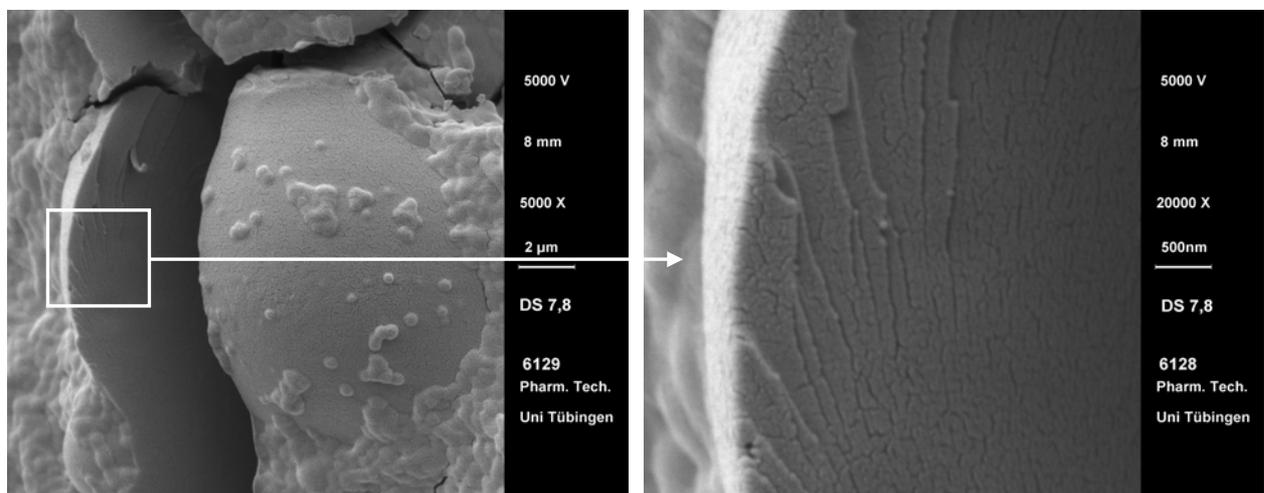


Abbildung 4-22: Bruch durch einen Mikropartikel

Diese Ergebnisse lassen sich durch TEM-Aufnahmen früherer Arbeiten zu diesem Thema bestätigen (Scheibe, 2008). Die dabei angefertigten TEM-Aufnahmen zeigen ebenfalls eine von Poren durchzogene Hydrogelmatrix (Abbildung 4-23).

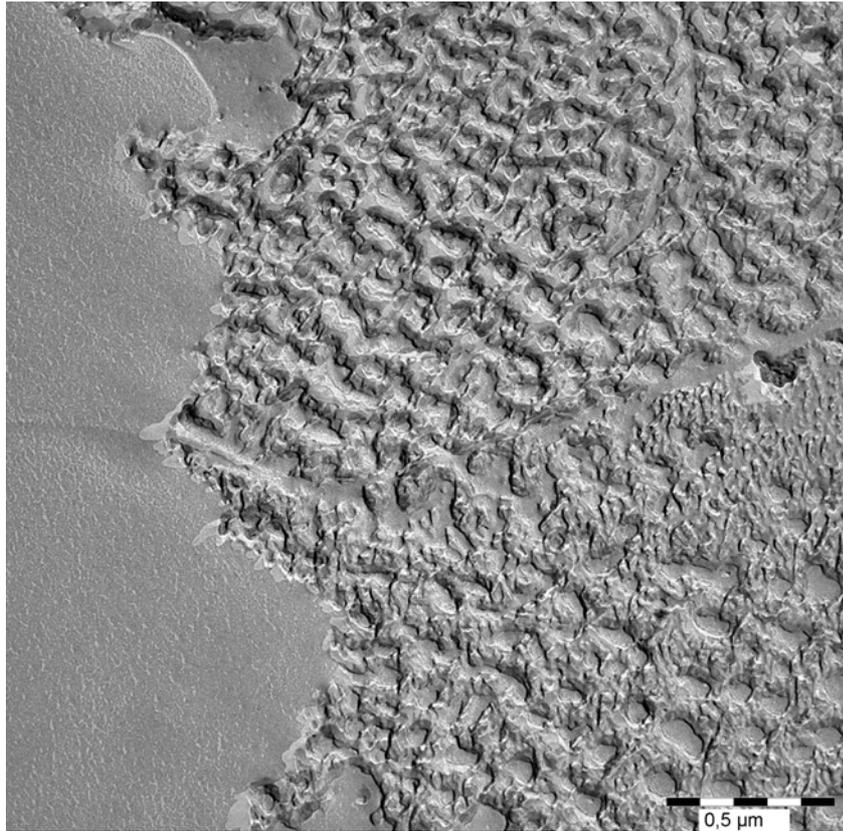


Abbildung 4-23: TEM-Aufnahme einer HES-Hydrogelmatrix (Scheibe, 2008)

#### 4.2.2.4 Partikelgrößenmessung durch Laserbeugung

Der Partikelgröße von parenteral zu applizierenden Arzneiformen kommt eine große Bedeutung zu. Die Größe der hergestellten Mikropartikel ist u. a. abhängig vom gewählten Phasen-Volumen-Verhältnis der HES- zur PEG-Phase (Stenekes et al., 1999) und von entscheidender Bedeutung für die Applizierbarkeit am Patienten und die Immunantwort. Die Applikation von zu großen Mikropartikeln ist für den Patienten schmerzhaft und die Kanüलगängigkeit ist erschwert.

Aus diesen Gründen ist die Partikelgrößenbestimmung der hergestellten Mikropartikel unabdingbar.

#### 4.2.2.4.1 Saccharosefreie Mikropartikel

Abbildung 4-24 und Abbildung 4-25 zeigen die durch Laserbeugung ermittelte Partikelgrößenverteilung der saccharosefreien Mikropartikel mit einem DS von 1,5 bzw. 7,8. Tabelle 4-4 fasst die d10-, d50- und die d90-Werte zusammen. Alle Messwerte der niedriger substituierten Mikropartikel liegen geringfügig über denen der höher substituierten Mikropartikel.

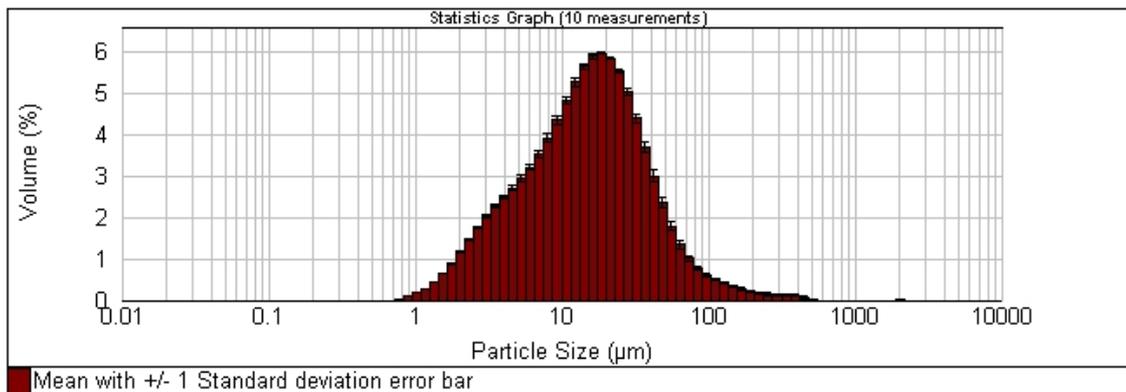


Abbildung 4-24: Partikelgrößenverteilung der saccharosefreien Mikropartikel mit einem DS von 1,5 ( $n = 10$ , Fehlerbalken = Standardabweichung)

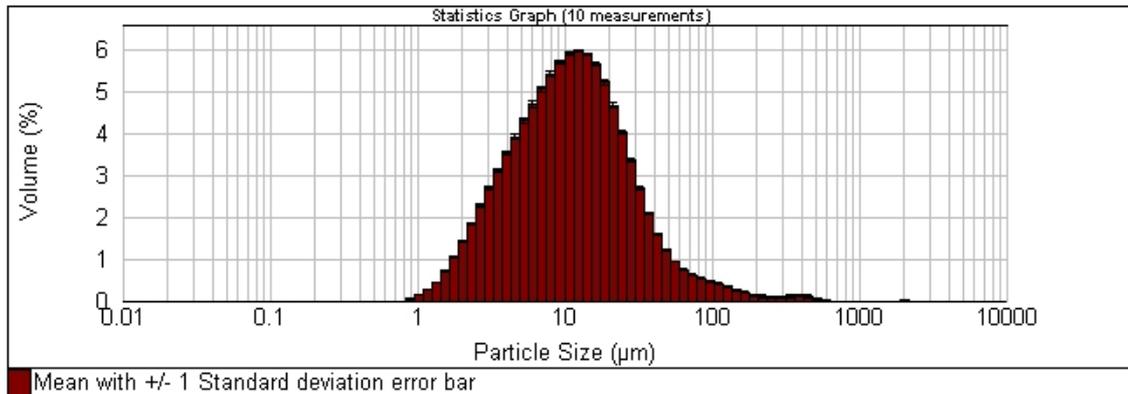


Abbildung 4-25: Partikelgrößenverteilung der saccharosefreien Mikropartikel mit einem DS von 7,8 ( $n = 10$ , Fehlerbalken = Standardabweichung)

Tabelle 4-4: Partikelgrößenverteilung von saccharosefreien Mikropartikeln ( $n = 10$ )

	d10	d50	d90
DS 1,5	3,5 µm	14,8 µm	45,9 µm
DS 7,8	3,2 µm	10,6 µm	33,7 µm

#### 4.2.2.4.2 Saccharosehaltige Mikropartikel

Saccharosehaltige Mikropartikel neigen, wie durch mikroskopische Aufnahmen bestätigt wird (siehe Kapitel 4.2.2.1.2) zur Aggregation. Betrachtet man die Partikelgrößenverteilung der Mikropartikel mit 5 % Saccharose (Abbildung 4-26 und Abbildung 4-27), erkennt man eine bimodale Verteilung der Partikelgröße, wobei der d50 zu höheren Partikelgrößen im Vergleich zu den saccharosefreien Mikropartikeln verschoben ist. Durch die bimodale Kurve und der deutlichen Verschiebung der d50-Werte zu höheren Werten wird deutlich, dass bei der Laserbeugung sowohl die Mikropartikel als auch die nicht dispergierbaren Agglomerate gemessen werden. Aufgrund dessen wird die Partikelgrößenmessung der saccharosehaltigen Mikropartikel-Chargen nicht weitergeführt.

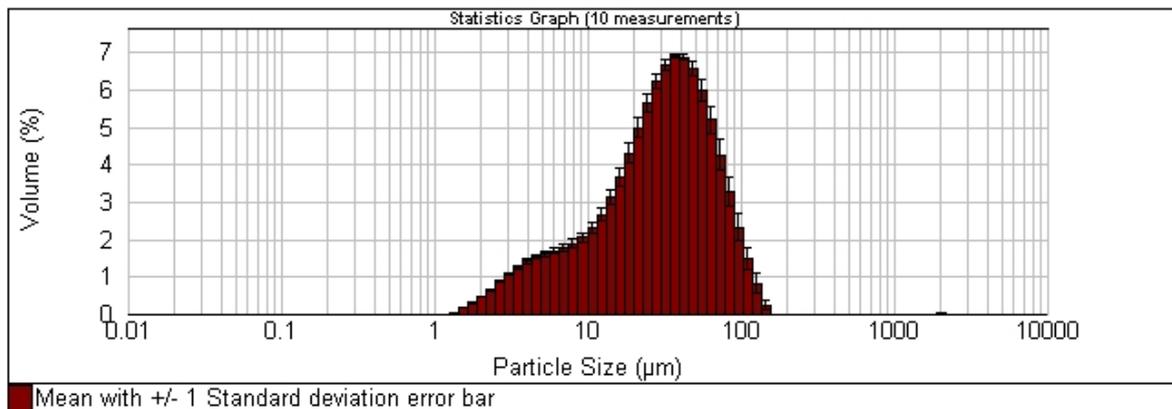


Abbildung 4-26: Partikelgrößenverteilung der saccharosehaltigen (5 % Saccharose) Mikro-partikel mit einem DS von 1,5 ( $n = 10$ , Fehlerbalken = Standardabweichung)

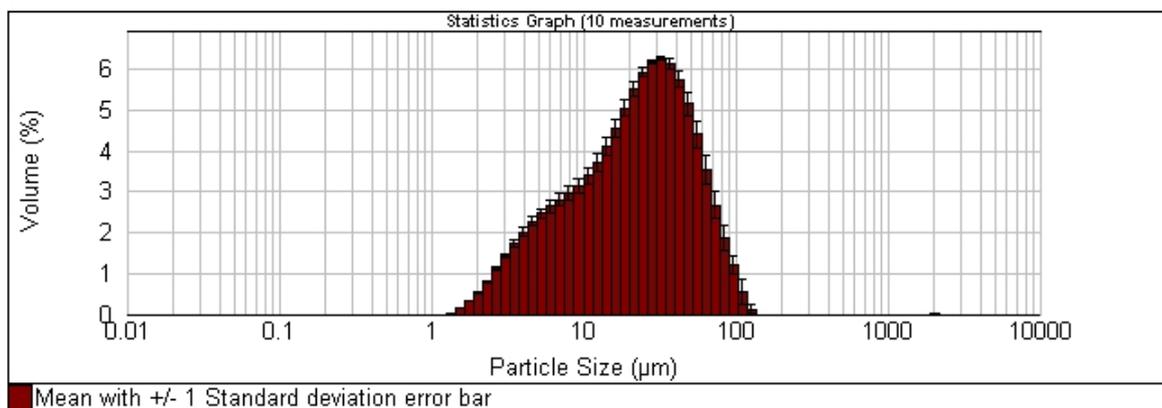


Abbildung 4-27: Partikelgrößenverteilung der saccharosehaltigen (5 % Saccharose) Mikro-partikel mit einem DS von 7,8 ( $n = 10$ , Fehlerbalken = Standardabweichung)

Mikropartikel zur parenteralen Applikation am Menschen sollten, wie bereits eingangs erwähnt, bestimmte Kriterien in Bezug auf ihre Größe erfüllen. Mikropartikelaggregate sind durch ihre Größe nicht zur parenteralen Applikation geeignet. Da Mikropartikel jedoch oft in Form von gefriergetrockneten Pulvern in den Handel gebracht werden, in denen auch Kryoprotektoren zum Einsatz kommen, bedarf das Herstellungsverfahren und die Rezeptur der in dieser Arbeit hergestellten saccharosehaltigen Mikropartikel einer Optimierung.

### 4.2.3 Bestimmung der Einschlussrate

Die Kenntnis der in den Mikropartikeln enthaltenen Wirkstoffmenge ist bedeutend für die Festlegung der maximal erwarteten freigesetzten Wirkstoffmenge. Dabei wird die in den Mikropartikeln befindliche Menge Wirkstoff als 100 %-Wert angenommen und die freigesetzte Menge pro Zeiteinheit darauf bezogen, so dass im Optimalfall eine Freisetzung von 100 % resultiert.

Aus der so ermittelten Menge an eingeschlossenem Wirkstoff läßt sich die Einschlussrate von Wirkstoffen mit Hilfe von Gleichung 4-5 berechnen.

$$\text{Einschlussrate} = \frac{\text{Menge Wirkstoff in den Mikropartikeln}}{\text{Menge eingesetzter Wirkstoff}} \cdot 100 \quad \text{Gleichung 4-5}$$

Bei der Herstellung von Mikropartikeln und deren Beladung mit Wirkstoffen wird in den meisten Fällen der Wirkstoff nicht quantitativ eingeschlossen, da während des Herstellungsprozesses ein Teil des Wirkstoffs auf unterschiedlichen Wegen verloren geht. Dazu gehören u. a. die Adsorption an Gefäßwänden (z. B. Proteine), der Abbau des Wirkstoffs durch Inkompatibilitäten mit Hilfsstoffen und das Auswaschen des Wirkstoffs bei der Mikropartikel-Aufreinigung.

#### 4.2.3.1 Lysozym

##### 4.2.3.1.1 Massenbilanz-Methode

Bei der Herstellung von Mikropartikeln mit der Wasser-in-Wasser-Emulsionstechnik bleibt ein Teil des Wirkstoffs in der PEG-Phase zurück bzw. wird durch das Waschen der Mikropartikel von deren Oberfläche entfernt. Die Ermittlung der Einschlussrate mit Hilfe der Massenbilanz-Methode stützt sich auf die Annahme, dass der Anteil des Wirkstoffs, der nicht im PEG-Überstand oder den

Waschwässern der Mikropartikel des Herstellungsprozesses nachgewiesen werden kann, tatsächlich in den Mikropartikeln eingeschlossen wird.

Abbildung 4-28 zeigt den Lysozymanteil im PEG-Überstand und den einzelnen Waschwasser-Fractionen, der nicht in den Mikropartikeln eingeschlossen wird. Die Lysozymmenge fällt von 18,4 % der eingesetzten Lysozymmenge im PEG-Überstand mit jedem Waschschrift stetig ab. Nach ca. zwei Waschungen ist praktisch kein Lysozym mehr nachweisbar. Somit kann davon ausgegangen werden, dass Lysozym ab diesem Zeitpunkt nicht weiter von der Oberfläche der Mikropartikel desorbiert werden kann.

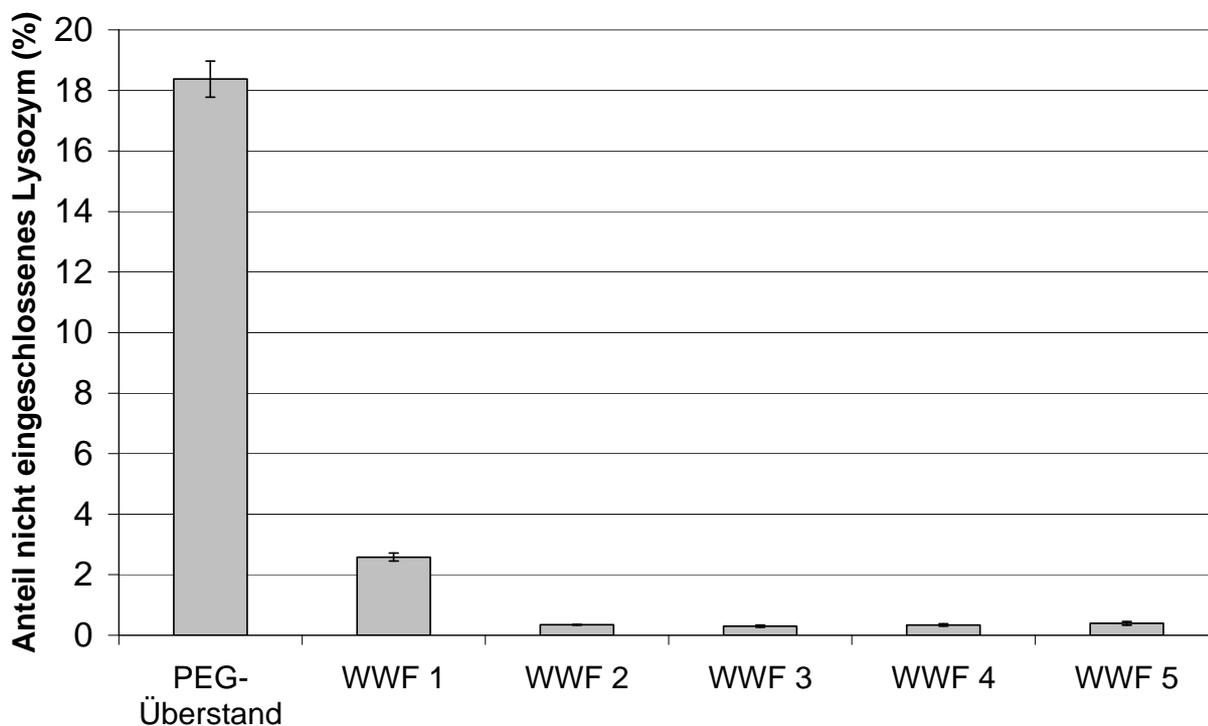


Abbildung 4-28: Lysozymmenge im PEG-Überstand bzw. den Waschwasserfraktionen (WWF) ( $n = 3$ , Fehlerbalken = Standardabweichung)

Wird die Fluoreszenz-Lysozymmenge aus dem Überstand und allen Waschwasser-Fractionen addiert, erhält man den nicht eingeschlossenen Anteil. Wird dieser von der eingesetzten Menge Fluoreszenz-Lysozym abgezogen, ergibt sich rechnerisch die in den Mikropartikeln eingeschlossene Menge. Durch Berechnung der Einschlussrate mit Gleichung 4-5 erhält man den Anteil des Wirkstoffs, der in den Mikropartikeln eingeschlossen vorliegt. Abbildung 4-29 zeigt die Einschlussraten der Mikropartikel-Chargen.

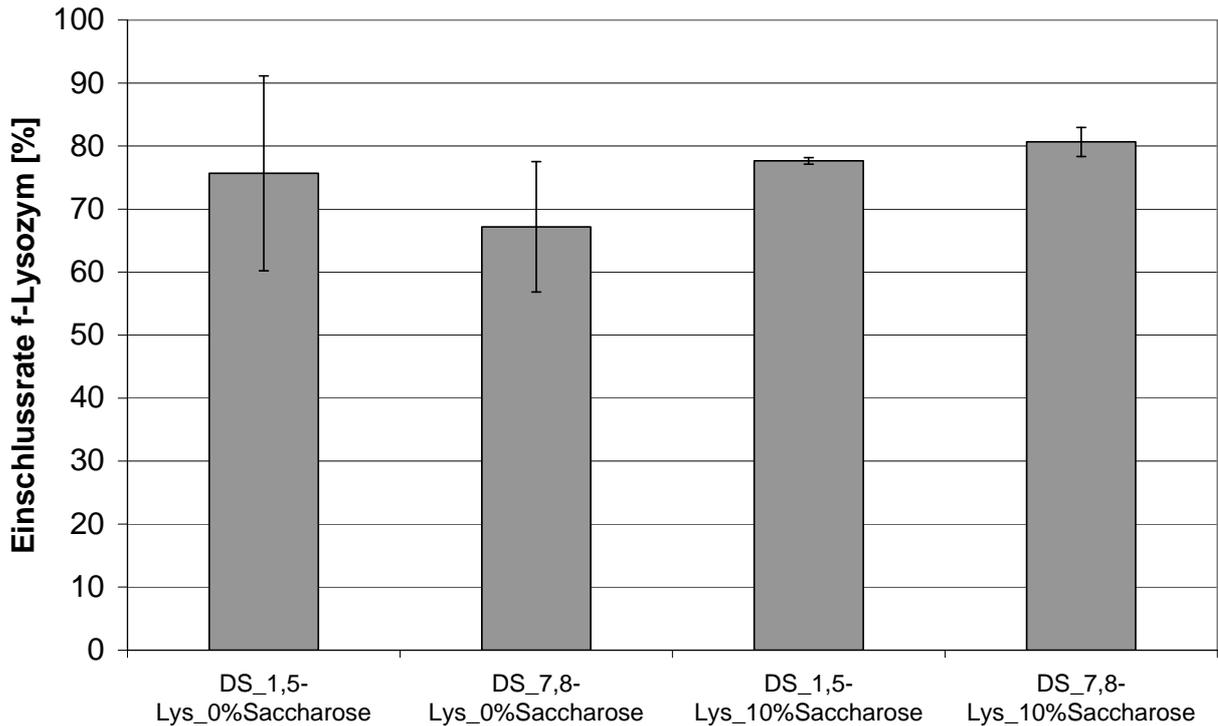


Abbildung 4-29: *Einschlussrate Fluoreszenz-Lysozym bei unterschiedlichen Saccharosegehalten und Substitutionsgraden, Bestimmung mit Massenbilanzmethode (n = 3, Fehlerbalken = Standardabweichung)*

Die so ermittelten Einschlu sraten variieren je nach Rezeptur zwischen 70 % und 80 %. Auffällig ist, dass die Chargen ohne Saccharose im Bezug auf die Einschlu srate relativ starken Schwankungen unterliegen, wohingegen die Chargen mit 10 % Saccharose sehr geringe Standardabweichungen aufweisen, d. h. sehr homogen sind. Dies könnte darauf hindeuten, dass Saccharose als Kryoprotektor für möglichst reproduzierbare Einschlu sraten förderlich ist.

Weiterhin lässt sich mit Hilfe dieser Daten die Beladung mit Fluoreszenz-Lysozym pro Gramm Mikropartikel berechnen. Die Beladung der saccharosefreien Mikropartikel mit Fluoreszenz-Lysozym beträgt  $2591 \mu\text{g} \pm 486 \mu\text{g}$  (DS 1,5) und  $2241 \mu\text{g} \pm 316 \mu\text{g}$  (DS 7,8) pro Gramm Mikropartikel. Für die saccharosehaltigen Mikropartikel ist die Beladung durch die hohe Menge an eingebetteter und aufgelagerter Saccharose erwartungsgemäß deutlich geringer. Die Beladung beträgt hier  $709 \mu\text{g} \pm 11 \mu\text{g}$  (DS 1,5) und  $757 \mu\text{g} \pm 38 \mu\text{g}$  (DS 7,8) Fluoreszenz-Lysozym pro Gramm Mikropartikel-Endprodukt.

#### 4.2.3.1.2 Alpha-Amylase-Methode

Als Alternative zur Massenbilanzmethode kommt grundsätzlich die Alpha-Amylase-Methode in Betracht. Diese Methode beruht auf der Tatsache, dass das Mikropartikelnetzwerk durch Alpha-Amylase bei einem pH-Wert von ca. 9 aufspaltbar ist. Durch die Spaltung des Polymergerüsts wird der gesamte Wirkstoff freigesetzt und kann als 100 %-Wert bestimmt werden. Dabei ist jedoch sicherzustellen, dass der zu bestimmende Wirkstoff sowohl gegenüber dem Enzym als auch gegenüber der Pufferlösung stabil ist. Aus diesem Grund wird ein Stabilitätstest von Fluoreszenz-Lysozym gegenüber Alpha-Amylase und zwei verschiedenen Puffern durchgeführt. Die durchgeführte Versuchsreihe mit Carbonatpuffer pH 9,6, Alpha-Amylase in Carbonatpuffer pH 9,6, Phosphatpuffer pH 7 und Alpha-Amylase in Phosphatpuffer pH 7 ergibt das in Abbildung 4-30 dargestellte Ergebnis.

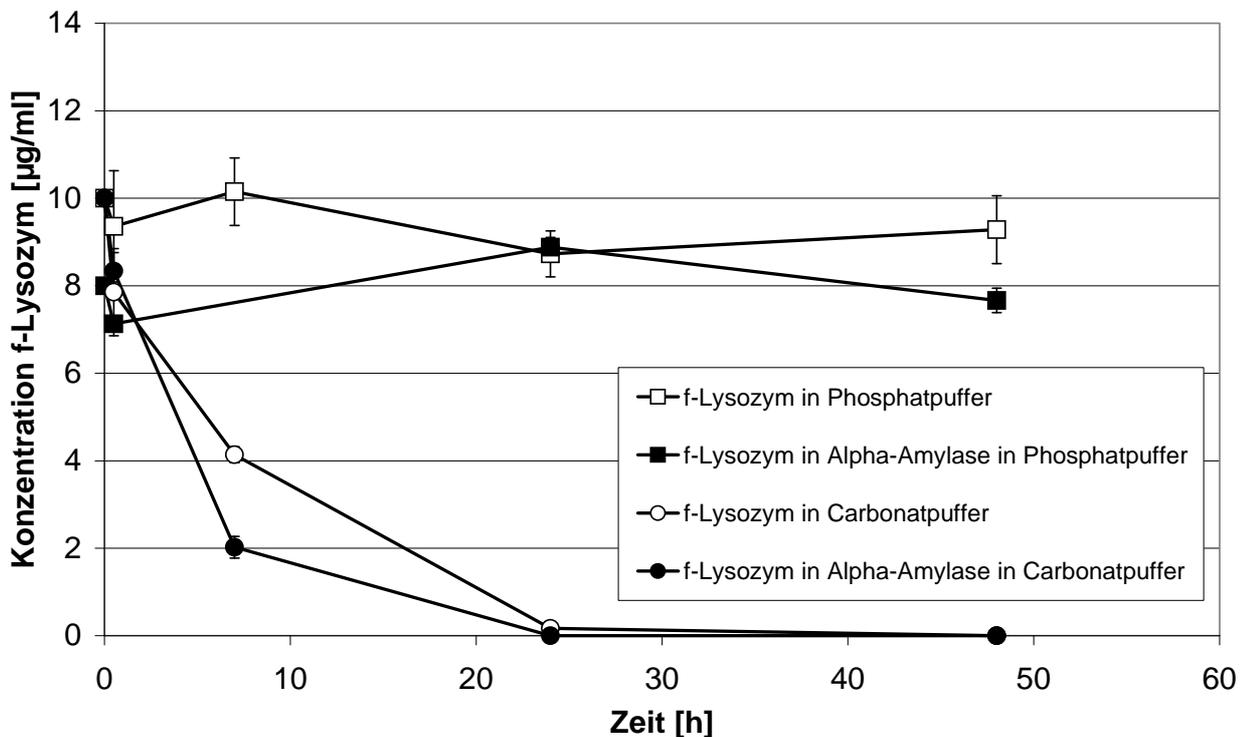


Abbildung 4-30: Stabilität von Fluoreszenz-Lysozym in verschiedenen Medien in Abhängigkeit von der Zeit ( $n = 3$ , Fehlerbalken = Standardabweichung)

Die Soll-Konzentration von 10 µg/ml in Phosphatpuffer pH 7 verändert sich innerhalb von 48 h nicht, d. h. die Stabilität von Fluoreszenz-Lysozym in Phosphatpuffer pH 7 ist in diesem Zeitraum gegeben. Die Schwankungen liegen im Bereich üblicher Messungenauigkeiten. Ähnlich verhält es sich auch bei der Stabilität in Phosphatpuffer pH 7, welchem Alpha-Amylase zugesetzt wird: die

Messwerte schwanken auch hier um den Sollwert von 8  $\mu\text{g/ml}$  und bleiben über einen Zeitraum von 48 h konstant.

Im Unterschied dazu ist bei dem in Carbonatpuffer bzw. Alpha-Amylase in Carbonatpuffer überprüften Standard ein deutlicher Abbau des Fluoreszenz-Lysozyms zu sehen. Unabhängig davon, ob Alpha-Amylase enthalten ist, wird Fluoreszenz-Lysozym in Carbonatpuffer innerhalb von 24 h vollständig abgebaut.

Diese Ergebnisse erklären die unerwartet niedrigen Werte für die Einschussraten von Lysozym. Da ein großer Teil des Lysozyms innerhalb des Versuchszeitraums bereits abgebaut wird, werden hierbei, je nach Rezeptur, Einschussraten zwischen ca. 5 und 8 % der eingesetzten Fluoreszenz-Lysozymmenge gemessen (Abbildung 4-31). Diese Ergebnisse liegen um ca. das 10-15-fache unter den Ergebnissen der Massenbilanzmethode.

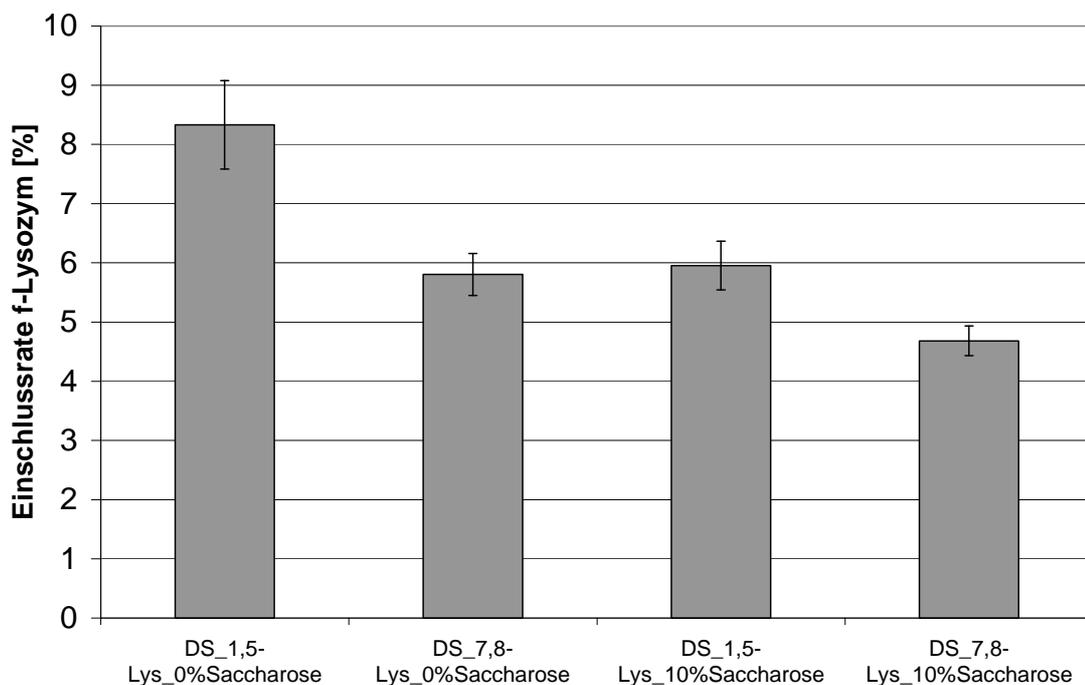


Abbildung 4-31: *Einschlussrate von Fluoreszenz-Lysozym bei unterschiedlichen Saccharosegehalten und Substitutionsgraden, Bestimmung mit Alpha-Amylase-Methode ( $n = 3$ , Fehlerbalken = Standardabweichung)*

Dieses Ergebnis zeigt, dass die Alpha-Amylase-Methode zur Bestimmung der Einschussrate im Fall von Fluoreszenz-Lysozym nicht genutzt werden kann, da der Farbstoff gegenüber Carbonatpuffer mit pH 9,6 instabil ist. Weitere Versuche zur Einschlusseffizienz-Bestimmung der Mikropartikel, bei denen die Alpha-Amylase-Konzentration in Phosphatpuffer erhöht wird, bringen

kein Ergebnis, da das Hydrogelgerüst der Mikropartikel bei diesem pH-Wert nicht angegriffen wird und somit der Farbstoff nicht vollständig freigesetzt werden kann.

Aufgrund dessen wird zur Ermittlung der eingeschlossenen Menge Lysozym als Referenzwert für den 100 %-Wert der Freisetzungsbefreiungen und für die Bestimmung der Einschlussrate die Massenbilanz-Methode verwendet.

#### 4.2.3.2 FITC-Dextran

##### 4.2.3.2.1 Massenbilanzmethode

Die Massenbilanzmethode ergibt für FITC-Dextran, je nach Rezeptur, Einschlussraten zwischen 35 und 80 % (Abbildung 4-32).

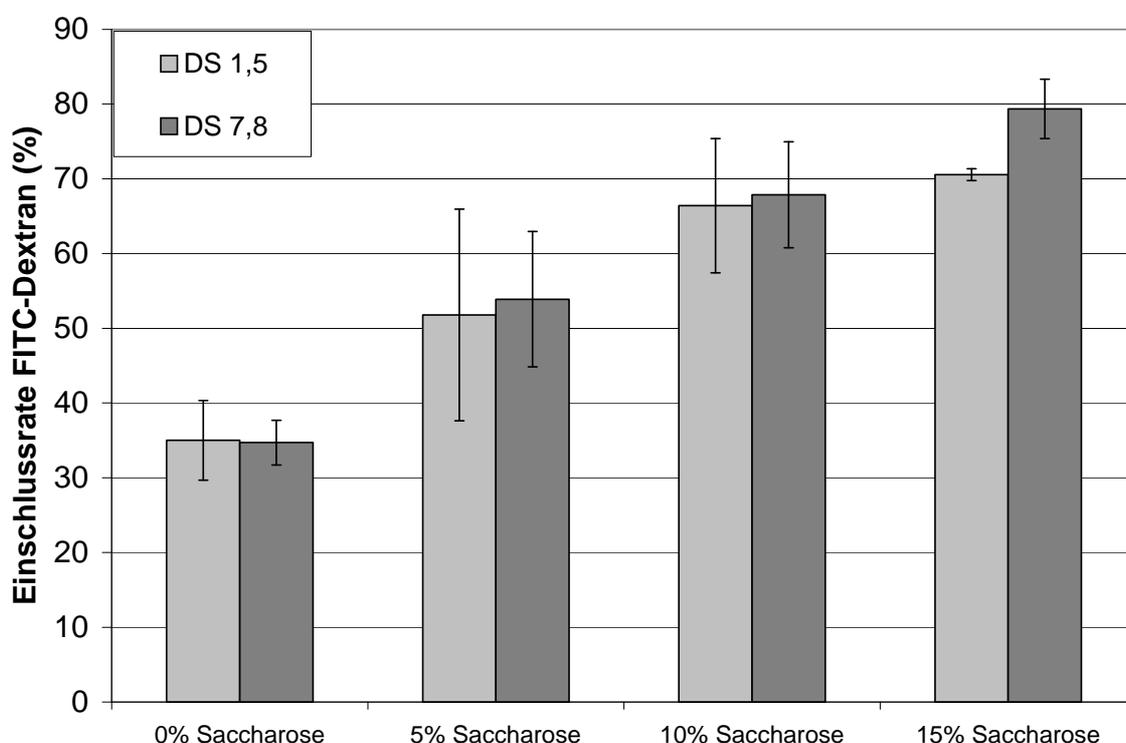


Abbildung 4-32: *Einschlussrate von FITC-Dextran bei unterschiedlichen Saccharosegehalten und Substitutionsgraden; Bestimmung mit Massenbilanzmethode (n = 3, Fehlerbalken = Standardabweichung)*

Es zeigt sich bezüglich der Abhängigkeit der Einschlussrate vom Saccharosegehalt ein Trend: Je mehr Saccharose im System enthalten ist, desto weniger FITC-Dextran kann in den PEG-Überständen und den Waschwasserfraktionen nachgewiesen werden. Somit liegt die Vermutung

nahe, dass mehr FITC-Dextran in die Mikropartikel eingelagert wird. Dass Saccharose keinen Einfluss auf die Fluoreszenz hat, wurde durch die Vermessung der PEG-Überstände bzw. Waschwasserfraktionen der unbeladenen Mikropartikel gezeigt. Weiterhin ist deutlich zu erkennen, dass die Einschussrate scheinbar unabhängig vom Substitutionsgrad des HES-Derivates ist.

#### 4.2.3.2.2 Alpha-Amylase-Methode

In Analogie zur Bestimmung der Lysozymstabilität wird auch für FITC-Dextran ein Stabilitätstest in der verwendeten Alpha-Amylase-Lösung in Carbonatpuffer pH 9,6 durchgeführt. Abbildung 4-33 zeigt die Konzentration von FITC-Dextran nach 48 h in diesem Medium.

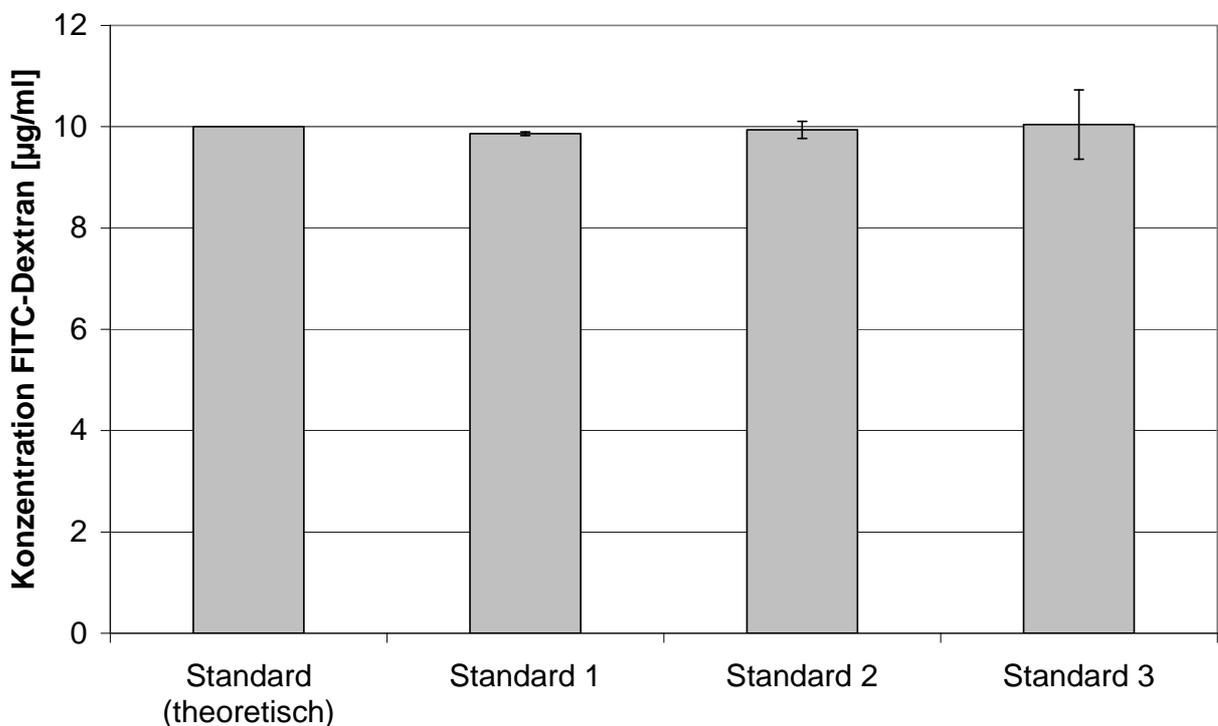


Abbildung 4-33: Stabilität von FITC-Dextran gegenüber Alpha-Amylase in Carbonatpuffer pH 9,6 nach 48 h ( $n = 3$ , Fehlerbalken = Standardabweichung)

Die Konzentration nach 48 h schwankt im geringfügig um den Sollwert von 10 µg/ml. Damit kann davon ausgegangen werden, dass FITC-Dextran gegenüber Alpha-Amylase in Carbonatpuffer im getesteten Zeitraum stabil ist.

Die Bestimmung der Einschussrate mit der Alpha-Amylase-Methode ergibt die in Abbildung 4-34 dargestellten Ergebnisse. Die Einschussrate der saccharosefreien Mikropartikel liegt bei etwa 30 % und damit in etwa im gleichen Bereich wie bei der Bestimmung durch die Massenbilanzmethode.

Die Einschussraten der saccharosehaltigen Mikropartikel liegen zwischen 30 und 37 %. Hier ist der Trend einer steigenden Einschussrate mit zunehmender Saccharosekonzentration nicht zu verzeichnen. Der Grund dafür muss in weiterführenden Untersuchungen noch geklärt werden. Die Einschussraten sind somit sowohl unabhängig vom Saccharosegehalt als auch vom Substitutionsgrad der Hydroxyethylstärke.

Die Ergebnisse dieser Methode werden für die Festlegung des 100 %-Wertes für die Freisetzungsuntersuchungen von FITC-Dextran verwendet.

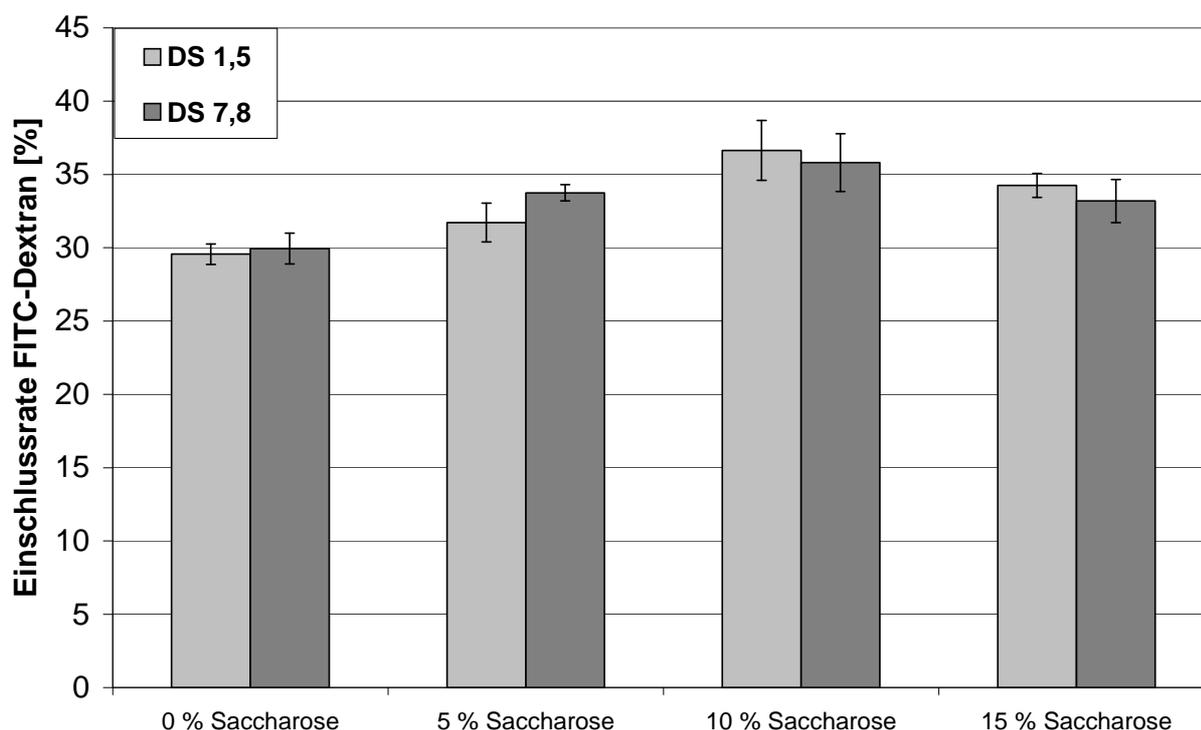


Abbildung 4-34: *Einschlussrate von FITC-Dextran bei unterschiedlichen Saccharosegehalten und Substitutionsgraden; Bestimmung mit Alpha-Amylase-Methode (n = 3, Fehlerbalken = Standardabweichung)*

In Analogie zu den mit Lysozym beladenen Mikropartikeln ist auch hier anhand dieser Daten die Berechnung der Beladung mit FITC-Dextran pro Gramm Mikropartikel möglich. Diese ist, wie in Kapitel 4.2.3.1.1 bereits beschrieben, für die saccharosehaltigen Mikropartikel erwartungsgemäß geringer. Mit steigendem Saccharosegehalt nimmt die Beladung pro Gramm Mikropartikel erwartungsgemäß ab (Tabelle 4-5).

Tabelle 4-5: Beladung mit FITC-Dextran pro Gramm Mikropartikel-Endprodukt

Charge	Beladung mit FITC-Dextran [µg] pro 1 g	Standardabweichung
	Mikropartikel	[µg]
1,5_FITC_0% Saccharose	1020,7	24,0
7,8_FITC_0% Saccharose	976,7	34,4
1,5_FITC_5% Saccharose	436,1	18,3
7,8_FITC_5% Saccharose	449,2	7,4
1,5_FITC_10% Saccharose	262,6	32,9
7,8_FITC_10% Saccharose	301,3	16,5
1,5_FITC_15% Saccharose	206,7	4,9
7,8_FITC_15% Saccharose	198,9	8,8

#### 4.2.4 Freisetzung

Mikropartikel müssen bestimmten Anforderungen an die Freisetzungskinetik und die Freisetzungsdauer genügen. Aus diesem Grund ist es unerlässlich, Freisetzungsuntersuchungen des Wirkstoffs aus der Hydrogelmatrix durchzuführen. In diesem Versuch soll die Freisetzung von Fluoreszenz-Lysozym und FITC-Dextran in Abhängigkeit von der Zeit untersucht und durch zwei verschiedene Auswertungsmethoden analysiert werden.

Die Freisetzung erfolgt sowohl in Phosphatpuffer pH 7 als auch in Humanserum pH 7. Damit soll der Einfluss von in Humanserum enthaltenen gelgerüstabbauenden Enzymen auf die Freisetzung untersucht werden. Es ist zu erwarten, dass die Freisetzung in Humanserum durch die zusätzlich zur Diffusion stattfindende enzymatische Erosion schneller abläuft als in Phosphatpuffer.

Zur besseren Vergleichbarkeit der Ergebnisse und zur Analyse der Freisetzungskinetik werden im Folgenden die Freisetzungskurven in drei verschiedenen Darstellungsarten gezeigt. Zum einen wird der kumulierte freigesetzte Anteil Wirkstoff gegen die Zeit aufgetragen, um den tatsächlichen Verlauf der Freisetzung beobachten zu können. Zum anderen wird der kumulierte freigesetzte Anteil Wirkstoff gegen die Wurzel Zeit aufgetragen (Quadratwurzelgesetz nach Higuchi, siehe Kapitel 2.5.1), um die Geschwindigkeit der Freisetzung der verschiedenen Mikropartikel-Chargen vergleichen und bewerten zu können. Weiterhin wird der Logarithmus des kumuliert freigesetzten

Anteils des Wirkstoffs gegen den Logarithmus der Zeit aufgetragen (Power Law, siehe Kapitel 2.5.2), um die Freisetzungskinetik analysieren zu können.

#### 4.2.4.1 Freisetzung von f-Lysozym in Phosphatpuffer pH 7

Die Freisetzung von Fluoreszenz-Lysozym in Phosphatpuffer pH 7 ist in Abbildung 4-35 dargestellt.

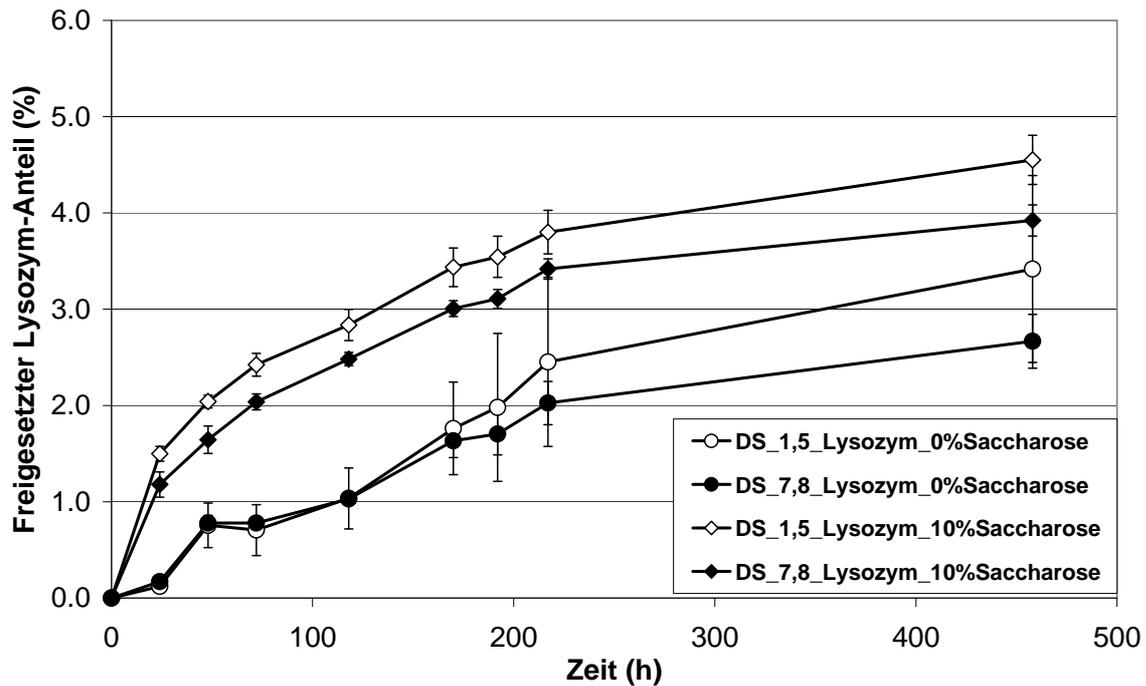


Abbildung 4-35: Kumulative Freisetzung von Fluoreszenz-Lysozym in Phosphatpuffer pH 7 in Abhängigkeit von der Zeit ( $n = 3$ , Fehlerbalken = Standardabweichung)

Nach einer initialen Lysozym-Freisetzung in den ersten 48 h wird Lysozym ab diesem Zeitpunkt gleichmäßig freigesetzt. In Tabelle 4-6 sind die Freisetzungsraten pro Tag aus 1 Gramm Mikropartikel in Phosphatpuffer pH 7 mit der zugehörigen Beladungsrate pro 1 Gramm Mikropartikel dargestellt.

*Tabelle 4-6: Beladung [ $\mu\text{g}$ ] mit Lysozym pro 1 g Mikropartikel und durchschnittliche Freisetzungsraten [ $\mu\text{g}$ ] in Phosphatpuffer pH 7 pro 24 h jeweils pro 1 g Mikropartikel nach der initialen Freisetzung von 48 h*

<b>Charge</b>	<b>Beladung [<math>\mu\text{g}</math>] pro 1 g Mikropartikel</b>	<b>Standardabweichung der Beladung [<math>\mu\text{g}</math>]</b>	<b>Freisetzungsrates pro 24 h [<math>\mu\text{g}</math>] aus 1 g Mikropartikel</b>
DS 1,5-0 % Saccharose	2591	486	8,76
DS 7,8-0 % Saccharose	2241	316	6,12
DS 1,5-10 % Saccharose	709	11	2,52
DS 7,8-10 % Saccharose	757	38	2,64

In der Literatur sind für die Freisetzung von Proteinen aus Hydrogelen, in die keine Dextranase eingebettet ist, sehr geringe Freisetzungsraten beschrieben (Meyvis et al., 2001). Diese können durch die hier erhaltenen Freisetzungsdaten bestätigt werden: Nach 456 h werden aus den saccharosefreien Mikropartikeln ca.  $3,4 \% \pm 1,2 \%$  (DS 1,5) bzw.  $2,7 \% \pm 0,5 \%$  (DS 7,8) des eingebetteten Lysozyms freigesetzt. Dieser Unterschied im Freisetzungsverhalten wird jedoch erst nach ca. 150 h deutlich. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass zuerst das Fluoreszenz-Lysozym von der Oberfläche der Mikropartikel und aus den oberen Schichten freigesetzt wird. Ist dieser Teil des Lysozyms in Lösung gegangen, ist die Diffusionsstrecke für das Protein länger und der Grad der Vernetzung des Gelgerüsts ist für die Geschwindigkeit der Freisetzung verantwortlich.

Aus den saccharosehaltigen Mikropartikeln werden nach 456 Stunden  $4,6 \% \pm 0,3 \%$  (DS 1,5) bzw.  $3,9 \% \pm 0,2 \%$  (DS 7,8) Fluoreszenz-Lysozym freigesetzt. Hier ist von Anfang an ein geringer Einfluss der Substitutionsgrade zu erkennen, der jedoch hauptsächlich durch die unterschiedlich hohe Anfangsfreisetzung zustande kommt.

Trägt man die kumulativ freigesetzte Menge gegen die Wurzel der Zeit auf, ergeben sich die in Abbildung 4-36 dargestellten Freisetzungskurven. Die dazugehörigen Geradengleichungen und Bestimmtheitsmaße sind in Tabelle 4-7 aufgeführt. Die Bestimmtheitsmaße deuten mit Werten zwischen 0,94 und 0,97 auf eine nahezu ideale Freisetzung nach dem Higuchi-Gesetz hin.

Die saccharosehaltigen Mikropartikel mit dem niedrigeren Substitutionsgrad weisen eine etwas größere Steigung auf, d. h. sie setzen Fluoreszenz-Lysozym geringfügig schneller frei. Die

saccharosefreien Mikropartikel mit einem DS von 1,5 setzen Lysozym etwa eineinhalb Mal so schnell frei wie die Mikropartikel mit einem DS von 7,8, so dass bei diesen Mikropartikeln ein deutlicher Unterschied bzgl. der Freisetzungsgeschwindigkeiten zu erkennen ist. Vergleicht man die saccharosehaltigen und die saccharosefreien Mikropartikel miteinander, fällt auf, dass es – anders als aus Abbildung 4-35 erwartet – nicht zu einer deutlich schnelleren Freisetzung des Fluoreszenz-Lysozims aus den saccharosehaltigen Mikropartikeln kommt. Die Steigungen der Geraden unterscheiden sich nur minimal voneinander.

Durch Extrapolation der Geraden durch die y-Achse kann der aufgelagerte Lysozym-Anteil, der initial freigesetzt wird, ermittelt werden. Dieser Wert entspricht dem y-Achsenabschnitt der Higuchi-Gleichung (Tabelle 4-7). Die dabei erhaltenen negativen Initialfreisetzungen für die saccharosefreien Mikropartikel sind rechnerisch bedingt. Die initiale Freisetzung hat auf die Freisetzungskinetik keinen Einfluss, er ist lediglich für die Gesamtmenge an freigesetztem Lysozym bedeutend.

*Tabelle 4-7: Higuchi-Gleichungen und Bestimmtheitsmaße der Freisetzung von Fluoreszenz-Lysozym in Phosphatpuffer pH 7*

<b>Charge</b>	<b>Higuchi-Gleichung</b>	<b>r<sup>2</sup></b>
DS_1,5 0 % Saccharose	$\frac{M_t}{M_\infty} = 0,2042 \cdot \sqrt{t} - 0,876$	0,9666
DS_7,8 0 % Saccharose	$\frac{M_t}{M_\infty} = 0,1519 \cdot \sqrt{t} - 0,441$	0,9635
DS_1,5 10 % Saccharose	$\frac{M_t}{M_\infty} = 0,190 \cdot \sqrt{t} + 0,782$	0,9668
DS_1,5 10 % Saccharose	$\frac{M_t}{M_\infty} = 0,174 \cdot \sqrt{t} + 0,548$	0,9447

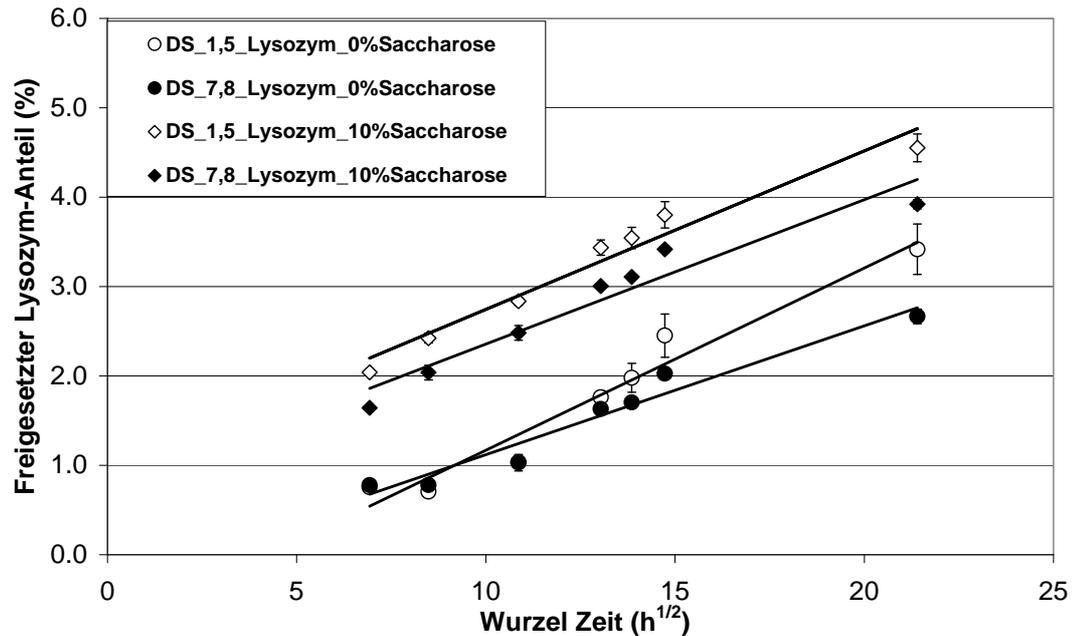


Abbildung 4-36: Kumulative Freisetzung von Fluoreszenz-Lysozym in Phosphatpuffer pH 7 in Abhängigkeit von der Wurzel der Zeit (nach Higuchi)  
( $n = 3$ , Fehlerbalken = Standardabweichung)

Die Betrachtung der Freisetzungsdaten nach dem Power Law ergibt ein ähnliches Bild wie bereits mit der Auftragung nach Higuchi gezeigt wird. Die logarithmische Auftragung des freigesetzten Wirkstoff-Anteils gegen den Logarithmus der Zeit ergibt auch hier einen linearen Zusammenhang mit Bestimmtheitsmaßen zwischen 0,92 und 0,98. Der Exponent  $n$  (Steigung der Geraden) liegt bei den saccharosefreien Mikropartikeln zwischen 0,5 und 1, was auf eine Kombination aus diffusions- und quellungs- oder erosionsgesteuerter Freisetzung hindeutet. Betrachtet man die Exponenten  $n$  der saccharosefreien Mikropartikel, wird auch hier die schnellere Freisetzung aus den niedrig substituierten Mikropartikeln deutlich. Anders verhält es sich dagegen bei den saccharosehaltigen Mikropartikeln. Diese haben einen Exponenten von  $n < 0,5$ , was auf eine verlangsamte bzw. behinderte Fick'sche Diffusion hindeutet. Die absolut freigesetzten Mengen dagegen sind bei den saccharosehaltigen Mikropartikeln deutlich größer, was, wie bereits beschrieben, durch die unterschiedlich hohe Anfangsfreisetzung zustande kommt.

Tabelle 4-8: Power Law und Bestimmtheitsmaße der Freisetzung von Fluoreszenz-Lysozym in Phosphatpuffer pH 7

Charge	Power Law	r <sup>2</sup>
DS_1,5 0% Saccharose	$\lg \frac{M_t}{M_\infty} = 0,7751 \cdot \lg t - 1,523$	0,9221
DS_7,8 0% Saccharose	$\lg \frac{M_t}{M_\infty} = 0,6210 \cdot \lg t - 1,205$	0,9368
DS_1,5 10% Saccharose	$\lg \frac{M_t}{M_\infty} = 0,3678 \cdot \lg t - 0,299$	0,9847
DS_1,5 10% Saccharose	$\lg \frac{M_t}{M_\infty} = 0,4025 \cdot \lg t - 0,439$	0,9662

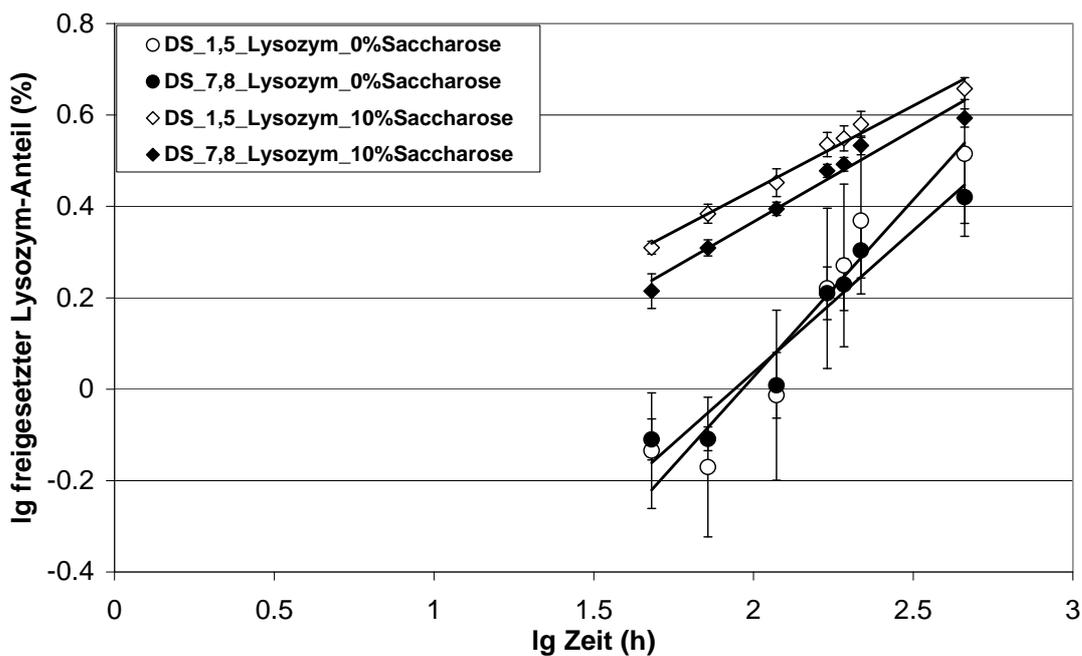


Abbildung 4-37: Logarithmus des kumulativ freigesetzten Fluoreszenz-Lysozymanteils in Abhängigkeit vom Logarithmus der Zeit (in Phosphatpuffer pH 7) (n = 3, Fehlerbalken = Standardabweichung)

Die geringere Freisetzungsgeschwindigkeit der saccharosehaltigen Mikropartikel kann mit der starken Aggregation dieser Mikropartikel erklärt werden (vgl. Kapitel 4.2.2). Durch diese Aggregate, die sich auch in wässriger Lösung nicht trennen, wird die freie Oberfläche der

---

Mikropartikel, welche mit dem FreisetzungsmEDIUM in Kontakt kommt, kleiner als bei den saccharosefreien Mikropartikeln, die einzeln vorliegen. Diese relative Oberflächenverkleinerung führt zu einer verlangsamten Freisetzung. Weiterhin spielen die Wechselwirkungen zwischen Saccharose und Lysozym eine bedeutende Rolle. Lysozym und Saccharose bilden starke Wasserstoffbrücken miteinander aus (Suihko et al., 2005; Allison et al., 1999; Tzannis & Prestrelski, 1998; Mosharraf et al., 2006), welche man sich beim Einsatz von Saccharose als Kryoprotektor zur Vermeidung der Proteindenaturierung zunutze macht. Dadurch kommt es zu einer geringeren molekularen Beweglichkeit des Proteins, was die erniedrigte Freisetzungsgeschwindigkeit erklärt. Dies erklärt auch, dass die Initialfreisetzung der saccharosehaltigen Mikropartikel höher ausfällt als die der saccharosefreien: In der die Mikropartikel umhüllenden Saccharoseschicht ist durch die Wasserstoffbrücken-Bindung vermehrt Lysozym enthalten. Löst sich ein Teil der Saccharose beim Erstkontakt mit Wasser, wird das Lysozym aus der Zuckerschicht schlagartig freigesetzt und es kommt zu einer Initialfreisetzung. Das weitere Lysozym aus dem Inneren der Mikropartikel wird anschließend, wie oben bereits beschrieben, durch die verminderte molekulare Beweglichkeit von Lysozym nur verzögert aus dem Gelgerüst freigesetzt.

#### **4.2.4.2 Freisetzung von f-Lysozym in Humanserum**

In Abbildung 4-38 ist die Freisetzung von Lysozym in Abhängigkeit von der Zeit dargestellt. Die initial freigesetzte Menge Fluoreszenz-Lysozym liegt je nach Substitutionsgrad und Saccharosegehalt zwischen  $4,9 \% \pm 0,9 \%$  und  $8,4 \% \pm 0,9 \%$  und ist ausschlaggebend für den weiteren Kurvenverlauf; ab ca. 24 h ist der Verlauf aller Kurven nahezu identisch. Nach einer Freisetzungsdauer von 22 Tagen liegen die freigesetzten Anteile zwischen  $7,1 \% \pm 1,2 \%$  und  $11,4 \% \pm 1,3 \%$ . Es ist eine hohe initiale Freisetzung innerhalb einer sehr kurzen Zeit (hier: 24-48 h) zu erkennen.

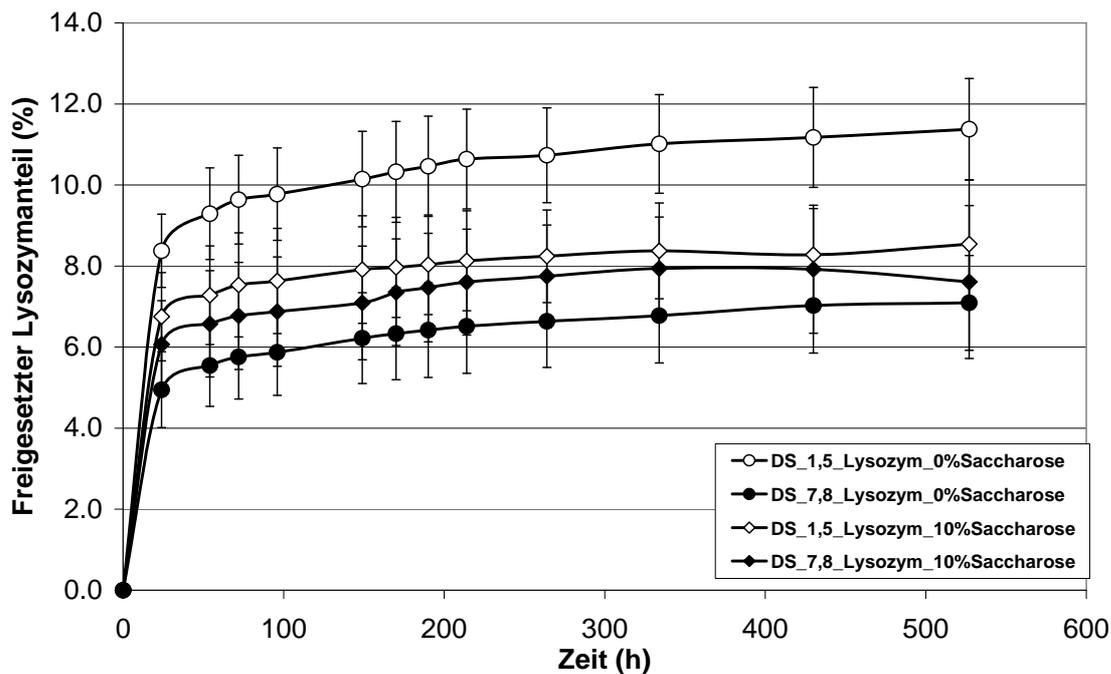


Abbildung 4-38: Kumulative Freisetzung von Fluoreszenz-Lysozym in Humanserum in Abhängigkeit von der Zeit ( $n = 3$ , Fehlerbalken = Standardabweichung)

Nach dieser initialen Freisetzung wird Lysozym aus den Mikropartikeln nahezu linear freigesetzt. Die Freisetzungsraten pro Tag aus 1 g Mikropartikeln und die jeweils zugehörige Beladung pro 1 g Mikropartikel ist in Tabelle 4-9 zusammengefasst.

Tabelle 4-9: Beladung [ $\mu\text{g}$ ] mit Lysozym pro 1 g Mikropartikel und durchschnittliche Freisetzungsraten [ $\mu\text{g}$ ] in Humanserum pro 24 h jeweils pro g Mikropartikel nach der initialen Freisetzung von 48 h

Charge	Beladung [ $\mu\text{g}$ ] pro 1 g Mikropartikel	Standardabweichung der Beladung [ $\mu\text{g}$ ]	Freisetzungsraten pro 24 h [ $\mu\text{g}$ ] aus 1 g Mikropartikel
DS 1,5-0 % Saccharose	2591	486	3,36
DS 7,8-0 % Saccharose	2241	316	2,88
DS 1,5-10 % Saccharose	709	11	0,57
DS 7,8-10 % Saccharose	757	38	0,65

Damit unterscheidet sich das Freisetzungsprofil von Lysozym in Humanserum sehr stark von dem in Phosphatpuffer. Diese Schlussfolgerung läßt sich bestätigen, indem die kumulativ freigesetzte Lysozymmenge wiederum gegen die Wurzel der Zeit aufgetragen wird (Abbildung 4-39). Tabelle 4-10 zeigt die zugehörigen Higuchi-Gleichungen und Bestimmtheitsmaße.

Es ist ersichtlich, dass die Steigungen und damit die Freisetzungsgeschwindigkeiten bei allen vier Chargen um einen Wert von 0,1 schwanken und damit nahezu gleich sind. Bei den saccharosefreien Mikropartikelchargen zeigt sich ein geringfügiger Unterschied bzgl. der Geschwindigkeiten: Die saccharosefreien Mikropartikel setzen das Lysozym geringfügig schneller frei, was wiederum durch die Wasserstoffbrücken-Bindung von Lysozym und Saccharose in den saccharosehaltigen Mikropartikeln zu erklären ist. Die endgültig freigesetzte Lysozymmenge ist allein vom Ausmaß der initialen Freisetzung abhängig und nahezu unabhängig vom Substitutionsgrad und dem Saccharosegehalt

*Tabelle 4-10: Higuchi-Gleichungen und Bestimmtheitsmaße der Freisetzung von Fluoreszenz-Lysozym in Humanserum*

Charge	Higuchi-Gleichung	r <sup>2</sup>
DS_1,5 0% Saccharose	$\frac{M_t}{M_\infty} = 0,166 \cdot \sqrt{t} + 8,034$	0,9348
DS_7,8 0% Saccharose	$\frac{M_t}{M_\infty} = 0,124 \cdot \sqrt{t} + 4,616$	0,957
DS_1,5 10% Saccharose	$\frac{M_t}{M_\infty} = 0,096 \cdot \sqrt{t} + 6,608$	0,8813
DS_1,5 10% Saccharose	$\frac{M_t}{M_\infty} = 0,122 \cdot \sqrt{t} + 5,671$	0,9495

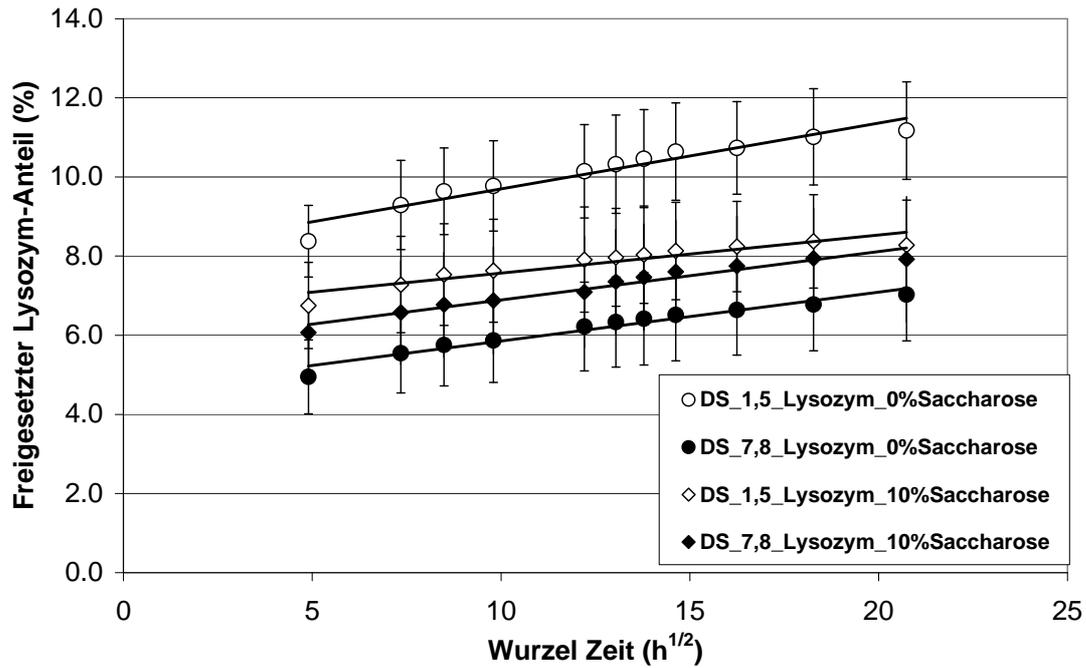


Abbildung 4-39: Kumulative Freisetzung von Fluoreszenz-Lysozym in Humanserum in Abhängigkeit von der Wurzel der Zeit  
( $n = 3$ , Fehlerbalken = Standardabweichung)

Betrachtet man die nach dem Power Law ausgewerteten Freisetzungskurven anhand von Abbildung 4-40 und Tabelle 4-11, wird deutlich, dass die Bestimmtheitsmaße mit Werten zwischen 0,97 und 0,99 sehr nahe an 1 liegen, d. h. die Kurvenanpassung an dieses Rechenmodell sehr gut geeignet ist. Die Freisetzungsgeschwindigkeit ist mit Exponentenwerten von 0,076 bis 0,119 allerdings unerwartet niedrig. Die Vermutung, dass die Freisetzung in Humanserum durch die enthaltenen Enzyme und damit die Erosion des Hydrogelgerüsts deutlich schneller stattfindet als in Phosphatpuffer pH 7, kann nicht bestätigt werden. Auch hier ist der Trend zu beobachten, dass Lysozym aus saccharosehaltigen Mikropartikeln geringfügig langsamer freigesetzt wird.

Tabelle 4-11: Power Law und Bestimmtheitsmaße der Freisetzung von Fluoreszenz-Lysozym in Humanserum

Charge	Power Law	$r^2$
DS_1,5 0% Saccharose	$\lg \frac{M_t}{M_\infty} = 0,098 \cdot \lg t + 0,793$	0,9889
DS_7,8 0% Saccharose	$\lg \frac{M_t}{M_\infty} = 0,119 \cdot \lg t + 0,530$	0,996
DS_1,5 10% Saccharose	$\lg \frac{M_t}{M_\infty} = 0,076 \cdot \lg t + 0,727$	0,9726
DS_1,5 10% Saccharose	$\lg \frac{M_t}{M_\infty} = 0,099 \cdot \lg t + 0,640$	0,9786

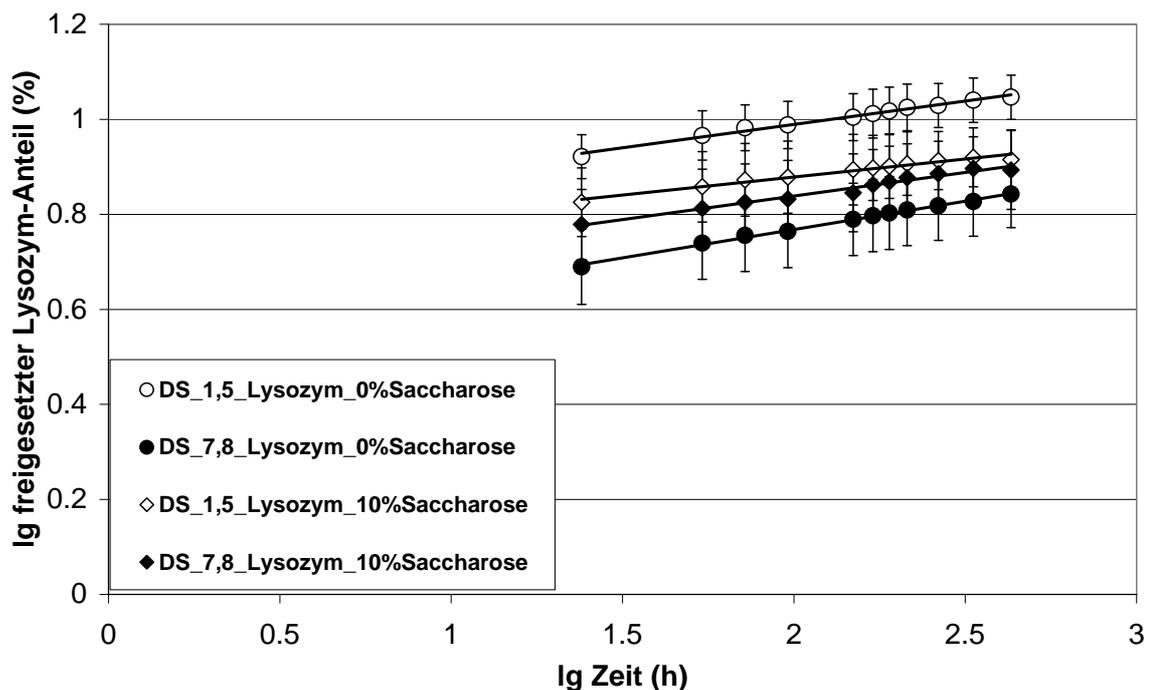


Abbildung 4-40: Logarithmus des kumulativ freigesetzten Fluoreszenz-Lysozymanteils in Humanserum in Abhängigkeit vom Logarithmus der Zeit  
( $n = 3$ , Fehlerbalken = Standardabweichung)

Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung könnte eine Komplexbildung von Lysozym mit im Humanserum enthaltenen Globulinen sein, auf die im Kapitel 4.2.5 noch näher eingegangen wird. Es ist vorstellbar, dass mit der Zeit Globuline in die gequollene Hydrogelmatrix eindringen, sich

dort mit dem Lysozym verbinden und es so zur Ausbildung eines Proteinkomplexes mit einem deutlich erhöhten Molekulargewicht und damit Moleküldurchmesser kommt. Dadurch wird die Diffusionsgeschwindigkeit des Komplexes innerhalb des Netzwerks herabgesetzt.

Betrachtet man die Freisetzungsdaten von Lysozym in Phosphatpuffer pH 7 und in Humanserum im direkten Vergleich wird klar, dass die absolut freigesetzte Menge Lysozym in Humanserum größer ist. Dies ist hauptsächlich mit der unterschiedlich hohen Initialfreisetzung zu erklären. Allerdings ist die Freisetzungsgeschwindigkeit in Humanserum deutlich geringer. Beim Vergleich der Steigungen aus dem Quadratwurzelgesetz nach Higuchi (im Weiteren als  $m_{\text{Hig}}$  bezeichnet) in Phosphatpuffer pH 7 und Humanserum wird der Unterschied deutlich: Während die  $m_{\text{Hig}}$  in Phosphatpuffer pH 7 zwischen 0,152 und 0,204 liegen, sind die  $m_{\text{Hig}}$  in Humanserum mit Werten zwischen 0,096 und 0,166 deutlich geringer.

#### 4.2.4.3 Freisetzung von FITC-Dextran in Phosphatpuffer pH 7

In Abbildung 4-41 ist die kumulativ freigesetzte FITC-Dextranmenge über der Zeit aufgetragen.

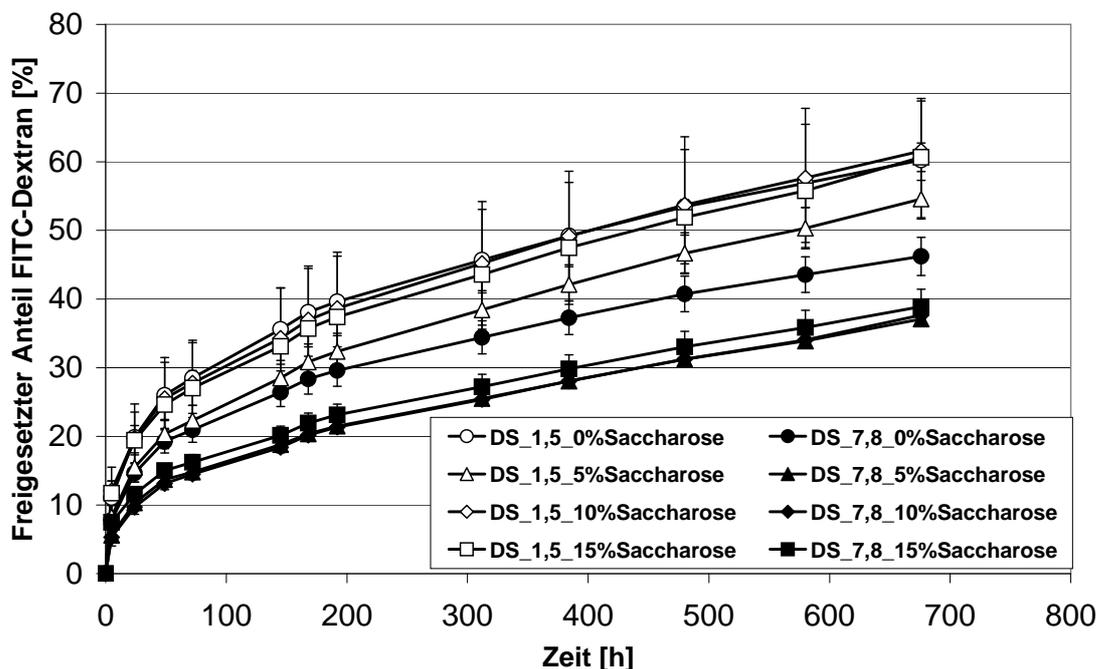


Abbildung 4-41: Kumulative Freisetzung von FITC-Dextran in Phosphatpuffer pH 7 in Abhängigkeit von der Zeit ( $n = 3$ , Fehlerbalken = Standardabweichung)

Eine deutliche Abhängigkeit der Freisetzungsgeschwindigkeit vom Saccharosegehalt ist nicht zu erkennen.

Es kommt bei allen 8 Chargen zu einer gleichmäßigen Freisetzung nahezu ohne eine größere initiale Freisetzung. Weiterhin ist deutlich zu erkennen, dass FITC-Dextran aus Mikropartikeln mit geringerem Vernetzungsgrad deutlich schneller freigesetzt wird als aus jenen, die einen höheren Vernetzungsgrad aufweisen. Somit ähnelt die Freisetzung von FITC-Dextran in Phosphatpuffer pH 7 dem Freisetzungsprofil von Fluoreszenz-Lysozym (siehe Kapitel 4.2.4.1) in Phosphatpuffer pH 7.

Auch hier ist ab einem Zeitpunkt von 48 h die Freisetzung nahezu linear. Tabelle 4-12 fasst die Beladung [ $\mu\text{g}$ ] und die Freisetzungsraten [ $\mu\text{g}$ ] pro Tag von jeweils 1 g Mikropartikel nach der initialen Freisetzung von 48 h zusammen. Je höher der Saccharosegehalt, desto kleiner ist erwartungsgemäß die Beladung pro 1 g Mikropartikel-Endprodukt und desto kleiner sind auch die Freisetzungsraten pro 24 h.

*Tabelle 4-12: Beladung [ $\mu\text{g}$ ] mit FITC-Dextran und durchschnittliche Freisetzungsraten [ $\mu\text{g}$ ] in Phosphatpuffer pH 7 pro 24 h jeweils pro 1 g Mikropartikel nach der initialen Freisetzung von 48 h*

<b>Charge</b>	<b>Beladung [<math>\mu\text{g}</math>] pro 1 g Mikropartikel</b>	<b>Standardabweichung der Beladung [<math>\mu\text{g}</math>]</b>	<b>Freisetzungsrate pro 24 h [<math>\mu\text{g}</math>] aus 1 g Mikropartikel</b>
DS 1,5-FITC-0 % Saccharose	1020,7	24,0	12,96
DS 7,8-FITC-0 % Saccharose	976,7	34,4	9,96
DS 1,5-FITC-5 % Saccharose	436,1	18,3	5,55
DS 7,8-FITC-5 % Saccharose	449,2	7,4	3,92
DS 1,5-FITC-10 % Saccharose	262,6	32,9	3,44
DS 7,8-FITC-10 % Saccharose	301,3	16,5	2,70
DS 1,5-FITC-15 % Saccharose	206,7	4,9	2,70
DS 7,8-FITC-15 % Saccharose	198,9	8,8	1,77

Abbildung 4-42 zeigt den freigesetzten FITC-Dextran-Anteil gegen die Wurzel der Zeit und Tabelle 4-13 fasst die zugehörigen Higuchi-Gleichungen und Bestimmtheitsmaße zusammen.

*Tabelle 4-13: Higuchi-Gleichungen und Bestimmtheitsmaße der Freisetzung von FITC-Dextran in Phosphatpuffer pH 7*

<b>Charge</b>	<b>Higuchi-Gleichung</b>	<b>r<sup>2</sup></b>
DS_1,5_0 % Saccharose	$\frac{M_t}{M_\infty} = 1,962 \cdot \sqrt{t} + 10,76$	0,9875
DS_7,8_0 % Saccharose	$\frac{M_t}{M_\infty} = 1,537 \cdot \sqrt{t} + 7,24$	0,9904
DS_1,5_5 % Saccharose	$\frac{M_t}{M_\infty} = 1,858 \cdot \sqrt{t} + 6,09$	0,9969
DS_7,8_5 % Saccharose	$\frac{M_t}{M_\infty} = 1,257 \cdot \sqrt{t} + 3,86$	0,9967
DS_1,5_10 % Saccharose	$\frac{M_t}{M_\infty} = 2,000 \cdot \sqrt{t} + 10,06$	0,9958
DS_7,8_10 % Saccharose	$\frac{M_t}{M_\infty} = 1,294 \cdot \sqrt{t} + 3,17$	0,997
DS_1,5_15 % Saccharose	$\frac{M_t}{M_\infty} = 1,946 \cdot \sqrt{t} + 9,68$	0,9959
DS_7,8_15 % Saccharose	$\frac{M_t}{M_\infty} = 1,275 \cdot \sqrt{t} + 5,23$	0,998

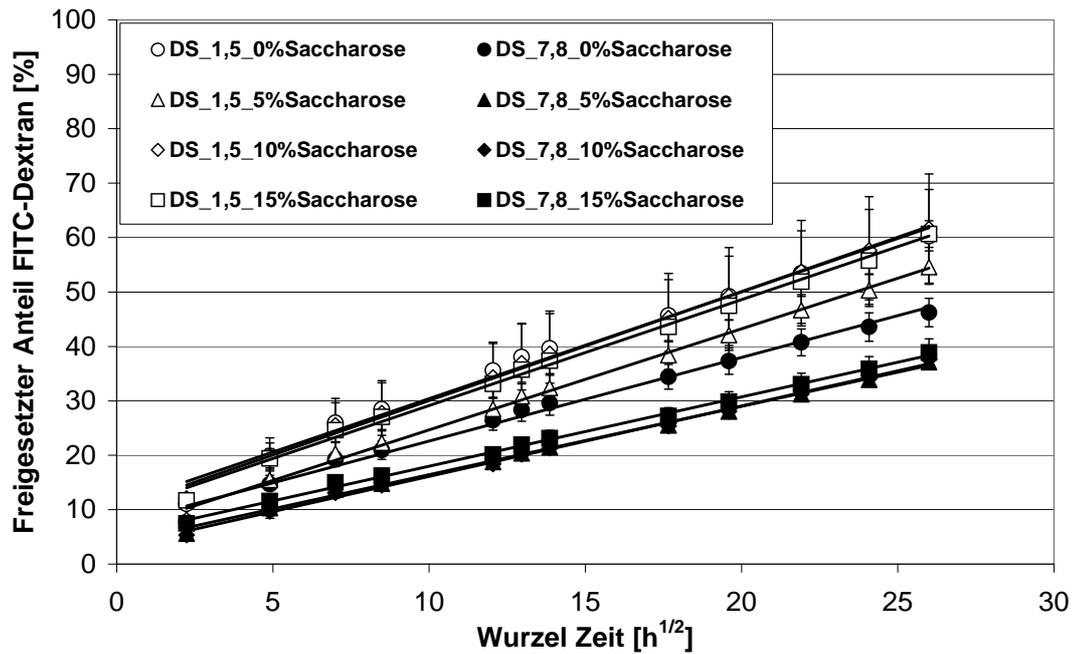


Abbildung 4-42: Kumulative Freisetzung von FITC-Dextran in Phosphatpuffer pH 7 in Abhängigkeit von der Wurzel der Zeit ( $n = 3$ , Fehlerbalken = Standardabweichung)

Die Freisetzungsgeschwindigkeiten der Mikropartikel mit einem DS von 1,5 und dem DS von 7,8 unterscheiden sich, unabhängig vom Saccharosegehalt, um ca. das 1,5-fache. Das heißt, dass FITC-Dextran aus einem niedriger vernetzten Gelgerüst ca. 1,5-mal so schnell freigesetzt wird wie aus dem höher vernetzten Gelgerüst. Vergleicht man die Steigungen der Geraden der Mikropartikel mit unterschiedlichem Saccharosegehalt, wird ersichtlich, dass die Mikropartikel das FITC-Dextran gleich schnell freisetzen und dass die Saccharosekonzentration offenbar keinen Einfluss auf die Freisetzungsgeschwindigkeit von FITC-Dextran hat. Dies deutet darauf hin, dass FITC-Dextran, im Gegensatz zu Lysozym, offenbar keine merkliche Wasserstoffbrückenbindung mit Saccharose eingeht.

Bei der Betrachtung der in Abbildung 4-43 dargestellten Freisetzung nach dem Power Law und der zugehörigen Tabelle 4-14 ist zu erkennen, dass die Power Law-Exponenten sich in einem Bereich von 0,33 bis 0,39 bewegen. Daraus kann geschlossen werden, dass alle Mikropartikel das FITC-Dextran durch den gleichen Mechanismus freisetzen.

*Tabelle 4-14: Power Law und Bestimmtheitsmaße der Freisetzung von FITC-Dextran in Phosphatpuffer pH 7*

<b>Charge</b>	<b>Power Law</b>	<b>r<sup>2</sup></b>
DS_1,5_0 % Saccharose	$\lg \frac{M_t}{M_\infty} = 0,340 \cdot \lg t + 0,817$	0,9983
DS_7,8_0 % Saccharose	$\lg \frac{M_t}{M_\infty} = 0,355 \cdot \lg t + 0,660$	0,9975
DS_1,5_5 % Saccharose	$\lg \frac{M_t}{M_\infty} = 0,377 \cdot \lg t + 0,654$	0,9982
DS_7,8_5 % Saccharose	$\lg \frac{M_t}{M_\infty} = 0,377 \cdot \lg t + 0,480$	0,9968
DS_1,5_10 % Saccharose	$\lg \frac{M_t}{M_\infty} = 0,333 \cdot \lg t + 0,828$	0,9976
DS_7,8_10 % Saccharose	$\lg \frac{M_t}{M_\infty} = 0,393 \cdot \lg t + 0,438$	0,9972
DS_1,5_15 % Saccharose	$\lg \frac{M_t}{M_\infty} = 0,330 \cdot \lg t + 0,827$	0,9969
DS_7,8_15 % Saccharose	$\lg \frac{M_t}{M_\infty} = 0,336 \cdot \lg t + 0,608$	0,9917

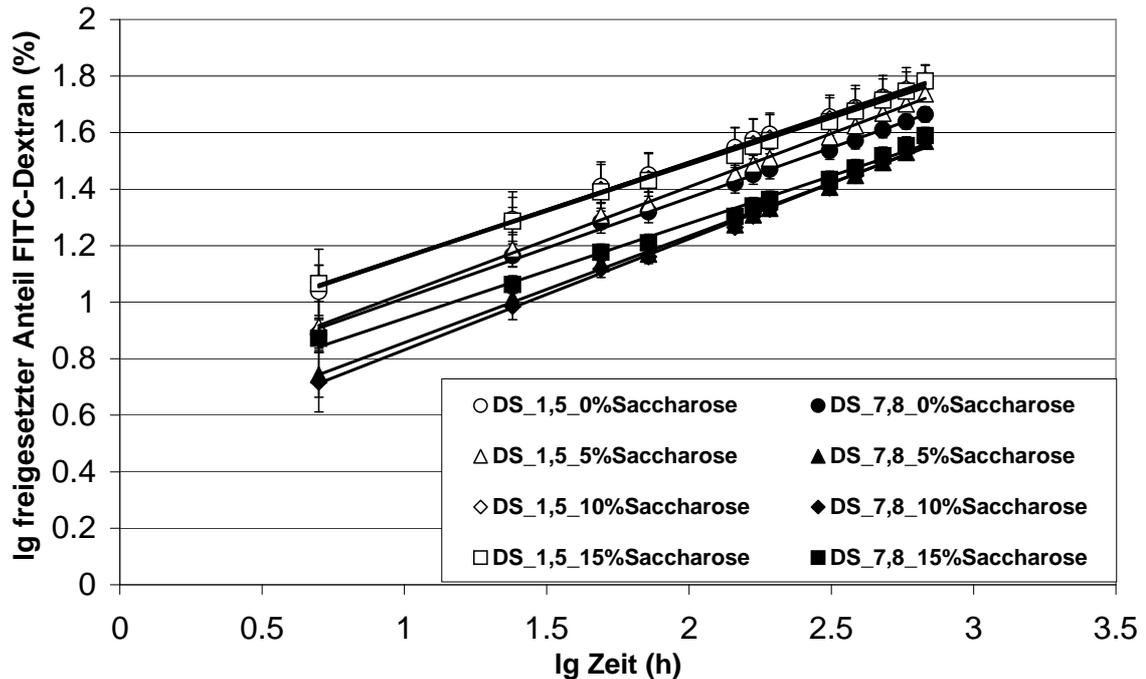


Abbildung 4-43: *Logarithmus des kumulativ freigesetzten FITC-Dextran-Anteils in Phosphatpuffer pH 7 in Abhängigkeit vom Logarithmus der Zeit (n = 3, Fehlerbalken = Standardabweichung)*

Die unterschiedlich substituierten Mikropartikelchargen unterscheiden sich dahingehend, dass aus den Mikropartikeln mit niedrigerem Substitutionsgrad FITC-Dextran schneller freigesetzt wird (durch  $m_{\text{Hig}}$  zu erkennen) und durch die unterschiedlich hohe Anfangsfreisetzung auch mehr FITC-Dextran freigesetzt wird. Die Exponenten des Power Law von 0,33 bis 0,39 deuten auf eine leicht behinderte Fick'sche Diffusion hin, bei der sich der Quellungsstatus der Matrix offenbar kaum verändert. Möglicherweise ist die Fick'sche Diffusion behindert.

#### 4.2.4.4 Freisetzung von FITC-Dextran in Humanserum

Abbildung 4-44 zeigt die Freisetzung von FITC-Dextran in Humanserum. Die Freisetzung erfolgt gleichmäßig und ohne einen Burst release. Nach 500 Stunden sind ca. 70 % des FITC-Dextrans aus den niedriger substituierten Mikropartikeln freigesetzt worden, jedoch nur ca. 45 % aus den Mikropartikeln mit dem höheren Substitutionsgrad.

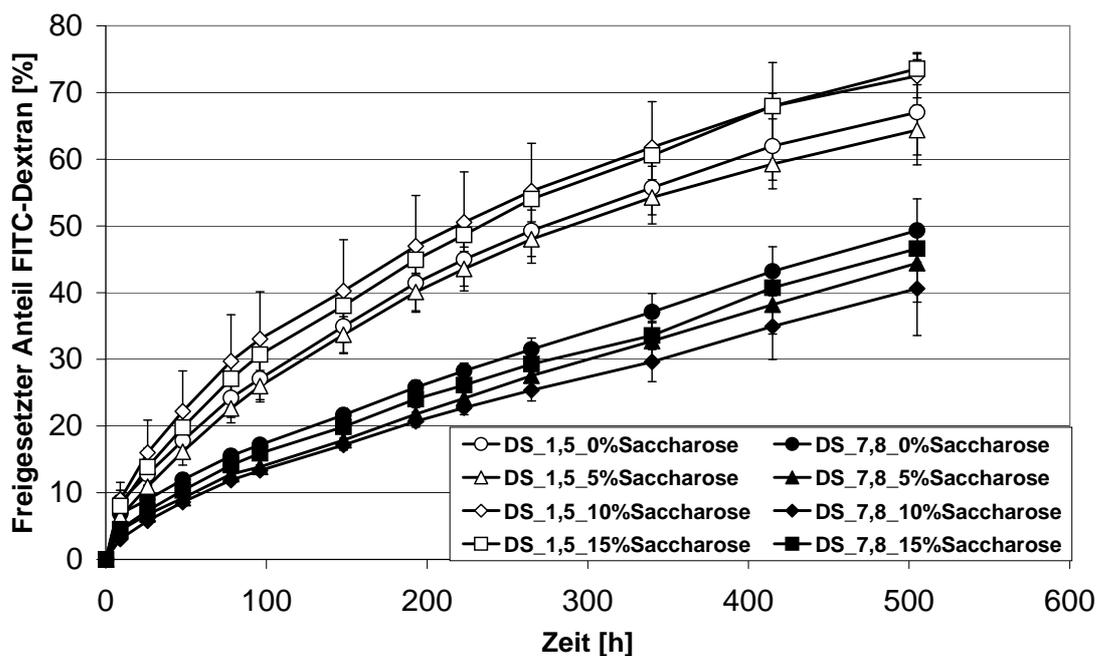


Abbildung 4-44: Kumulative Freisetzung von FITC-Dextran in Humanserum in Abhängigkeit von der Zeit ( $n = 3$ , Fehlerbalken = Standardabweichung)

Die geringer vernetzten Mikropartikel geben das FITC-Dextran auch hier mit einem Faktor von ca. 1,5 schneller frei als die höher vernetzten Mikropartikel, was sowohl in Abbildung 4-44 als auch in Tabelle 4-15 deutlich zu sehen ist.

In Analogie zur FITC-Dextran-Freisetzung in Phosphatpuffer werden die Beladung [ $\mu\text{g}$ ] und die Freisetzungsraten pro 24 h [ $\mu\text{g}$ ] gegenübergestellt (Tabelle 4-17). Es ist auch hier mit zunehmendem Saccharoseanteil eine sinkende Freisetzungsraten pro 24 h zu erkennen.

Tabelle 4-15: Beladung [ $\mu\text{g}$ ] mit FITC-Dextran und durchschnittliche Freisetzungsraten [ $\mu\text{g}$ ] in Humanserum pro 24 h jeweils pro 1 g Mikropartikel nach der initialen Freisetzung von 48 h

Charge	Beladung [ $\mu\text{g}$ ] pro 1 g Mikropartikel	Standardabweichung der Beladung [ $\mu\text{g}$ ]	Freisetzungsraten pro 24 h [ $\mu\text{g}$ ] aus 1 g Mikropartikel
DS 1,5-FITC-0 % Saccharose	1020,7	24,0	29,16
DS 7,8-FITC-0 % Saccharose	976,7	34,4	19,56

Charge	Beladung [ $\mu\text{g}$ ] pro 1 g Mikropartikel	Standardabweichung der Beladung [ $\mu\text{g}$ ]	Freisetzungsrates pro 24 h [ $\mu\text{g}$ ] aus 1 g Mikropartikel
DS 1,5-FITC-5 % Saccharose	436,1	18,3	12,24
DS 7,8-FITC-5 % Saccharose	449,2	7,4	8,38
DS 1,5-FITC-10 % Saccharose	262,6	32,9	7,68
DS 7,8-FITC-10 % Saccharose	301,3	16,5	5,06
DS 1,5-FITC-15 % Saccharose	206,7	4,9	6,36
DS 7,8-FITC-15 % Saccharose	198,9	8,8	3,77

Vergleicht man nun beispielsweise die Freisetzung von FITC-Dextran in Phosphatpuffer mit der in Humanserum zum Zeitpunkt  $t = 500$  Stunden, erhält man einen mittleren freigesetzten Anteil von 30 bis 53 % in Phosphatpuffer pH 7, wohingegen nach dieser Zeit im Mittel 40 bis 75 % FITC-Dextran in Humanserum freigesetzt werden. Der Grund für dieses Phänomen beruht auf dem Vorhandensein von zusätzlich im Humanserum vorhandenen hydrogelgerüst-abbauenden Enzymen. Es ist auch hier wiederum keine Abhängigkeit des Freisetzungsverhaltens vom Saccharosegehalt zu erkennen; die Steigungen der Geraden (Abbildung 4-45) mit unterschiedlichem Saccharosegehalt sind nahezu gleich.

*Tabelle 4-16: Higuchi-Gleichungen und Bestimmtheitsmaße der Freisetzung von FITC-Dextran in Humanserum*

Charge	Higuchi-Gleichung	$r^2$
DS_1,5_0 % Saccharose	$\frac{M_t}{M_\infty} = 3,151 \cdot \sqrt{t} - 2,81$	0,9974
DS_7,8_0 % Saccharose	$\frac{M_t}{M_\infty} = 2,197 \cdot \sqrt{t} - 3,09$	0,9824
DS_1,5_5 % Saccharose	$\frac{M_t}{M_\infty} = 3,130 \cdot \sqrt{t} - 4,25$	0,9971
DS_7,8_5 % Saccharose	$\frac{M_t}{M_\infty} = 2,050 \cdot \sqrt{t} - 4,86$	0,9794

Charge	Higuchi-Gleichung	r <sup>2</sup>
DS_1,5_10 % Saccharose	$\frac{M_t}{M_\infty} = 3,346 \cdot \sqrt{t} - 0,34$	0,9977
DS_7,8_10 % Saccharose	$\frac{M_t}{M_\infty} = 1,896 \cdot \sqrt{t} - 4,57$	0,9884
DS_1,5_15 % Saccharose	$\frac{M_t}{M_\infty} = 3,467 \cdot \sqrt{t} - 3,38$	0,9990
DS_7,8_15 % Saccharose	$\frac{M_t}{M_\infty} = 2,133 \cdot \sqrt{t} - 4,36$	0,9852

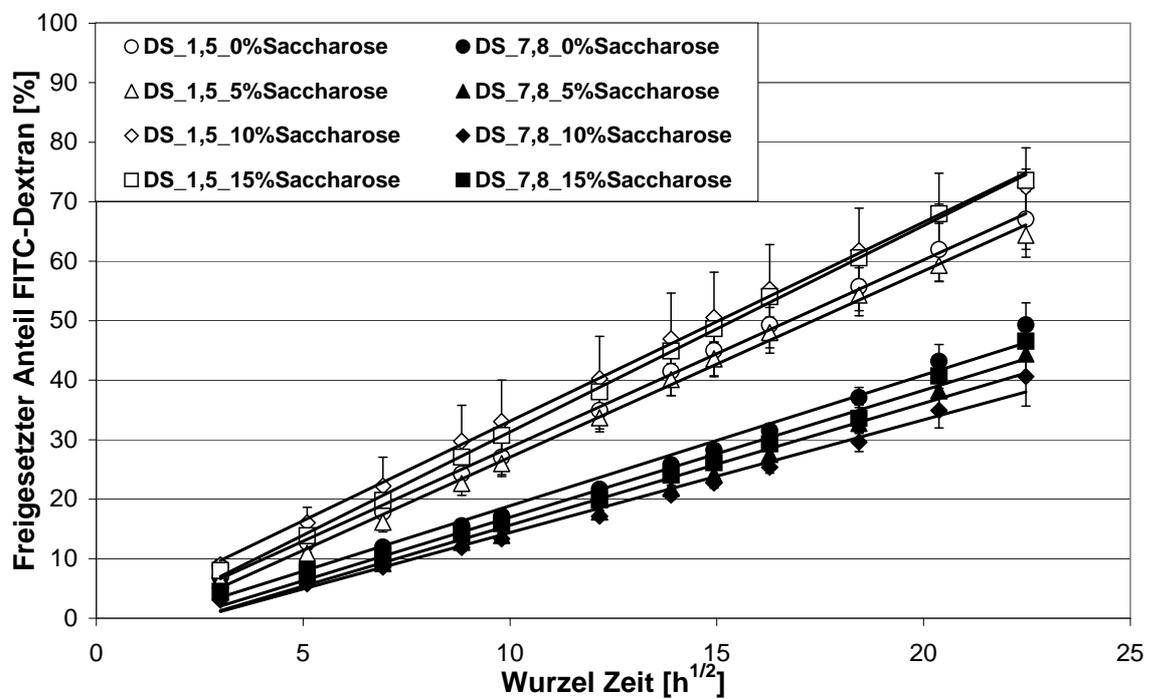


Abbildung 4-45: Kumulative Freisetzung von FITC-Dextran in Humanserum in Abhängigkeit von der Wurzel der Zeit (n = 3, Fehlerbalken = Standardabweichung)

Trägt man den Logarithmus des freigesetzten FITC-Dextrananteils gegen den Logarithmus der Zeit auf, ergeben sich die in Abbildung 4-46 und Tabelle 4-17 dargestellten Ergebnisse.

Tabelle 4-17: Power Law und Bestimmtheitsmaße der Freisetzung von FITC-Dextran in Humanserum

Charge	Power Law	r <sup>2</sup>
DS_1,5_0 % Saccharose	$\lg \frac{M_t}{M_\infty} = 0,539 \cdot \lg t + 0,373$	0,9945
DS_7,8_0 % Saccharose	$\lg \frac{M_t}{M_\infty} = 0,513 \cdot \lg t + 0,254$	0,9783
DS_1,5_5 % Saccharose	$\lg \frac{M_t}{M_\infty} = 0,603 \cdot \lg t + 0,207$	0,9973
DS_7,8_5 % Saccharose	$\lg \frac{M_t}{M_\infty} = 0,587 \cdot \lg t + 0,012$	0,9884
DS_1,5_10 % Saccharose	$\lg \frac{M_t}{M_\infty} = 0,532 \cdot \lg t + 0,444$	0,9985
DS_7,8_10 % Saccharose	$\lg \frac{M_t}{M_\infty} = 0,636 \cdot \lg t + 0,133$	0,9993
DS_1,5_15 % Saccharose	$\lg \frac{M_t}{M_\infty} = 0,569 \cdot \lg t + 0,346$	0,9990
DS_7,8_15 % Saccharose	$\lg \frac{M_t}{M_\infty} = 0,588 \cdot \lg t + 0,043$	0,9951

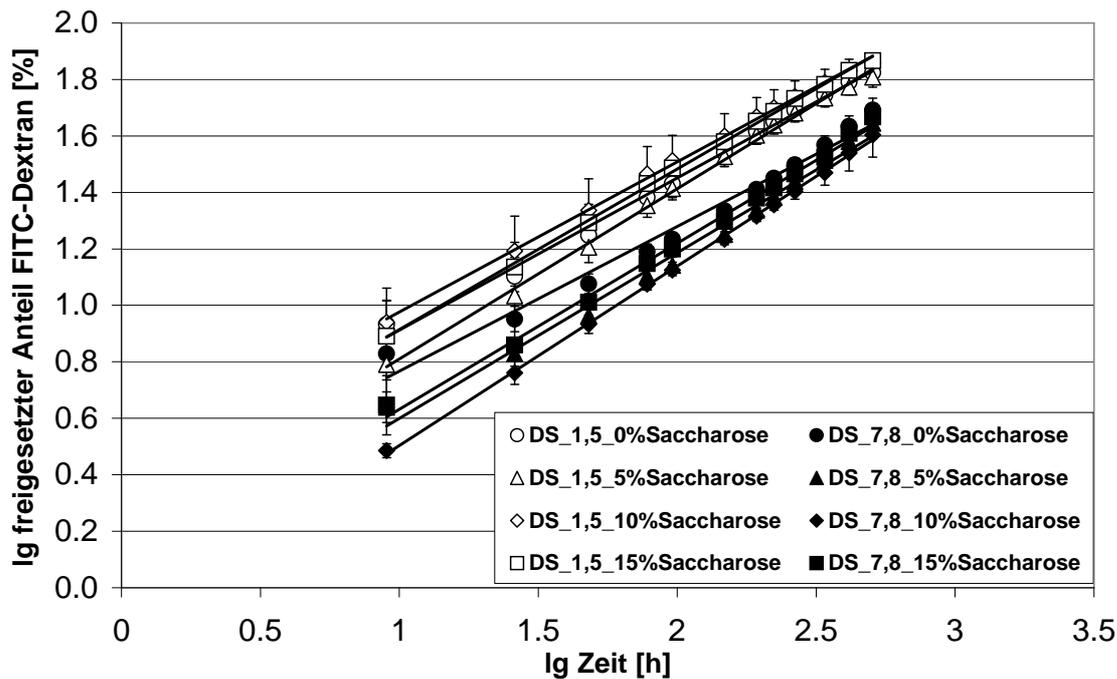


Abbildung 4-46: *Logarithmus des kumulativ freigesetzten FITC-Dextran-Anteils in Humanserum in Abhängigkeit vom Logarithmus der Zeit*  
( $n = 3$ , Fehlerbalken = Standardabweichung)

Auch hier zeigt sich, dass mehr FITC-Dextran aus den niedriger substituierten Mikropartikeln freigesetzt wird. Der Saccharosegehalt hat keine Auswirkungen auf die Freisetzung. Die Exponenten  $n$ , die sich aus dem Power Law ergeben, liegen mit Werten zwischen 0,51 und 0,64 sehr nahe an 0,5 und damit an einer Fick'schen Diffusion, was auch wiederum unabhängig vom Saccharosegehalt ist. Da die Exponenten z. T. größer als 0,5 sind, ist offensichtlich, dass auch die Erosion an der Freisetzung beteiligt ist.

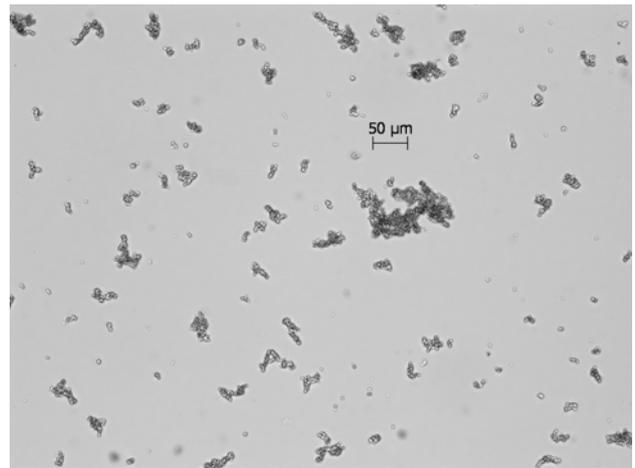
#### 4.2.5 Verhalten von Lysozym gegenüber Bestandteilen des Humanserums

Zur weiteren Abklärung der atypischen Freisetzungskurven von Lysozym in Humanserum (siehe Kapitel 4.2.4.2) wird das Verhalten von Lysozym in Humanserum überprüft, indem lichtmikroskopische Bilder angefertigt und eine Gelpermeations-Chromatographie (GPC) durchgeführt werden. Dies dient der Überprüfung, ob und in welchem Ausmaß Lysozym mit Bestandteilen des Humanserums interagiert und ob die unerwarteten Ergebnisse des Freisetzungsversuchs von Lysozym in Humanserum damit erklärt werden können.

Zur Überprüfung einer möglichen Komplexbildung von Lysozym mit Globulinen oder Albumin, werden die Proben wie in Kapitel 3.4.6 beschrieben vorbereitet. Auffällig dabei ist, dass bereits während der Herstellung der Lösung von 5 mg/ml Lysozym in 1/10 verdünntem Humanserum sofort ein weißer Niederschlag ausfällt (Abbildung 4-47). Diese Lösung wird anschließend lichtmikroskopisch untersucht. Dabei zeigt sich das in Abbildung 4-48 dargestellte Ergebnis. Bei dem entstehenden Niederschlag handelt es sich um unregelmäßig geformte Aggregate mit einer Größe von 5 – 100 µm. Dieser Niederschlag ist nicht reversibel.



*Abbildung 4-47:*  
Klare, leicht opaleszierende Verdünnung des Humanserums (links), klare Lösung von Lysozym (Mitte) und Niederschlagsbildung von Lysozym in Humanserum (rechts)



*Abbildung 4-48:*  
Mikroskopische Aufnahme der spontan gebildeten Aggregate der Lösung von 5 mg/ml Lysozym in Humanserum

Der entstandenen Niederschlag wird bei der – für den Lauf über die Chromatographie-Säule notwendigen – Filtration der Lösung durch einen Sterilfilter mit einer Porengröße von 0,22 µm vollständig abgetrennt, das Filtrat ist klar. Aus diesem Grund ist für dieses gebildete Aggregat und für das Protein, mit dem der Komplex gebildet wird, kein Peak im Gelpermeations-Chromatogramm zu erwarten.

Die Chromatogramme aller drei Lösungen werden zur besseren Veranschaulichung übereinander gelegt und dabei wird das in Abbildung 4-49 dargestellte Chromatogramm erhalten.

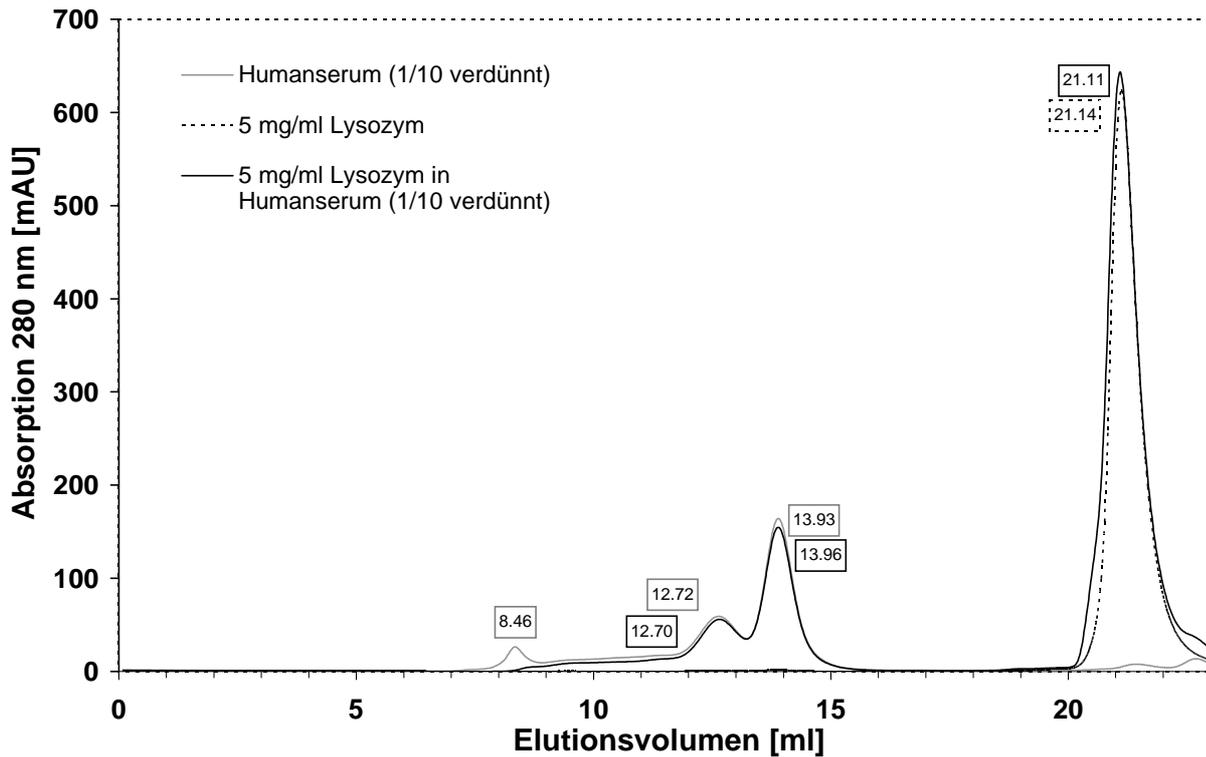


Abbildung 4-49: Gelpermeations-Chromatogramm der untersuchten Proteinlösungen

Um das Verhalten von Lysozym gegenüber Humanserum einschätzen zu können, ist es wichtig, dessen Zusammensetzung und die isoelektrischen Punkte der Bestandteile zu kennen. Humanserum ist der flüssige Anteil des Blutes und setzt sich zusammen aus 91 % Wasser, 2 % einer Mischung aus Elektrolyten, Nährstoffen und Hormonen und 7 % Proteinen. Die Proteinfraction setzt sich wie in Tabelle 4-18 beschrieben zusammen und weist die angegebenen isoelektrischen Punkte auf:

Tabelle 4-18: Übersicht der Proteine im Humanserum mit Angabe der isoelektrischen Punkte

Protein	Anteil an der Proteinfraction (%)	Isoelektrischer Punkt	Quelle
Albumin	63	4,7 – 4,8	Wieland et al., 1953
$\alpha$ 1-Globuline	3	5,8 $\rightarrow$ 7,3	Roche Lexikon Medizin, 2003 Huang et al., 2006
$\alpha$ 2-Globuline	7		
$\beta$ -Globuline	9		
$\gamma$ -Globuline	17		

Mit Hilfe dieser Kenntnis, der Kalibriergeraden (vgl. Abbildung 3-6) und gemäß den Angaben von PAA Laboratories (2009) können alle Peaks den entsprechenden Protein-Fractionen zugeordnet werden. Diese sind in Tabelle 4-19 zusammengefasst.

*Tabelle 4-19: Zuordnung der Gelpermeations-Chromatogramm-Peaks zu den entsprechenden Proteinfraktionen*

Elutionsvolumen (ml)	8,46	9 bis 12,70 – 12,72	13,93 – 13,96	21,11 – 21,14
Proteinfraktion	Globulin-Pentamere und übergeordnete Strukturen	Globulin-Monomere	Albumin	Lysozym

Auffällig ist, dass alle Peaks, bis auf denjenigen bei einem Elutionsvolumen von 8,46 ml, erwartungsgemäß übereinstimmen. Während der Peak bei 8,46 ml im untersuchten reinen Humanserum auftritt, fehlt er in der Mischung aus Lysozym und Humanserum. In der Literatur finden sich mehrere Hinweise darauf, dass Lysozym mit Immunglobulinen des Blutes Komplexe bildet (Virella, 1975; Sharon & Eshdan, 1974; Finkle et al., 1973; Oldfield, 2001). Globuline (insbes.  $\alpha_2$  und  $\gamma$ -Globuline) weisen einen hohen Glykoprotein-Anteil in den Kohlehydratseitenketten der Globuline auf (Clamp & Johnson, 1971; Buddecke, 1971). Dieser besteht hauptsächlich aus N-Acetyl-d-Glucosamin-Resten, an welchen sich Lysozym anlagert und mit diesen Komplexe bildet. Nach Finkle et al. (1973) geschieht dies vorrangig mit IgG (Untergruppe der  $\gamma$ -Globuline).

Durch diese Komplexbildung kann die sehr geringe Freisetzungsgeschwindigkeit von Lysozym in Humanserum erklärt werden: Bedingt durch die Größe der Komplexe aus Lysozym und Globulinen, die nach dem Eindringen des Humanserums in die Gelmatrix in den Zwischenräumen der Hydrogelmatrix gebildet werden, ist die Diffusionsgeschwindigkeit gegenüber reinem Lysozym stark herabgesetzt und die Freisetzungsgeschwindigkeit ist geringer.

#### **4.2.6 Netzwerk-Maschenweite**

Bei der Abschätzung der Netzwerk-Maschenweite kann davon ausgegangen werden, dass – bei konstanter Proteinfreisetzung aus den Mikropartikeln – die Hohlräume innerhalb des Netzwerks mindestens so groß sein müssen wie das Protein selbst, vorausgesetzt, die Erosion des Hydrogels ist

von untergeordneter Bedeutung. Wären die Zwischenräume zwischen den Polymerketten kleiner, würde sich das Netzwerk um das Protein herum ausbilden und das Protein wäre fest eingeschlossen, so dass keine Freisetzung stattfinden würde. Erst durch größere Zwischenräume im Netzwerk als der Proteindurchmesser selbst kann das Protein ungehindert diffundieren. Voraussetzung für diese Annahme ist, dass während des Untersuchungszeitraumes keine nennenswerte Erosion des Hydrogel-Gerüsts stattfindet.

Setzt man alle in Kapitel 3.4.7 aufgeführten notwendigen Parameter in die Gleichung von Einstein-Stokes ein, erhält man für Lysozym einen hydrodynamischen Durchmesser von 4,12 nm.

#### 4.2.7 Diffusionskoeffizient von Lysozym im Hydrogel

Zur Berechnung des Diffusionskoeffizienten von Lysozym in Hydrogelen wird u. a. der Radius der Mikropartikel benötigt. Da nur die Partikelgrößenmessung von saccharosefreien Mikropartikeln sinnvoll erscheint (siehe Kapitel 4.2.2), wird hier exemplarisch nur der Diffusionskoeffizient der saccharosefreien Systeme beider unterschiedlich substituierter Mikropartikelchargen sowohl in Phosphatpuffer als auch in Humanserum gezeigt.

Da der initial freigesetzte Anteil des Lysozyms nicht durch Diffusion aus den Mikropartikeln freigesetzt wird (Franssen et al., 1999; Zhang & Chu, 2002), wird dieser von der freigesetzten Lysozymmenge abgezogen. Berechnet wird dieser initiale Anteil aus dem Power Law.

Die in Tabelle 4-20 und Tabelle 4-21 aufgeführten Werte werden in die Gleichung nach Baker et al., 1974 (vgl. Kapitel 3.4.8) eingesetzt und für die Berechnung des Diffusionskoeffizienten  $D_m$  verwendet.

*Tabelle 4-20: Beispiele für Werte und Ergebnisse zur Berechnung der Diffusionskoeffizienten von Lysozym in Phosphatpuffer pH 7*

	<b>Radius (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	<b>Initial- freiset- zung (%)</b>	<b><math>M_\infty</math> (%)</b>	<b><math>M_t</math> (%)</b>	<b>Zeit (h)</b>	<b><math>M_t</math> abzügl. Initialfrei- setzung (%)</b>	<b><math>D_m</math> (<math>\mu\text{m}^2/\text{h}</math>)</b>	<b><math>D_m</math> (<math>\text{m}^2/\text{s}</math>)</b>
DS 1,5	11,9	0,00602	67,18	3,42	458	3,414	1,577E-04	4,381E-20
DS 7,8	8,7	0,01677	75,67	2,67	458	2,653	4,003E-05	1,112E-20

Tabelle 4-21: Beispiele für Werte und Ergebnisse zur Berechnung der scheinbaren Diffusionskoeffizienten von Lysozym in Humanserum bzw. dessen Komplexe

	<b>Radius (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	<b>Initial- freiset- zung (%)</b>	<b><math>M_\infty</math> (%)</b>	<b><math>M_t</math> (%)</b>	<b>Zeit (h)</b>	<b><math>M_t</math> abzügl. Initialfrei- setzung (%)</b>	<b><math>D_m</math> (<math>\mu\text{m}^2/\text{h}</math>)</b>	<b><math>D_m</math> (<math>\text{m}^2/\text{s}</math>)</b>
DS 1,5	11,9	6,26	67,18	11,1745	430	4,915	3,481E-04	9,669E-20
DS 7,8	8,7	3,42	75,67	7,0234	430	3,603	7,865E-05	2,185E-20

Um die scheinbaren Diffusionskoeffizienten von Lysozym in Humanserum und die Diffusionskoeffizienten in Phosphatpuffer pH 7 besser miteinander vergleichen zu können, werden dafür die Messwerte zu etwa gleichen Zeitpunkten miteinander verglichen. In diesem Fall werden exemplarisch die 458 h-Messung (Humanserum) bzw. 430 h-Messungen (Phosphatpuffer) miteinander verglichen (siehe Tabelle 4-20 und Tabelle 4-21). Betrachtet man dabei die Diffusionskoeffizienten der unterschiedlich substituierten HES-HEMA-Typen, fällt auf, dass in beiden Medien der Diffusionskoeffizient bei einem DS von 1,5 etwa 4- bis 5-mal größer ist als bei einem DS von 7,8.

Vergleicht man die Diffusionskoeffizienten der jeweils gleich substituierten Mikropartikel in den unterschiedlichen Medien Phosphatpuffer und Humanserum, so ist auffällig, dass der  $D_m$  in Humanserum bei beiden Substitutionsgraden etwa doppelt so hoch ist wie in Phosphatpuffer. Diese beiden Ergebnisse bestätigen die Ergebnisse der Freisetzungsversuche: Sowohl der Substitutionsgrad der Hydrogelmatrix als auch das Freisetzungsmedium haben einen starken Einfluss auf das Freisetzungsverhalten, insbesondere die Freisetzungsgeschwindigkeit.

Berechnet man die Diffusionskoeffizienten zu allen Zeitpunkten, so erhält man das in Abbildung 4-50 dargestellte Ergebnis. Interessant daran ist, dass die Diffusionskoeffizienten in Humanserum stetig abnehmen, wohingegen die Diffusionskoeffizienten in Phosphatpuffer ansteigen.

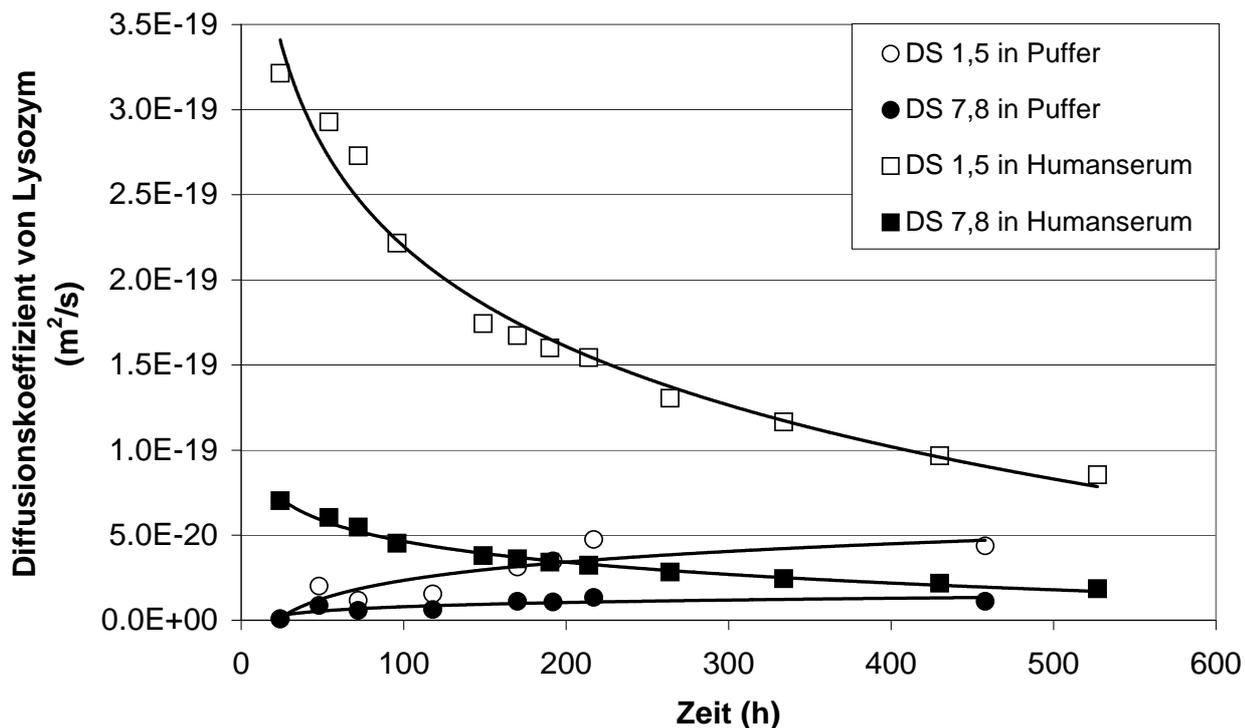


Abbildung 4-50: Diffusionskoeffizienten von Lysozym in Hydrogelen mit unterschiedlichen Substitutionsgraden in Humanserum und Phosphatpuffer pH 7 in Abhängigkeit von der Zeit ( $n = 3$ )

Der Anstieg der Diffusionskoeffizienten in Phosphatpuffer pH 7 kann mit der Quellung der Hydrogelmatrix durch das wässrige Medium erklärt werden. Durch die Quellung wird der Abstand zwischen den Polymerketten vergrößert und das Protein kann schneller aus der Matrix heraus diffundieren.

Die sinkenden Diffusionkoeffizienten in Humanserum lassen sich mit den Erkenntnissen der Gelpermeation-Chromatographie erklären (vgl. Kapitel 4.2.5). Beim Kontakt der Mikropartikel mit Humanserum beginnt der Partikel zu quellen. Durch die Aufweitung der Polymerketten ist es möglich, dass auch Globuline in die äußeren Schichten der Mikropartikel eindringen und mit Lysozymmolekülen im Inneren der gequollenen Mikropartikelmatrix Komplexe bilden. Diese Komplexe sind deutlich größer als Lysozym selbst, es kommt zu einer Abnahme der Diffusionsgeschwindigkeit, da sich große Moleküle durch die sterische Hinderung nur langsam aus dem Hydrogel-Netzwerk herausbewegen können.

Die Berechnung von Diffusionskoeffizienten von FITC-Dextran im Hydrogelnetzwerk ist nicht möglich, da keine Literaturdaten zu dessen Diffusionskoeffizient in wässrigen Lösungen vorhanden sind.

## 5 Abschlussdiskussion

In der vorliegenden Arbeit werden verschiedene Einflüsse auf das wässrige Zweiphasensystem aus Polyethylenglykol 8 000 und Hydroxyethylstärke 130/0,4 untersucht. Dazu zählen die Temperatur- und pH-Abhängigkeit des Zweiphasensystems, die Verteilung von Kryoprotektoren und Proteinen zwischen den Phasen und deren gegenseitige Beeinflussung. Weiterhin werden Mikropartikel auf der Grundlage dieses Zweiphasensystems hergestellt und im Hinblick auf die Partikelgröße, die Einschussrate und das Freisetzungsprofil charakterisiert.

Die Entstehung von wässrigen Zweiphasensystemen beruht u. a. auf Entropie-Effekten und dem Phänomen der Verdrängungsflockung, welche in Kapitel 2.1.1.3 genau beschrieben sind. Die beiden für ein solches System eingesetzten Polymere sollten unterschiedliche Polaritäten besitzen. Die in dieser Arbeit eingesetzte Hydroxyethylstärke ist – bedingt durch die große Anzahl Hydroxylgruppen im Molekül – deutlich hydrophiler als Polyethylenglykol, das durch den Ether-Sauerstoff in seiner linearen Struktur und nur einer endständigen Hydroxylgruppe den weniger polaren Partner darstellt. Diese verschiedenen Polaritäten führen zu einer unterschiedlichen Solvation der beiden beteiligten Polymermoleküle, was eine Phasenseparation ermöglicht. Die dabei entstehenden Phasen enthalten jeweils eines der beiden Polymere in einer sehr hohen Konzentration und zusätzlich – bedingt durch die Solvation der Polymere – das jeweils andere Polymer in einer sehr niedrigen Konzentration. Es stellt sich ein Konzentrationsgleichgewicht zwischen den Phasen ein; die Phasen sind mit beiden Polymeren gesättigt.

Die Kenntnis des Verhaltens von wässrigen Zweiphasensystemen gegenüber physikalischen und chemischen Einflüssen ist sowohl für die Proteinseparierung – für die diese Systeme ursprünglich entwickelt wurden – als auch für die Mikropartikelherstellung von großer Bedeutung. Während beispielsweise der Einfluss von Salzen, des pH-Wertes und der Temperatur auf die Verteilung von Proteinen in Zweiphasensystemen zur Proteinaufreinigung bereits ausführlich untersucht wurde und in der Literatur gut dokumentiert ist, findet man im Hinblick auf die Nutzung von Zweiphasensystemen zur Mikropartikelherstellung zu den o. g. Einflussfaktoren jedoch nur wenige Daten. Aus diesem Grund sollen das komplexe Thema der Zweiphasensysteme selbst und mögliche Einflussfaktoren auf diese Systeme im Hinblick auf die Mikropartikelherstellung in der vorliegenden Arbeit näher untersucht werden.

Der Einfluss der Temperatur stellt einen wichtigen Parameter für die Arbeit mit Zweiphasensystemen dar. Durch die Veränderung der Temperatur ist in vielen Fällen eine Prozesssteuerung

---

möglich, da die Lage der Binodalkurven – abhängig von den gewählten Polymeren – verschoben werden kann. Die dadurch bedingte veränderte Zusammensetzung der beiden Phasen führt aufgrund der Konzentrationsänderungen der Polymere in den Phasen zu einer veränderten Affinität der Proteine zu einer der beiden Phasen. Dadurch kann eine Steuerung der Proteinanreicherung in einer der beiden Phasen erzwungen werden. In der Literatur finden sich Daten zur Temperaturabhängigkeit von wässrigen Zweiphasensystemen: Beispielsweise verschieben sich in einem ATPS aus PEG und Polyacrylsäure die Binodalkurven mit steigenden Temperaturen (20 °C, 30 °C und 40 °C) nach links (Saravanan et al., 2006), d. h. zu niedrigeren Konzentrationen. Das bedeutet, dass mit zunehmender Temperatur eine Phasentrennung begünstigt wird und sich das Zweiphasengebiet somit vergrößert. Dieses Phänomen wird ebenfalls für ein ATPS aus PEG und NaCl (Cheluget et al., 1994) und aus PEG und Citrat (Jayapal et al., 2007) beschrieben. Eine Erklärungsmöglichkeit dafür ist eine durch erhöhte Temperatur bedingte größere Beweglichkeit der Polymerketten und die damit verbundene höhere Interaktionsmöglichkeit der Polymere sowie die geringere Solvation von PEG. Andererseits beschreiben Guan et al. (1994) für ein PEG/Dextran-System mit steigender Temperatur eine Verschiebung der Binodalkurve nach rechts, was auf einen vergrößerten Einphasenbereich durch die bessere Löslichkeit der Polymere bei höherer Temperatur hinweist. Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse bestätigen keines dieser beiden Phänomene. Die Lage der Binodalkurve aus HES und PEG ist im untersuchten Temperaturbereich von 10 °C bis 40 °C temperaturunabhängig. In der Literatur werden solche temperaturunabhängigen Systeme ebenfalls beschrieben. Beispielsweise fanden Oliveira et al. (2001) für ein Zweiphasensystem aus PEG und einem heteropolysaccharidreichen Cashew-Baumharz sowie auch Diamond & Hsu (1992) für ein Zweiphasensystem aus Dextran und Methylcellulose keine Beeinflussung der Lage der Binodalkurve durch die Temperatur. Dies zeigt, dass die Temperaturabhängigkeit eines wässrigen Zweiphasensystems für jedes System charakteristisch ist und eine Vorhersage darüber nur dann möglich ist, wenn die temperaturbedingte Veränderung des Solvationsausmaßes der Polymere quantitativ bekannt ist.

Die in dieser Arbeit gezeigte Temperaturunabhängigkeit des Zweiphasensystems aus HES und PEG lässt somit keine Prozesssteuerung durch Variation der Temperatur zu. Andererseits wirkt sich diese Unempfindlichkeit gegenüber Temperatureinflüssen bei der Arbeit mit Zweiphasensystemen und bei der Herstellung von Mikropartikeln auch positiv aus: Die Prozesse können als robust gegenüber Temperaturschwankungen angesehen werden und somit innerhalb des untersuchten Temperaturbereichs ohne engmaschige Temperaturkontrolle erfolgen.

Wässrige Zweiphasensysteme werden in der Biochemie häufig für die Reinigung von Proteinen genutzt. Die Kenntnis des Verhaltens des ATPS bei verschiedenen pH-Werten ist daher essentiell. Würde das System bereits durch Löslichkeitsveränderung oder Phasenvolumenverschiebungen auf pH-Veränderungen reagieren, wären alle weiteren Prozessschritte, wie zum Beispiel die Zugabe und die anschließende Verteilung von Proteinen, unkontrollierbar. Venancio et al. (1993) beschreiben beispielsweise für ein System aus Hydroxypropylstärke und PEG eine Abhängigkeit der Verteilung von Proteinen in den beiden Phasen vom pH-Wert. Dies zeigt, dass es durch Variation des pH-Wertes möglich ist, pH-abhängig lösliche oder pH-sensible Proteine im untersuchten wässrigen Zweiphasensystem aus HES und PEG zu verarbeiten und die Proteinverteilung gezielt zu beeinflussen. Weiterhin beschreiben Oliveira et al. (2001) neben der bereits erwähnten Unabhängigkeit der Binodalkurven von der Temperatur weiterhin eine Unabhängigkeit des ATPS aus PEG und Cashew-Baumharz vom pH-Wert. Dies kann in dieser Arbeit für das ATPS aus HES und PEG bestätigt werden. Im untersuchten Bereich von pH 1 - 6 zeigen sich weder makroskopische Veränderungen, noch wird das Phasen-Volumen-Verhältnis verschoben. Beim Mischen der HES- und der PEG-Lösungen in einem Verhältnis, das auch für die Mikropartikelherstellung genutzt wird (43 Teile einer 4 %igen HES-Lösung und 57 Teile einer 30 %igen PEG-Lösung), schwankt der Anteil der separierten HES-Phase am Gesamtsystem bei allen untersuchten pH-Werten um einen Wert von 2,7 % (V/V). Das System ist demzufolge als stabil gegenüber pH-Einflüssen anzusehen.

In der vorliegenden Arbeit wird das wässrige Zweiphasensystem aus HES und PEG als Grundlage für die Herstellung protein- und FITC-Dextran-beladener Mikropartikel genutzt. Proteine kommen häufig als gefriergetrocknete Produkte in den Handel. Wie in Kapitel 2.4 bereits ausführlich beschrieben, sind zum Schutz von Proteinen Kryo- und/oder Lyoprotektoren zuzusetzen, um deren native Struktur aufrechtzuerhalten. Betrachtet man den Herstellungsvorgang der Mikropartikel, wird die Bedeutung der Verteilung von Kryoprotektoren ersichtlich. Um sicherzustellen, dass das Protein in den Mikropartikeln optimal geschützt ist, muss sich ein Teil der Kryoprotektoren in der HES-Phase des Zweiphasensystems verteilen. Im Falle einer ausschließlichen Anreicherung in der PEG-Phase würde kein Stabilisator in den Mikropartikeln zur Verfügung stehen, da die PEG-Phase nach der Polymerisation der HES-Tröpfchen zu HES-Mikropartikeln vollständig abgetrennt wird. Aus diesem Grund werden Verteilungskoeffizienten von fünf verschiedenen Kryoprotektoren (Saccharose, Trehalose, Glycin, Mannitol, Glucose) in einem ATPS aus 10 T PEG 8 000, 10 T HES 130/0,4 und 80 T Wasser ermittelt. Dies wird zunächst über die Bestimmung der Trocknungsrückstände und die Dichte der mit Kryoprotektoren angereicherten Phasen durchgeführt

---

und diese Ergebnisse anschließend durch Bestimmung der Verteilungskoeffizienten dreier ausgewählter radioaktiv markierter Kryoprotektoren (Saccharose, Trehalose und Glycin) überprüft. Es ergeben sich mit zunehmender Konzentration der Kryoprotektoren steigende Trocknungsrückstands- und Dichtekoeffizienten von PEG/HES, was auf eine Anreicherung in der PEG-Phase hindeutet. Bei der Evaluierung dieser Daten mit Hilfe der durch radioaktiv markierte Kryoprotektoren bestimmten Verteilungskoeffizienten kann diese Annahme jedoch nicht bestätigt werden. Die Verteilungskoeffizienten erweisen sich als unabhängig von der Konzentration der Kryoprotektoren im System. Diese widersprüchlichen Ergebnisse lassen vermuten, dass sich mit steigender Konzentration der Kryoprotektoren durch Erhöhung der Hydrophilie der PEG-Phase ein immer größerer Anteil HES in der PEG-Phase löst. Dadurch steigen sowohl die Dichte als auch der Trocknungsverlust der PEG-Phase überproportional an.

In der Literatur finden sich einige Daten zur Verteilung von Glycin in wässrigen Zweiphasensystemen. Tintinger et al. (1997) fanden in einem ATPS aus PEG und Dextran eine leichte Anreicherung von Glycin in der Dextranphase ( $K_{\text{Glycin}} = 0,6$  bis  $0,8$ ), was mit einer höheren Polarität von Dextran im Vergleich zu HES und damit einer Anreicherung der polaren Aminosäure Glycin in der Dextranphase zu erklären ist. Van Berlo et al. (2000) untersuchten ein ATPS aus PEG 2000 bzw. PEG 4000 und Salz und ermittelten, abhängig von der Kettenlänge des Polymers, Verteilungskoeffizienten von  $0,43$  bzw.  $0,69$ . Dabei steigt der Verteilungskoeffizient mit zunehmender PEG-Kettenlänge, d. h., es kommt zu einer Abnahme der Glycin-Konzentration in der unteren, salzreichen Phase. Das in dieser Arbeit verwendete höhermolekulare PEG 8 000 und das im Vergleich zu Dextran weniger polare HES lässt eine weniger stark ausgeprägte Anreicherung von Glycin in der HES-Phase und damit einen höheren Verteilungskoeffizienten vermuten, der tatsächlich auch mit einem Wert von ca. 1 ermittelt werden kann.

Zur Verteilung von Zuckern in wässrigen Zweiphasensystemen finden sich in der Literatur keine Daten. Die hier bestimmten Verteilungskoeffizienten von Saccharose und Trehalose liegen geringfügig über einem Wert von 1, d. h., es kommt zu einer leichten Anreicherung in der PEG-Phase. Offensichtlich ist dieser Vorgang Entropie-gesteuert: durch die geringere Molekülgröße von PEG im Vergleich zu HES sind in der PEG-Phase pro Volumeneinheit mehr PEG-Moleküle enthalten als HES-Moleküle pro Volumeneinheit in der HES-Phase. Hierdurch kommt es, da ansonsten keine spezifischen Wechselwirkungen auftreten, aus entropischen Gründen zu einer geringfügigen Anreicherung der Zucker in der PEG-Phase.

Die Verteilung der Kryoprotektoren in beiden Phasen zeigt die Eignung der Stoffe für den Einsatz beim Gefriertrocknungsvorgang: Da bei der Mikropartikelherstellung die PEG-Phase vollständig von den HES-HEMA-Mikropartikeln abgetrennt wird, ist eine Verteilung der Stoffe in der HES-Phase zwingend notwendig. Die eingesetzten Konzentrationen von Saccharose, einem häufig verwendeten und kostengünstigen Kryoprotektor, liegen mit 0–7 % (m/m) in einem für die Gefriertrocknung üblichen Konzentrationsbereich. Die hierbei erhaltenen Ergebnisse weisen bzgl. der Herstellung von Mikropartikeln den Vorteil auf, dass die Verteilung der Kryoprotektoren von deren Einsatzkonzentration unabhängig ist.

Dass diese Ergebnisse auch nach Zugabe des Modellproteins Lysozym nicht verändert werden, kann in einem weiteren Versuch gezeigt werden. Dazu wird der Einfluss von Lysozym auf die Verteilungskoeffizienten von Saccharose, Trehalose und Glycin im verwendeten ATPS aus 10 T HES, 10 T PEG und 80 T Wasser und in einem an die Mikropartikel-Herstellung angepassten ATPS aus 1,72 T HES, 17,2 T PEG und 81 T Wasser untersucht. Es können auch hier eine gleichmäßige Verteilung von Glycin in beiden Phasen und eine leichte Anreicherung von Trehalose und Saccharose in der PEG-Phase beobachtet werden. Weiterhin ist kein Unterschied der Verteilungskoeffizienten von Kryoprotektoren zwischen lysozymhaltigen und lysozymfreien Systemen zu erkennen. Lediglich das Verhältnis von PEG zu HES scheint sich auf die Verteilung der Kryoprotektoren geringfügig auszuwirken. Im ATPS aus gleichen Teilen HES und PEG liegen die Verteilungskoeffizienten von Saccharose und Trehalose mit einem Wert von etwa 1,1 ungefähr 8 % unter den Verteilungskoeffizienten von etwa 1,2 im System aus 1 T HES und 10 T PEG. Vermutlich hat die Erhöhung der Mischungsentropie durch Trehalose und Saccharose in einem System mit erhöhtem PEG-Anteil stärkere Auswirkungen auf die Verteilung der beiden Zucker, da durch die beiden Zucker in einem System mit erhöhtem PEG-Anteil in der PEG-Phase pro Volumeneinheit mehr PEG-Moleküle vorhanden sind und somit die Erhöhung der Entropie der PEG-Phase stärker zum Tragen kommt. Ob diese Ergebnisse auch für andere Proteine als das verwendete Modellprotein Lysozym zutreffen, müsste allerdings in weiteren Arbeiten überprüft werden.

Diese Ergebnisse implizieren die Notwendigkeit der Überprüfung einer Beeinflussung des Verteilungskoeffizienten von Lysozym durch Kryoprotektoren. In einem ATPS, dessen Konzentrationsverhältnisse an die Mikropartikelherstellung angepasst sind, ergibt sich eine starke Anreicherung von Lysozym in der HES-Phase, die sowohl durch fluorimetrische Messungen von fluoreszenzmarkiertem Lysozym als auch durch einen lysozymspezifischen ELISA ermittelt werden

---

kann. Dies ist für die Mikropartikelherstellung von großem Vorteil. Die ELISA-Ergebnisse implizieren weiterhin durch die hohe Spezifität des ELISAs für natives Protein die Eignung des gewählten ATPS für die Prozessierung von Lysozym. Die Anreicherung von Lysozym in der HES-Phase beträgt im saccharosefreien System mit einem Verteilungskoeffizienten von 0,017-0,018 etwa das 60-fache, in den saccharosehaltigen Systemen mit einem Verteilungskoeffizienten von 0,024-0,035 etwa das 30- bis 40-fache im Vergleich zur PEG-Phase.

Die Anreicherung von Lysozym in der HES-Phase übertrifft die vorhandenen Literaturdaten bei Weitem. So fanden Shanbhag & Axelsson (1975) einen  $VK_{\text{Lysozym}}$  von 0,56 und Johansson (1974) einen  $VK_{\text{Lysozym}}$  von 0,79 in einem ATPS aus Dextran und PEG. Dieser signifikante Unterschied der Literaturdaten zu den in dieser Arbeit erhaltenen Verteilungskoeffizienten um mindestens eine Zehnerpotenz kann mit der geringeren Polarität von HES im Vergleich zu Dextran erklärt werden. Lysozym als relativ unpolares Protein besitzt somit eine deutlich höhere Affinität zu HES als zu Dextran. Es kann somit davon ausgegangen werden, dass das ATPS aus HES und PEG für die Verarbeitung unpolarer Proteine vorteilhafter ist als ein ATPS aus Dextran und PEG. Durch die starke Anreicherung von Lysozym in der HES-Phase ist dessen effektive Einbettung in Mikropartikel möglich.

Vergleicht man die Verteilungskoeffizienten im saccharosefreien System mit denen im saccharosehaltigen System, fällt auf, dass der Lysozym-Verteilungskoeffizient – zumindest in dem Konzentrationsbereich, der für einen kryoprotektiven Effekt genutzt wird ( $> 5\%$  Saccharose) – unabhängig vom Saccharosegehalt ist. Dies deutet darauf hin, dass Saccharose in der Lage ist, die Polarität des Systems zu erhöhen, so dass Lysozym als eher unpolares Protein eine geringere Affinität zur HES-Phase aufweist als im saccharosefreien System. Eine weitere Erklärungsmöglichkeit liefern Vlugt-Wensink et al. (2007): Die Autoren berichten am Beispiel eines ATPS aus Dextran und PEG über eine Konformationsänderung von humanem Wachstumshormon als Modellprotein durch Saccharose, wodurch das Protein hydrophober wird. Dadurch hält es sich bevorzugt in der hydrophoberen PEG-Phase auf und die Konzentration in der HES-Phase sinkt.

Die Bestimmung der Verteilung von Lysozym zwischen den beiden Phasen ist somit sowohl fluorimetrisch als auch durch ELISA erfolgreich möglich. Einzig der durch beide Methoden wiedergefundene summierte Lysozymanteil in beiden Phasen ist nicht zufrieden stellend. Diese Tatsache kann Auswirkungen auf die quantitative Ermittlung der Lysozymverteilungskoeffizienten haben, da dieses Phänomen bei der Errechnung des Quotienten rechnerisch nicht berücksichtigt werden kann. Betrachtet man diese Ergebnisse im Zusammenhang mit der in der Literatur

beschriebenen Agglomerationsneigung von Lysozym ab einer Konzentration von 0,01 % (Hussein, 2007), der Präzipitationsneigung von Lysozym in PEG-Lösungen (Atha et al., 1981) und der schlechten Löslichkeit von Proteinen in Polysaccharidlösungen (Laurent, 1963), liegt es nahe, dass durch den Einsatz einer 0,22 %igen Stammlösung und die damit verbundene Anlagerung von Lysozym-Agglomeraten an Kunststoffen und der Phasengrenzfläche überproportional viel Lysozym verloren geht. Dennoch sind die erhaltenen Daten sehr gut reproduzierbar.

Die Vermutung der Agglomerationsneigung von Lysozym kann durch Betrachtung fluoreszenzmikroskopischer Aufnahmen des wässrigen Zweiphasensystems und der Mikropartikel erhärtet werden. Auf den Bildern sind Agglomerate von Lysozym sowohl im wässrigen Zweiphasensystem als auch auf Mikropartikeln zu erkennen. Vergleicht man dagegen die Bilder der lysozymbeladenen Mikropartikel mit denen der mit FITC-Dextran beladenen Mikropartikel, ist festzustellen, dass FITC-Dextran diese Agglomerationsneigung nicht zeigt und gleichmäßig verteilt vorliegt. Das in diesem Ausmaß unerwartete Ergebnis der Agglomerationsneigung von Lysozym deutet darauf hin, dass die gleichmäßige Verteilung von Lysozym – ein häufig auch von anderen Autoren verwendetes Modellprotein – nicht ohne weiteres möglich ist.

Die durch Betrachtung der fluoreszenzmikroskopischen Bilder des wässrigen Zweiphasensystems und der Mikropartikel entstehende Vermutung, Lysozym werde durch seine Grenzflächenaktivität ausschließlich auf der Tropfen- bzw. Partikeloberfläche aufgelagert, kann durch Freisetzungsuntersuchungen von Lysozym aus Mikropartikeln entkräftet werden. Die Freisetzung von Lysozym erfolgt im untersuchten Zeitraum gleichmäßig, worauf an späterer Stelle noch im Einzelnen eingegangen wird.

Für den Vergleich von Freisetzungsdaten ist es sinnvoll, sowohl einen Geschwindigkeitsvergleich der Mikropartikelchargen mit Hilfe des Quadratwurzelgesetzes nach Higuchi als auch eine mechanistische Interpretation der Ergebnisse mit Hilfe des Power Laws durchzuführen. Die dazu berechneten Power Law-Exponenten liegen entweder um einem Wert von 0,5, was auf eine Fick'sche Diffusion hindeutet oder man erhält einen Power Law-Exponenten von 1. Hier ist eine quellungs- bzw. erosionsgesteuerte Freisetzung wahrscheinlich. Erhält man Power Law-Exponenten zwischen 0,5 und 1, deutet dies auf eine Freisetzung hin, an der sowohl die Fick'sche Diffusion als auch der Quellungs- und Erosionsvorgang beteiligt sind. Die genauen Mechanismen und Literaturangaben zu diesem Thema finden sich in Kapitel 2.6.2.

---

Da die in der vorliegenden Arbeit verwendete HES dem in anderen Arbeiten verwendeten Dextran in gewisser Weise ähnlich ist, werden diese Freisetzungsdaten bevorzugt zum Vergleich mit den in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnissen herangezogen. Chen et al. (2005) berichten über die Freisetzung von BMP 2 in PBS-Puffer aus einem Dextran-Gelatine-Hydrogel. Dabei wird das Protein nach einer Reaktion 1. Ordnung bzw. durch reine Diffusion freigesetzt. Weiterhin untersuchten die Autoren (Chen et al., 2006) ein ähnliches System, bei dem BMP 2 aus Dextran-Mikropartikeln ebenfalls durch Diffusion freigesetzt wird. Auch Hennink et al. (1996) beschreiben die diffusionskontrollierte Freisetzung von Lysozym, IgG und BSA aus Dextran-Hydrogelen nach dem Quadratwurzelgesetz nach Higuchi, wobei die Freisetzungsgeschwindigkeit erwartungsgemäß von der Proteingröße abhängt. Franssen et al. (1999) hingegen provozieren eine Freisetzung 0. Ordnung von IgG aus Dextran-Mikropartikeln, indem sie während der Mikropartikel-Herstellung neben dem Wirkstoff auch Dextranase einbetten, die durch den Kontakt mit Wasser aktiviert wird und das Hydrogelgerüst abbaut, so dass IgG unabhängig von seiner Konzentration und damit nach einer Reaktion 0. Ordnung freigesetzt wird. Van Dijk-Wolthuis et al. (1997 a) bestimmten für ihre Freisetzungsdaten auch den Power Law-Exponenten und fanden für die Freisetzung von IgG aus Dextran-Hydrogelen in PBS-Puffer Power Law-Exponenten von 0,46 bis 1,30. Die dabei verwendeten Substitutionsgrade des Dextrans sind mit den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Substitutionsgraden der HES vergleichbar. Dabei weisen die untersuchten Dextran-Hydrogele mit dem höchsten Substitutionsgrad und dem höchsten Wassergehalt die kleinsten Power Law-Exponenten auf, während die Hydrogele mit dem niedrigsten Wassergehalt und dem niedrigsten Substitutionsgrad den höchsten Power Law-Exponenten aufweisen. Daraus ist zu schließen, dass nur sehr stark hydratisierte Hydrogele (90 % Wassergehalt) eine Fick'sche Diffusion von IgG erlauben (Power Law-Exponent = 0,5), was vermutlich an einer dadurch bedingten ausreichenden Beweglichkeit des Proteins liegt. Weniger stark hydratisierte Hydrogele (70 - 80 % Wassergehalt) setzen das Protein bevorzugt durch eine Kombination aus Erosion und Diffusion oder ausschließlich durch Erosion frei ( $n = 0,71$  bis  $1,30$ ).

Diese Literaturdaten von Dextran-Mikropartikeln können für die Beurteilung der in dieser Arbeit erhaltenen Power Law-Exponenten der HES-HEMA-Mikropartikel herangezogen werden. In dieser Arbeit werden Lysozym und FITC-Dextran aus den Mikropartikeln jeweils sowohl in Phosphatpuffer pH 7 als auch in Humanserum freigesetzt, der kumulativ freigesetzte Anteil gegen die Zeit ermittelt und die Power Law-Exponenten berechnet. Im Weiteren sollen die Freisetzungsergebnisse von Lysozym und FITC-Dextran in den verschiedenen Freisetzungsmitteln einzeln diskutiert werden.

Die Freisetzung von Lysozym aus saccharosefreien Mikropartikeln in Phosphatpuffer pH 7 weist einen Power Law-Exponenten von 0,78 bzw. 0,62 (DS 1,5 bzw. 7,8) auf, was auf eine Kombination aus diffusionsgesteuerter Freisetzung und eine Erosion des Hydrogelgerüsts hindeutet. Im Gegensatz dazu sind die Power Law-Exponenten für die Freisetzung von Lysozym in Phosphatpuffer pH 7 für saccharosehaltige Mikropartikel mit Werten von 0,37 und 0,40 (DS 1,5 bzw. 7,8) deutlich kleiner. Dies weist auf eine verlangsamte Fick'sche Diffusion hin, die vermutlich durch eine Saccharose-induzierte Aggregatbildung der Mikropartikel und damit die Verkleinerung der effektiv für die Freisetzung zur Verfügung stehenden Oberfläche bewirkt wird. Weiterhin spielen Wechselwirkungen zwischen Saccharose und Lysozym eine bedeutende Rolle. Lysozym und Saccharose bilden starke Wasserstoffbrücken miteinander aus (Suihko et al., 2005; Allison et al., 1999; Tzannis & Prestrelski, 1998; Mosharraf et al., 2006). Dadurch kommt es zu einer verringerten molekularen Beweglichkeit des Proteins, was die niedrigere Freisetzungsgeschwindigkeit erklärt.

Die Freisetzung von Lysozym in Humanserum verläuft unerwartet: Die Freisetzungskurven weisen eine starke initiale Freisetzung auf, gefolgt von einer Phase, in der kaum noch Lysozym freigesetzt wird. Die Power Law-Exponenten liegen mit Werten zwischen 0,076 und 0,119 deutlich unter den aus Literaturdaten erwarteten typischen Werten für eine Freisetzung. Es kommt – im Gegensatz zur Freisetzung in Phosphatpuffer – schließlich zu sinkenden Diffusionskoeffizienten über der Zeit. Die daraufhin durchgeführte Gelpermeations-Chromatographie von Lysozym in Humanserum legt die Vermutung nahe, dass Lysozym mit Bestandteilen des Humanserums Komplexe bildet (Virella, 1975; Sharon & Eshdan, 1974; Finkle et al., 1973; Oldfield, 2001) und so die Diffusionsgeschwindigkeit aufgrund der gestiegenen Größe der Komplexe abnimmt. Die Freisetzung von Lysozym in Humanserum darf somit nicht in den direkten Vergleich der Freisetzungskinetiken der einzelnen Mikropartikel-Chargen einbezogen werden, da hier die Freisetzung durch die vermutete Komplexbildung mit Serumproteinen stark behindert ist.

Die Freisetzung von FITC-Dextran in Humanserum weist Power Law-Exponenten von 0,5 bis 0,6 auf. Dies deutet auf eine nahezu ideale Fick'sche Diffusion als Freisetzungsmechanismus hin, obgleich auch die Erosion des Hydrogels eine Rolle spielt, da einige Exponenten über 0,5 liegen. Die Freisetzung von FITC-Dextran in Phosphatpuffer ist hingegen durch die Abwesenheit von Enzymen und die dadurch fehlende Erosion leicht behindert. Mit Werten von 0,3 bis 0,4 wird der Power Law-Exponent von 0,5 für eine Fick'sche Diffusion jedoch nahezu erreicht. Damit wird die Erwartung erfüllt, dass FITC-Dextran in Humanserum durch die an der Erosion beteiligten Enzyme deutlich schneller freigesetzt wird als in Phosphatpuffer. Sowohl bei der Freisetzung von FITC-

---

Dextran in Phosphatpuffer als auch in Humanserum wirkt sich der Saccharosegehalt der Mikropartikel nicht auf den Freisetzungsmechanismus aus. Weiterhin ist mit steigender Saccharosekonzentration kein Trend zu höheren oder niedrigeren Freisetzungsgeschwindigkeiten zu erkennen. Bezüglich des Saccharosegehaltes der Mikropartikel lässt sich kein Unterschied bezüglich der Freisetzungsgeschwindigkeit von FITC-Dextran zwischen saccharosefreien und saccharosehaltigen Mikropartikeln erkennen. Diese Unabhängigkeit von der Saccharosekonzentration hat den Vorteil, dass bei einer Änderung der Saccharosekonzentration in der Mikropartikelrezeptur weder mit einem veränderten Freisetzungsmechanismus noch mit einer veränderten Freisetzungsgeschwindigkeit zu rechnen ist.

Die Freisetzungsdaten von Lysozym und FITC-Dextran zeigen, dass es möglich ist, nach Einbettung von Wirkstoffen in HES-HEMA-Mikropartikel eine Freisetzungskinetik dieser Stoffe zu erhalten, die nahezu ideal dem Fick'schen Gesetz folgt und durch die meisten der ermittelten Power Law-Exponenten von ca. 0,5 belegt werden kann. Sind im Freisetzungsmedium, wie z. B. im Humanserum, zusätzlich Enzyme vorhanden, wird die Freisetzung zunehmend auch durch die Erosion beeinflusst und die Power Law-Exponenten tendieren zu Werten  $> 0,5$ . Dies sollte bei der Formulierung von Mikropartikel-Rezepturen bedacht werden: Je höher der Substitutionsgrad des Gelgerüsts ist, desto mehr wird die Erosion erschwert. Es wäre also denkbar, der zwangsläufig durch Enzyme im menschlichen Körper stattfindenden erosionsbedingten schnelleren Freisetzung aus den Mikropartikeln entgegenzuwirken, indem höher substituierte Gelgerüste Anwendung finden.

Die bisherige Diskussion bezieht sich auf die mechanistische Interpretation der Freisetzungsergebnisse mit Hilfe des Power Law-Exponenten. Eine andere Betrachtungsweise der Ergebnisse ist der Vergleich der Freisetzungsgeschwindigkeiten von Mikropartikeln mit unterschiedlichen Substitutionsgraden. Dazu eignet sich der Vergleich der Power Law-Exponenten nicht, da in diesem Fall aufgrund der doppelt logarithmischen Auftragung die Unterschiede der einzelnen Freisetzungskurven nivelliert werden. Somit werden die Power Law-Exponenten nur zur Mechanismusfindung eingesetzt. Für die Diskussion der Freisetzungsgeschwindigkeiten unterschiedlich substituierter Mikropartikel werden hingegen die Steigungen aus den Geradengleichungen des Quadratwurzelgesetzes nach Higuchi (im Weiteren als  $m_{\text{Hig}}$  bezeichnet) herangezogen. Bei dieser Auswertungsweise wird der kumuliert freigesetzte Anteil gegen die Wurzel der Zeit aufgetragen und die Steigung der Geraden ( $m_{\text{Hig}}$ ) berechnet (siehe Kapitel 2.6.2).

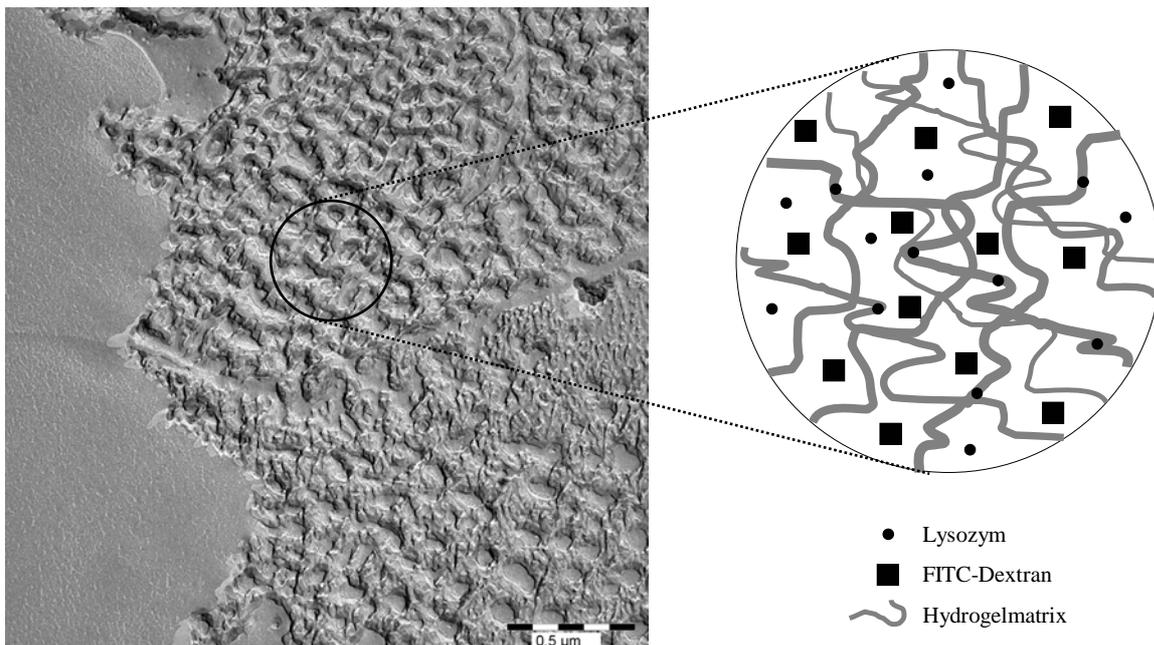
Bei der Freisetzung von Lysozym sowohl aus saccharosefreien als auch aus saccharosehaltigen Mikropartikeln in Phosphatpuffer pH 7 liegt die  $m_{\text{Hig}}$  der niedriger substituierten Mikropartikel mit einem Wert von  $0,20 \% \cdot \text{h}^{-0,5}$  bzw.  $0,19 \% \cdot \text{h}^{-0,5}$  (0 % bzw. 10 % Saccharose) erwartungsgemäß deutlich über dem der höher substituierten Mikropartikel mit  $0,15$  bzw.  $0,17 \% \cdot \text{h}^{-0,5}$  (0 % bzw. 10 % Saccharose). Das gleiche Phänomen zeigt sich bei der Freisetzung von FITC-Dextran in Phosphatpuffer: Vergleicht man hier ebenfalls die  $m_{\text{Hig}}$  der niedriger substituierten mit denen der höher substituierten Polymergrundgerüste, so erhält man mit Werten von  $1,26-1,54 \% \text{h}^{-0,5}$  (0 % - 15 % Saccharose) für die höher substituierten Mikropartikel eine deutlich langsamere Freisetzung als aus den niedriger substituierten Mikropartikel mit  $m_{\text{Hig}}$  – Werten von  $1,86-2,00 \% \cdot \text{h}^{-0,5}$  (0 % - 15 % Saccharose). In Humanserum beobachtet man das gleiche Freisetzungsverhalten von FITC-Dextran mit  $m_{\text{Hig}}$  – Werten von  $3,13-3,47 \% \text{h}^{-0,5}$  (0 % - 15 % Saccharose) für die niedriger vernetzten Mikropartikel und  $m_{\text{Hig}}$  – Werten von  $1,90-2,20 \% \text{h}^{-0,5}$  (0 % - 15 % Saccharose) für die höher vernetzten Mikropartikel. Weiterhin zeigen die Steigungen der Geradengleichungen nach Higuchi auch hier eine deutlich schnellere Freisetzung von FITC-Dextran in Humanserum als in Phosphatpuffer, bedingt durch die im Humanserum zusätzlich enthaltenen Enzyme und der damit erhöhten Erosionsrate. Auf den Vergleich der unterschiedlichen Substitutionsgrade im Falle der Lysozymfreisetzung in Humanserum wird hier aufgrund der bereits beschriebenen Komplexbildung von Lysozym mit Serumproteinen verzichtet.

Der Vergleich der Freisetzungsgeschwindigkeiten aus Mikropartikeln mit unterschiedlichen Substitutionsgraden zeigt, dass Wirkstoffe aus weniger vernetzten Gelgerüsten deutlich schneller freigesetzt werden, da die Maschenweite größer ist. Die Mobilität des Wirkstoffs im Gelgerüst ist dadurch höher und damit die Diffusion in den gequollenen Gelbereichen erleichtert. Bei höher substituierten Gelgerüsten ist das Maschenwerk dichter, die Mobilität des Wirkstoffs erschwert und damit die Diffusionsgeschwindigkeit aufgrund sterischer Effekte behindert. Diesen Effekt kann man sich jedoch bei der Formulierung von Mikropartikelrezepturen zunutze machen: Ist eine langsame Freisetzungsgeschwindigkeit und damit eine lange Freisetzungsdauer des Wirkstoffs erwünscht, sind höher substituierte Polymere einzusetzen. Ist hingegen eine hohe Freisetzungsgeschwindigkeit erwünscht, sind Polymere mit niedrigem Substitutionsgrad auszuwählen. Die Prozess- und damit Freisetzungsteuerung ist hier sehr einfach möglich.

Bei der Betrachtung der Freisetzungsdaten fällt auf, dass sich Lysozym und FITC-Dextran unterschiedlich verhalten: Die Freisetzungsgeschwindigkeit und die pro Zeiteinheit freigesetzte Menge ist bei FITC-Dextran deutlich höher als bei Lysozym. Dies kann sowohl mit der

Molekülgröße der beiden Modellsubstanzen als auch dem strukturellen Aufbau der Hydrogelmatrix erklärt werden. Die Hydrogelmatrix besitzt eine porenhaltige, schwammartige Struktur, die in Abbildung 5-1 durch eine TEM-Aufnahme einer gefriergetrockneten HES-Hydrogelmatrix verdeutlicht wird.

Es ist anzunehmen, dass sich FITC-Dextran aufgrund seiner Größe fast ausschließlich in die Hohlräume der Hydrogelmatrix einlagert, jedoch nicht in die Gelmatrix selbst (Abbildung 5-2). Dadurch kann es rasch und nahezu vollständig durch Diffusion ohne Abbau der Gelmatrix wieder aus dem Gelgerüst freigesetzt werden. Lysozym hingegen wird als kleineres Molekül und aufgrund seiner höheren Affinität zu HES offensichtlich sowohl in die Gelgerüstmatrix als auch in die Hohlräume und Poren des Gerüsts eingelagert (Abbildung 5-2). Das in den Poren eingelagerte Lysozym wird relativ schnell durch Diffusion freigesetzt, während der in die Matrix eingebettete Teil nur durch Erosion des Hydrogels freigesetzt werden kann, da hier kaum eine Diffusion möglich ist. Dadurch erklärt sich, dass im Beobachtungszeitraum im Vergleich zu FITC-Dextran viel weniger Lysozym freigesetzt wird und die Kinetik einen ausgeprägt zweiphasigen Verlauf zeigt.



*Abbildung 5-1:*  
*TEM-Aufnahme einer gefriergetrockneten HES-Hydrogelmatrix (Scheibe, 2008)*

*Abbildung 5-2:*  
*Schematische Darstellung der vermuteten Einlagerung von Lysozym und FITC-Dextran in die Hydrogelmatrix eines Mikropartikels*

Für die Auswertung von Freisetzungsversuchen ist es notwendig, neben der freigesetzten Wirkstoffmenge auch die in den Mikropartikeln eingeschlossene Wirkstoffmenge zu kennen. Ohne die Kenntnis der Einschlussmenge wäre keine sinnvolle Freisetzungsauswertung möglich: Ziel einer Freisetzung ist schließlich, die eingeschlossene Wirkstoffmenge vollständig freizusetzen. Oft werden diese angestrebten 100 % jedoch nicht erreicht. Dies kann u. a. an der Instabilität des Wirkstoffs über die Inkubationsdauer liegen oder weil ein Teil des Wirkstoffs durch verschiedene Prozessschritte verloren geht.

Für die Bestimmung der Einschlussrate gibt es verschiedene Methoden, die in Kapitel 2.2.5 genau beschrieben werden. In der vorliegenden Arbeit wird die Einschlussrate zum Einen mit Hilfe der Massenbilanzmethode und zum Zweiten durch die Bestimmung der eingeschlossenen Menge durch Spaltung des Gelgerüsts mit Alpha-Amylase durchgeführt. Dabei wird der eingeschlossene Anteil (Einschlussrate) aus der Menge Wirkstoff berechnet, die tatsächlich in den Mikropartikeln eingeschlossen ist und der Gesamtmenge Wirkstoff, die während der Herstellung eingesetzt wurde.

Die Bestimmung der Einschlussrate der beiden Modellsubstanzen Lysozym und FITC-Dextran in den Mikropartikeln war ursprünglich für beide Substanzen mit Hilfe der Alpha-Amylase-Methode geplant, bei der das Hydrogelgerüst durch Alpha-Amylase in Carbonatpuffer pH 9,6 aufgelöst wird und so der vollständig freigesetzte Wirkstoff analysiert werden kann. Jedoch ist Fluoreszenz-Lysozym in diesem Medium instabil: Es wird bei der Inkubation der Mikropartikel zur Auflösung des Gelgerüsts bei einem pH-Wert von 9,6 innerhalb kürzester Zeit vollständig abgebaut. Diese Erkenntnis schließt die Verwendung dieser Methode aus und es muss die Massenbilanzmethode verwendet werden. Bei der Massenbilanzmethode werden meist sehr hohe Einschlussraten erhalten: Da hier der Anteil Wirkstoff in den Herstellungsrückständen gemessen und von der eingesetzten Menge abgezogen wird, werden anderweitig verloren gegangene Anteile des Wirkstoffs nicht mit berücksichtigt. Beispielsweise erhalten Chen et al. (2005) mit dieser Methode im Fall von BMP 2 in Dextran/Gelatine-Mikropartikeln Einschlussraten von 83 % und Franssen et al. (1999) erreichen Einschlussraten von 88-98 % für IgG in Dextran-Mikropartikeln. Die in dieser Arbeit gefundenen Einschlussraten von ca. 70-80 % liegen somit in einem vergleichbaren Bereich.

Im Gegensatz zu den lysozymhaltigen Mikropartikeln kann bei den FITC-Dextranhaltigen Mikropartikeln die Bestimmung der Einschlussrate mit der Alpha-Amylase-Methode durchgeführt werden, da FITC-Dextran in Alpha-Amylase in Carbonatpuffer pH 9,6 nachweislich stabil ist. Hierbei werden Einschlussraten von 30-37 % bestimmt. Diese Werte sind deutlich geringer als die durch die Massenbilanzmethode erhaltenen Ergebnisse für Lysozym. Der Unterschied liegt zum

---

einen darin, dass Lysozym aufgrund struktureller Unterschiede und der unterschiedlichen Stoffklassenzugehörigkeit nicht direkt mit FITC-Dextran vergleichbar ist. Zum anderen wird bei der Alpha-Amylase-Methode die in den Mikropartikeln eingeschlossene Menge FITC-Dextran direkt gemessen. Jegliches evtl. verloren gegangenes FITC-Dextran wird dabei – im Gegensatz zur Massenbilanzmethode – nicht mit erfasst, so dass die Werte im Allgemeinen geringer ausfallen. Die erhaltenen Einschlussraten von 30-37 % sind nicht vollständig zufrieden stellend, da zwei Drittel des eingesetzten Wirkstoffs nicht in die Mikropartikel eingeschlossen werden. Dies würde besonders bei hochwirksamen Proteinen ein Problem darstellen, da deren Herstellung mit hohen Kosten verbunden ist. Betrachtet man jedoch den eingeschlossenen Anteil im Vergleich zum Anteil der HES-HEMA-Phase am Gesamtsystem zeigt sich, dass ein sehr geringer Volumenanteil der HES-Phase von ca. 2,7 % immerhin ein Drittel des gesamten eingesetzten Wirkstoffs aufnehmen kann und dieser in den Mikropartikeln eingeschlossen wird. Dies lässt die Einschlussrate von 30-37 % für FITC-Dextran als durchaus akzeptabel erscheinen.

Die unterschiedlichen Ergebnisse zur Einschlussrate zeigen, dass die Auswahl eines geeigneten Verfahrens zu deren Bestimmung sehr stark von der zu untersuchenden Substanz abhängt und intensive Voruntersuchungen zur Stabilität der Modellsubstanzen zwingend notwendig sind.

Da nicht nur die Freisetzungskinetik und –geschwindigkeit von Wirkstoffen aus Mikropartikeln, sondern auch deren Größe von großer Bedeutung für deren Anwendung sind, wird eine Partikelgrößenanalyse der hergestellten Mikropartikel durchgeführt. Nach Audran et al. (2003) und Balasse et al. (2008) eignen sich Mikropartikel mit einer Größe ab 10  $\mu\text{m}$  zur parenteralen Applikation, ohne von den Monozyten des Bauchfells internalisiert und damit unwirksam gemacht zu werden. Die in dieser Arbeit durch Laserbeugung ermittelte Partikelgröße der saccharosefreien Mikropartikel beträgt im Mittel 10-15  $\mu\text{m}$ . Im Bezug auf die Größe sind die hergestellten saccharosefreien Mikropartikel für die parenterale Applikation geeignet.

Bei den saccharosehaltigen Mikropartikeln ist die Bestimmung der Partikelgröße nicht möglich, da es bei deren Herstellung zu einer Aggregatbildung kommt. Diese Aggregate lassen sich in Wasser weder durch Rühren noch durch Ultraschall desagglomerieren. Erklärbar ist dieses Verhalten dadurch, dass die PEG-Phase durch Saccharose deutlich hydrophiler wird und dadurch in der Lage ist, HES besser zu solvatisieren. Dadurch ragen mehr HES-Kettenenden aus den HES-Tröpfchen heraus, die nun wiederum nicht nur in sich, sondern auch miteinander quervernetzt werden können. Dadurch kommt es zu einer Bildung unlöslichen Aggregate vieler Mikropartikel miteinander. Somit bedarf die Herstellung saccharosehaltiger Mikropartikel einer weiteren Optimierung.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass sowohl die Herstellung und Charakterisierung des wässrigen Zweiphasensystems aus Hydroxyethylstärke und Polyethylenglykol als auch die Charakterisierung von Mikropartikeln im Rahmen dieser Arbeit gelungen sind. Es werden in Bezug auf die Verteilung des Modellproteins Lysozym und der Kryoprotektoren Glycin, Trehalose und Saccharose im Zweiphasensystem und deren gegenseitigen Beeinflussung neue Daten erhalten, die auch für andere wässrige Zweiphasensysteme bisher in der Literatur nicht zu finden sind. Weiterhin können HES-HEMA-Mikropartikel durch eine Wasser-in-Wasser-Emulsionstechnik hergestellt werden, wobei Polyethylenglykol mit einem Molekulargewicht von 8 000 g/mol erstmalig verwendet wird. In bisherigen Arbeiten zur Mikropartikel-Herstellung auf Grundlage des wässrigen Zweiphasensystems aus HES und PEG wurde eine höhermolekulare PEG-Variante genutzt. Das Gelingen der Mikropartikelherstellung auch mit einer kürzerkettigen Variante zeigt, dass die Auswahl der PEG-Kettenlänge flexibel möglich ist und somit bei der Herstellung eine größere Variationsvielfalt besteht. Weiterhin wäre denkbar, dass evtl. durch Mischen von verschiedenen PEG-Typen eine Prozesssteuerung und -optimierung möglich ist.

Die hergestellten Mikropartikel zeigen eine akzeptable Einschussrate des Wirkstoffs, eine gängige Partikelgröße und eine gleichmäßige Freisetzung der Modellsubstanzen über einen langen Zeitraum. Der Einfluss von Kryoprotektoren – insbesondere Saccharose – fällt in nahezu allen untersuchten Bereichen gering aus. Einzig auf die Verteilung von Lysozym im Zweiphasensystem war ein signifikanter Unterschied zwischen dem saccharosefreien und dem saccharosehaltigen System erkennbar. Im Bezug auf die Mikropartikel werden weder die Einschussrate noch das Freisetzungverhalten durch Saccharose verändert. Dies hat den Vorteil, dass der Einsatz von Saccharose als Kryoprotektor beim praktischen Einsatz keinen Einfluss auf das Endprodukt hat. Einzig die erhöhte Polymerisationsneigung von HES-HEMA nach Saccharosezusatz wirkt sich nachteilig auf das Endprodukt aus, was jedoch durch eine Rezeptur- und Prozeßoptimierung lösbar sein sollte.

Somit sind HES-HEMA-Mikropartikel ein geeignetes Formulierungskonzept für die kontrollierte Freisetzung von therapeutischen Proteinen.

## 6 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit verfolgte zwei Ziele: Zum einen sollte ein wässriges Zweiphasensystem aus Hydroxyethylstärke und Polyethylenglykol hergestellt und charakterisiert werden. Zum anderen sollten auf der Grundlage dieses Zweiphasensystems Mikropartikel hergestellt und ebenfalls charakterisiert werden.

Aufgrund der Praxisrelevanz wurde als erster Schritt der Einfluss der Temperatur auf das wässrige Zweiphasensystem untersucht. Es zeigte sich eine Unabhängigkeit der Binodalkurven von der Temperatur in einem Temperaturbereich zwischen 10 °C und 40 °C. Aufgrund dieser Erkenntnis konnten alle weiteren Arbeiten – sofern sie in diesem Temperaturbereich durchgeführt wurden – ohne strikte Temperaturkontrolle erfolgen. Weiterhin wurde der Einfluss des pH-Wertes auf das Zweiphasensystem untersucht. Die Reihenuntersuchungen in einem pH-Bereich zwischen pH 1 und 6 zeigten keinerlei makroskopische Veränderungen und auch das Phasen-Volumen-Verhältnis blieb konstant. Durch diese beiden Versuche konnte die Robustheit des Zweiphasensystems gegenüber Temperatur- und pH-Einflüssen nachgewiesen werden.

Weiterhin wurde das Verhalten des Zweiphasensystems gegenüber weiteren Additiven, wie zum Beispiel Kryoprotektoren, untersucht. Dies erfolgte über die Bestimmung der Trocknungsrückstände und der Dichte der mit den Kryoprotektoren Saccharose, Trehalose, Glycin, Mannitol und Glucose in verschiedenen Konzentrationen angereicherten Phasen. Dabei stieg – unabhängig von der Konzentration der Kryoprotektoren – sowohl die Dichte als auch der Trocknungsrückstand der PEG-Phase im Vergleich zur HES-Phase überproportional an. Somit ergaben sich mit steigender Konzentration der Kryoprotektoren steigende PEG/HES-Koeffizienten.

Von besonderem Interesse war das Verteilungsverhalten von zugesetzten Stoffen (Glycin, Trehalose und Saccharose) in Zweiphasensystemen. Das Verteilungsverhalten wird mit Hilfe von Verteilungskoeffizienten beschrieben. Die Bestimmung der Verteilungskoeffizienten ergab im Fall von Glycin einen Verteilungskoeffizienten von 1, was auf die gleichmäßige Verteilung in beiden Phasen hindeutet. Trehalose und Saccharose reichern sich geringfügig in der PEG-Phase an, wodurch Verteilungskoeffizienten von  $> 1$  erhalten wurden. Das Verteilungsverhalten aller drei untersuchten Kryoprotektoren war im untersuchten Konzentrationsbereich konzentrationsunabhängig.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass der Zusatz von Lysozym keinen Einfluss auf die Verteilung der Kryoprotektoren hat. Die Verteilungskoeffizienten der lysozymhaltigen Systeme lagen mit Werten von ca. 1 für Glycin und Werten von  $> 1$  für Trehalose und Saccharose im gleichen Bereich wie die der lysozymfreien Systeme. Das Verhältnis von HES und PEG im Zweiphasensystem scheint für die Verteilung der Stoffe von untergeordneter Bedeutung zu sein, wie durch die Ermittlung der Verteilungskoeffizienten in zwei Systemen mit völlig unterschiedlichen Zusammensetzungen (HES + PEG-Verhältnis 1 + 1 bzw. 1 + 10) gezeigt werden konnte.

Da die Verteilung der Kryoprotektoren mit deren steigendem Gehalt konzentrationsunabhängig erfolgt, kann aus den Ergebnissen der Dichte- und Trocknungsrückstandsmessungen und der Ergebnisse der Kryoprotektorenverteilung geschlossen werden, dass mit zunehmender Konzentration der Kryoprotektoren durch die Erhöhung der Hydrophilie der PEG-Phase ein immer größerer Anteil HES in die PEG-Phase migriert.

Weiterhin wurde die Verteilung von Lysozym im Zweiphasensystem bestimmt. Dies geschah sowohl qualitativ als auch quantitativ. Die qualitative Bestimmung erfolgte mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie. Dabei war festzustellen, dass sich Lysozym aufgrund seiner Grenzflächenaktivität bevorzugt auf den HES-Tröpfchen des wässrigen Zweiphasensystems auflagert. Die quantitative Lysozym-Bestimmung erfolgte sowohl mit Hilfe der Fluorimetrie für fluoreszenzmarkiertes HEW-Lysozym als auch mit Hilfe eines lysozymspezifischen ELISAs für Humanlysozym. Bei beiden Methoden zeigte sich im saccharosefreien System eine Anreicherung von Lysozym um das 60-fache in der HES-Phase und eine Anreicherung im saccharosehaltigen System um das 30- bis 40-fache in der HES-Phase im Vergleich zur PEG-Phase, unabhängig vom Saccharosegehalt. Bei der Herstellung von Mikropartikeln auf der Grundlage dieses Zweiphasensystems wirkt sich diese starke Anreicherung in der HES-Phase auf die Einschussrate von mit Lysozym beladenen Mikropartikeln positiv aus.

Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit war die Herstellung von mit Lysozym bzw. FITC-Dextran beladenen Mikropartikeln auf der Grundlage des Zweiphasensystems. Die Variation der Ausgangsmaterialien durch Verwendung von PEG 8 000 anstelle von PEG 12 000 (im Rahmen des Sonderforschungsbereichs 578 bisher verwendet) ist im Rahmen dieser Arbeit gelungen. Dabei kam HES-HEMA mit zwei unterschiedlichen Substitutionsgraden zum Einsatz. Es wurden runde, glatte Mikropartikel mit einem  $d_{50}$  von 10 bzw. 15  $\mu\text{m}$  (DS 1,5 bzw. 7,8) erhalten. Die Mikropartikel mit eingebetteter Saccharose als Kryoprotektor zeigten eine starke Aggregationsneigung. Diese Aggregate ließen sich weder durch Rühren noch durch Ultraschall desagglomerieren. Somit

---

bedürfen die Rezeptur, der Herstellungsvorgang und die Gefriertrocknung von saccharosehaltigen Mikropartikeln einer Optimierung.

In Analogie zur Lysozymverteilung im wässrigen Zweiphasensystem wurde die Verteilung der Modellwirkstoffe in den Mikropartikeln sowohl qualitativ als auch quantitativ bestimmt. Die qualitative Bestimmung erfolgte mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie. Es zeigte sich für Lysozym sowohl eine gleichmäßig Verteilung in und auf den Mikropartikeln als auch eine zum Teil ausgeprägte Agglomerationsneigung. FITC-Dextran wies im Gegensatz dazu keinerlei Aggregationstendenz auf, es lag gleichmäßig verteilt vor.

Die quantitative Ermittlung der eingebetteten Lysozym- und FITC-Dextran-Menge in den Mikropartikeln erfolgte über die Bestimmung der Einschlussrate (Massenbilanzmethode und Alpha-Amylase-Methode) der Modellwirkstoffe. Es ergaben sich durch die Massenbilanzmethode ermittelte Beladungsraten von bis zu 2,60 mg Lysozym pro 1 Gramm Mikropartikel für saccharosefreie Mikropartikel. Die Beladungsrate der saccharosehaltigen Mikropartikel (10 % Saccharose) war mit Mengen von ca. 0,75 mg pro 1 Gramm Mikropartikel-Endprodukt durch die zusätzlich enthaltene Saccharose erwartungsgemäß niedriger. Für FITC-Dextran lagen die durch die Alpha-Amylase-Methode erhaltenen Beladungsraten pro 1 Gramm Mikropartikel zwischen 1,02 mg (saccharosefrei) und 0,20 mg (15 % Saccharose). Die auf diese Weise ermittelten eingeschlossenen Wirkstoffmengen von Lysozym und FITC-Dextran wurden als Referenzwert (100 %-Wert) für die Freisetzungsuntersuchungen verwendet.

Die Bestimmung der Freisetzungsgeschwindigkeit und -kinetik der inkorporierten Stoffe war von besonderem Interesse. Die Freisetzung erfolgte über einen Zeitraum von bis zu 4 Wochen. Alle Wirkstoffe wurden gleichmäßig über den Freisetzungszeitraum freigesetzt. Die Freisetzungsergebnisse wurden mit Hilfe der Higuchi-Gleichung und des Power Laws ausgewertet. Die erhaltenen Power Law-Exponenten von  $n \sim 0,5$  im Fall von Lysozym in Phosphatpuffer pH 7 bzw. FITC-Dextran in Phosphatpuffer pH 7 und Humanserum weisen auf eine Freisetzung nach Higuchi bzw. eine Fick'sche Diffusion hin. Der Power Law-Exponent der Freisetzung von Lysozym in Humanserum lag mit einem Wert von etwa 0,1 deutlich unter einem erwarteten Wert von 0,5 bis 1. Als Ursache hierfür konnte mit Hilfe lichtmikroskopischer Aufnahmen und der Gelpermeations-Chromatographie eine Komplexbildung zwischen Lysozym und Serum-Proteinen, insbesondere Globulinen, ermittelt werden. Durch diese Komplexbildung erhöht sich die molare Masse, was zu einer verlangsamten Diffusionsgeschwindigkeit führte.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass das untersuchte Zweiphasensystem aus HES und PEG durch seine Robustheit gegenüber äußeren Einflüssen und sein proteinfreundliches Milieu sehr gut für die Prozessierung von Proteinen geeignet ist. Auf der Grundlage dieses Zweiphasensystems ließen sich Mikropartikel herstellen, in die Proteine eingebettet werden konnten, die über einen längeren Zeitraum nach einem Fickschen Diffusionsprozess freigesetzt wurden. Nicht zuletzt durch diese verzögerte und berechenbare Freisetzung sind HES-HEMA-Mikropartikel ein interessantes und vielversprechendes Formulierungskonzept für therapeutische Proteine.

---

## 7 Literaturnachweis

**Albertsson, P-A; Johansson, G.; Tjerneld, F. (1990)**

*Aqueous two-phase separations*

in J.A. Asenjo (Hrsg.) Separation Processes in Biotechnology. Marcel Dekker, New York, 287-327

**Albertsson, Per-Ake (1958)**

*Particle Fractionation in Liquid Two-Phase Systems*

Biochimica et biophysica acta 27, 378-395

**Albertsson, Per-Ake (1977)**

*Separation of particles and macromolecules by phase partition*

Endeavour 1, 69-74

**Allison, Dean S.; Chang, Byeong, Randolph, Theodore W.; Carpenter, John F. (1999)**

*Hydrogen Bonding between Sugar and Protein Is Responsible for Inhibition of Dehydration-Induced Protein Unfolding*

Archives of Biochemistry and Biophysics, 365, 289-298

**Asenjo, J. A.; Schmidt, A. S.; Hachem, F.; Andrews, B. A. (1994)**

*Model for predicting the partition behavior of proteins in aqueous two-phase systems*

Journal of Chromatography, A 668, 47-54

**Atha, Donald H.; Ingham, Kenneth C. (1981)**

*Mechanism of precipitation of proteins by polyethylene glycols: analysis in terms of excluded volume*

Journal of Biological Chemistry 256, 12108-12117

**Audran, Régine; Peter, Katrin; Dannull, Jens; Men, Ying; Scandella, Elke; Groettrup, Marcus; Gander, Bruno; Corradin, Giampietro (2003)**

*Encapsulation of peptides in biodegradable microspheres prolongs their MHC class-I presentation by dendritic cells and macrophages in vitro*

Vaccine 21, 1250-1255

**Bakaltcheva, Irina; Ganong, Jason P.; Holtz, Bonnie L.; Peat, Raquel A.; Reid, Thomas (2000)**

*Effects of high-molecular-weight cryoprotectants on platelets and the coagulation system*  
Cryobiology 40, 283-293

**Bakaltcheva, Irina; O'Sullivan, Anne Marie; Hmel, Peter; Ogbu, Helen (2007)**

*Freeze-dried whole plasma: Evaluating sucrose, trehalose, sorbitol, mannitol and glycine as stabilizers*  
Thrombosis Research 120, 105-116

**Baker, R. W. & Lonsdale, H. K. (1974)**

*Controlled release: mechanism and rates*  
Tanquary, A.C. and Lacey, R.E. Editors, Controlled Release of Biologically Active Agents; 15-71

**Balasse, Emilie; Odot, Johann; Gatouillat, Gregory; Andry, Marie-Christine; Madoulet, Claudie (2008)**

*Enhanced immune response induced by BSA loaded in hydroxyethylstarch microparticles*  
International Journal of Pharmaceutics 353, 131-138

**Baroli, Bianca; Shastri, Venkatram Prasad; Langer, Robert (2003)**

*A method to protect sensitive molecules from a light-induced polymerizing environment*  
Journal of Pharmaceutical Sciences 92, 1186-1195

**Baroli, Biancamaria (2007)**

*Hydrogels for tissue engineering and delivery of tissue-inducing substances*  
Journal of Pharmaceutical Sciences 96, 2197-2223

**Bodmeier, Roland (2007)**

*Implantation Kit comprising a Support Phase and a Solvent*  
<http://www.freepatentsonline.com/EP1248596.html> (03.02.2009, 9:40 Uhr), EP20010909488

**Boldt, Joachim (2004)**

*Hydroxyethylstärke (HES)*  
Wiener klinische Wochenschrift 116/5-6, 159-169

**Brenda (2009)**

*Enzymdatenbank, Köln*

<http://www.brenda-enzymes.info/>

16.03.2009, 15:00 Uhr

**Brooks, Donald E. & Norris-Jones, Raymond (2000)**

*Measurement of Some Physical Properties of Aqueous Two-Phase Systems*

in *Aqueous two phase systems – Methods and Protocolls*, Rajni Hatti-Kaul (Hrsg.), Humana Press, New Jersey

**Buddecke, E. (1971)**

*Glycoproteins*

Elsevier, Amsterdam, London, New York, Herausgeber : A. Gottschalk, 535

**Burns, Janine L.; Yan, Yao-de; Jameson, Graeme J.; Biggs, Simon (2002)**

*The Effect of Molecular Weight of Nonadsorbing Polymer on the Structure of Depletion-Induced Floccs*

*Journal of Colloid and Interface Science* 247, 24-32

**Cabezas, Heriberto Jr. (1996)**

*Theory of phase formation in aqueous two-phase systems*

*Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 680, 3-30

**Carpenter, John F.; Crowe, John H. (1988)**

*The mechanism of cryoprotection of proteins by solutes*

*Cryobiology* 25, 244-55

**Cheluget, Eric L.; Gelinas, Stephanie; Vera, Juan H.; Weber, Martin E. (1994)**

*Liquid-liquid equilibrium of aqueous mixtures of poly(propylene glycol) with sodium chloride*

*Journal of Chemical and Engineering Data* 39, 127-30

**Chen, Fa-ming; Wu, Zhi-fen; Sun, Hai-hua; Wu, Hong; Xin, Su-ning; Wang, Qin-tao; Dong, Guang-ying; Ma, Zhi-wei; Huang, Sha, Zhang, Yong-jie; Jin, Yan (2006)**

*Release of bioactive BMP from dextran-derived microspheres: A novel delivery concept*

*International Journal of Pharmaceutics* 307, 23-32

**Chen, Fa-ming; Wu, Zhifen; Wang, Qintao; Wu, Hong; Zhang, Yongjie; Nie, Xin; Jin, Yan (2005)**

*Preparation and Biological Characteristics of Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2-Loaded Dextran-co-Gelatin Hydrogel Microspheres, in vitro and in vivo Studies*

Pharmacology 75, 133-144

**Chi, Eva Y.; Krishnan, Sampathkumar; Randolph, Theodore W.; Carpenter, John F. (2003)**

*Physical Stability of Proteins in Aqueous Solution: Mechanism and Driving Forces in Nonnative Protein Aggregation*

Pharmaceutical Research 20, 1325-1336

**Chung, J. T.; Vlugt-Wensink, K. D. F.; Hennink, W. E.; Zhang, Z. (2005)**

*Effect of polymerization conditions on the network properties of dex-HEMA microspheres and macro-hydrogels*

International Journal of Pharmaceutics 288, 51-61

**Clamp, J. R. & Johnson, I. (1971)**

*Glycoproteins*

Herausgeber : A. Gottschalk, Elsevier, Amsterdam, London, New York, 612 ff

**Coviello; Tommasina; Matricardi, Pietro; Marianecchi, Carlotta; Franco Alhaique (2007)**

*Polysaccharide hydrogels for modified release formulations*

Journal of Controlled Release 119, 5-24

**Cristen, Philipp & Jaussi, Rolf (2005)**

*Biochemie*

Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, 21 ff

**Crowther, John, R. (1995)**

*ELISA – Theory and Practice*

Methods in Molecular Biology 42, Humana Press, 35 ff

**da Silva, Luiza H. M. & Meirelles, Antonio J. A. (2000)**

*Phase equilibrium in polyethylene glycol/maltodextrin aqueous two-phase systems*

Carbohydrate Polymers 42, 273-278

---

**Daniels, R.; Mittermaier, E. M. (1992)**

*Use of a streaming current detector to characterize the complex coacervation of gelatin and acacia*

Pharmaceutical and Pharmacological Letters 2, 123-126

**Degim, Tuncer & Çelebi, Nevin (2007)**

*Controlled delivery of peptides and proteins*

Current pharmaceutical design 13, 99-117

**Devy, J.; Balasse, E.; Kaplan, H.; Madoulet, C.; Andry, M.-C. (2006)**

*Hydroxyethylstarch microcapsules: A preliminary study for tumor immunotherapy application*

International Journal of Pharmaceutics 307, 194-200

**Diamond, A. D.; Hsu, J. T. (1992)**

*Aqueous two-phase systems for biomolecule separation*

Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology 47, 89-135

**Diamond, Alan D. und Hsu, James T. (1990)**

*Correlation of protein partitioning in aqueous polymer two-phase systems*

Journal of Chromatography 513, 137-143

**Dominik, Andreas & Steinhilber, Dieter (1996)**

*Instrumentelle Analytik*

Jungjohann Verlag bei Gustav Fischer, 1. Auflage, 61 ff.

**Duden - Deutsches Universalwörterbuch (2007)**

6. überarbeitete Auflage, Mannheim, Leipzig, Wien, Zürich Dudenverlag

**Ehlers, Eberhard (2008)**

*Analytik II*

Deutscher Apothekerverlag Stuttgart, 11. Auflage, 414 ff

**Elkordy, Amal A.; Forbes, Robert T.; Barry, Brian W. (2004)**

*Stability of crystallized and spray-dried lysozyme*

International Journal of Pharmaceutics 278, 209-219

**EMEA (2008)**

<http://www.emea.europa.eu/humandocs/PDFs/EPAR/exubera/H-588-PI-de.pdf>

Datei erstellt am 03.06.2008, geändert am 17.11.2008

abgerufen am 05.02.2009, 10:20 Uhr

**Europäischen Arzneibuch (2008)**

6 Ausgabe, Deutscher Apotheker Verlag (Oktober 2008)

**Everett, Douglas H. (1992)**

*Grundzüge der Kolloidwissenschaft*

Steinkopf-Verlag, Darmstadt, 151-154

**Feng, Zhicheng; Shao, Zhengzhong; Yao, Jinrong; Chen, Xin (2009)**

*Protein adsorption and separation with chitosan-based amphoteric membranes*

Polymer, 50, 1257-1263

**Finkle, H. I.; Brownlow, K.; Elevitch, F. R. (1973)**

*Monoclonal IgG-lysozyme (muramidase) complex in acute myelomonocytic leukemia: an unusual finding*

American Journal of clinical pathology 60, 936-940

**Fleming, Alexander (1922)**

*On a remarkable bacteriolytic element found in tissues and secretions*

Proceedings of the royal society B93, 306

**Forciniti, D.; Hall, C. K.; Kula, M. R. (1990)**

*Interfacial tension of polyethylene glycol-dextran-water systems: influence of temperature and polymer molecular weight*

Journal of Biotechnology 16, 279-296

**Franssen, O.; Hennink, W.E. (1998)**

*A novel preparation method for polymeric microparticles without the use of organic solvents*

International Journal of Pharmaceutics 168, 1-7

**Franssen, O.; Stenekes, R. J. H.; Hennink, Wim E. (1999)**

*Controlled release of a model protein from enzymatically degrading dextran microspheres*

Journal of Controlled Release 59, 219-228

---

**Gander, Bruno; Corradin, Giampietro; Men, Ying; Thomasin, Claudio; Merkle, Hans Peter (2001)**

*Microparticles loaded with antigen and pharmaceutical compositions containing these microparticles*

<http://www.freepatentsonline.com/EP0686030.html> (03.02.2009, 9:30 Uhr), EP19950903221

**Giraldo-Zuniga, Abraham Damian; Dos Reis Coimbra, Jane Selia; Arquete, Daniela Aparecida; Minim, Luis Antonio; Mendes da Silva, Luis Henrique; Maffia, Maria Cristina (2006)**

*Interfacial Tension and Viscosity for Poly(ethylene glycol) + Maltodextrin Aqueous Two-Phase Systems*

Journal of Chemical & Engineering Data 51, 1144-1147

**Guan, Yue; Treffry, Timothy E.; Lilley, Terence H (1994)**

*Application of a statistical geometrical theory to aqueous two - phase systems*

Journal of Chromatography, A 668, 31-45

**Gündüz, Ufuk (2000)**

*Partitioning of bovine serum albumin in an aqueous two-phase system: optimization of partition coefficient*

Journal of Chromatography, B: Biomedical Sciences and Applications 743, 259-262

**Guo, Jianxin; Harn, Nicholas; Robbins, Aaron; Dougherty, Ron; Middaugh, C. Russell (2006)**

*Stability of helix-rich proteins at high concentrations*

Biochemistry 45, 28

**Gupta, R.; Bradoo, S.; R.K. Saxena (1999)**

*Aqueous two phase system: an attrtractive technology for downstream processing of biomolecules*

Current science, 77, 520-523

**Hachem, F.; Andrews, B. A.; Asenjo, J. A. (1996)**

*Hydrophobic partitioning of proteins in aqueous two-phase systems*

Enzyme and Microbial Technology 19, 507-517

**Hatti-Kaul, Rajni (2000)**

*Aqueous two phase systems – A general Overview*

in *Aqueous two phase systems – Methods and Protocolls*, Rajni Hatti-Kaul (Hrsg.), Humana Press, New Jersey

**Hatti-Kaul, Rajni (2001)**

*Aqueous Two-Phase systems: a general overview*

*Molecular Biotechnology* 19, 269-277

**Heim, E., Harling, S., Pöhling, K., Ludwig, F., Menzel, H., Schilling, M. (2007)**

*Fluxgate magnetorelaxometry of supermagnetic nanoparticles for hydrogel characterisation*

*Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 311, 150-154

**Hennink, W. E.; De Jong, S. J.; Bos, G. W.; Veldhuis, T. F. J.; van Nostrum, C. F. (2004)**

*Biodegradable dextran hydrogels crosslinked by stereocomplex formation for the controlled release of pharmaceutical proteins*

*International Journal of pharmaceutics* 277, 99-104

**Hennink, W. E.; Talsma, H.; Borchert, J. C. H.; De Smedt, S. C.; Demeester, J. (1996)**

*Controlled release of proteins from dextran hydrogels*

*Journal of Controlled Release* 39, 47-55

**Higuchi, Takeru (1961)**

*Rate of release of medicaments from ointment bases containing drugs in suspension*

*Journal of pharmaceutical sciences* 50, 874-875

**Higuchi, Takeru (1963)**

*Mechanism of sustained-action medication. Theoretical analysis of rate of release of solid drugs dispersed in solid matrices*

*Journal of Pharmaceutical Sciences* 52, 1145-1149

**Hinrichs, W. L. J.; Prinsen, M. G.; Frijlink, H. W. (2001)**

*Inulin glasses for the stabilization of therapeutic proteins*

*International Journal of Pharmaceutics* 215, 163-174

---

**Hoare, Todd R. & Kohane, Daniel S. (2008)**

*Hydrogels in drug delivery: Progress and challenges*

Polymer 49, 1993-2007

**Hoffman, Allan S. (2002)**

*Hydrogels for biomedical applications*

Advanced Drug Delivery Reviews 54, 3-12

**Huang, Cheng Zhi; Lu, Wei; Fang Li, Yuan; Huang, Yu Ming (2006)**

*On the factors affecting the enhanced resonance light scattering signals of the interactions between proteins and multiply negatively charged chromophores using water blue as an example*

Analytica Chimica Acta, 556, 469-475

**Huddleston, Jonathan; Veide, Andres; Koehler, Kristina; Flanagan, Julia; Enfors, Sven Olof; Lyddiatt, Andrew (1991)**

*The molecular basis of partitioning in aqueous two-phase systems*

Trends in Biotechnology 9, 381-388

**Hunter, Robert J. (2001)**

*Foundations of Colloid Science*

2nd Edition, Oxford University Press Inc., New York, 634-635

**Hussein, Fadwa (2007)**

*Untersuchung verschiedener Einflüsse auf die Proteinadsorption an Primärpackmitteln*

Dissertation, TU Braunschweig

**Inoue, Hideo & Timasheff, Serge N. (2004)**

*Preferential and absolute interactions of solvent components with proteins in mixed solvent systems*

Biopolymers 11, 737-743

**Jayapal, Malathy; Regupathi, Iyyaswami; Murugesan, Thanapalan (2007)**

*Liquid-Liquid Equilibrium of Poly(ethylene glycol) 2000 + Potassium Citrate + Water at (25, 35, and 45) ° C*

Journal of Chemical & Engineering Data 52, 56-59

**Johansson, Gote (1974)**

*Partition of proteins and microorganisms in aqueous biphasic systems*

Molecular and Cellular Biochemistry 4, 169-180

**Kamath, Kalpana R.; Park, Kinam (1993)**

*Biodegradable hydrogels in drug delivery*

Advanced Drug Delivery Reviews 11, 59-84

**Khalifeh, Khosrow; Ranjbar, Bijan; Khajeh, Khosro; Naderi-Manesh, Hossein; Sadeghi, Mehdi; Gharavi, Sara (2007)**

*A stopped-flow fluorescence study of the native and modified lysozyme*

Biologia (Bratislava, Slovakia) 62, 258-264

**Kopecek, Jindrich & Yang, Jiyuan (2007)**

*Hydrogels as smart biomaterials*

Polymer International 56, 1078-1098

**Kulicke, W.-M.; Heinze, T. (2006)**

*Improvements in polysaccharides for use as blood plasma expanders*

Macromolecular Symposia 231, 47-59

**L'Annunziata, Michael F. (2003)**

*Handbook of Radioactivity Analysis*

Academic Press, Amsterdam, 2. Ausgabe

**L'Annunziata, Michael F. (2007)**

*Radioactivity*

Elsevier Amsterdam, 1. Auflage, Heidelberg

**Larionova N V; Kazanskaya N F; Larionova N I; Ponchel G; Duchene D. (1999)**

*Preparation and characterization of microencapsulated proteinase inhibitor aprotinin*

Biochemistry. Biokhimii a 64, 857-862

**Laurent, Toryard C. (1963)**

*Interaction between polysaccharides and other macromolecules. VI. Solubility of proteins in dextran solutions*

Acta Chemica Scandinavica 17, 2664-2668

---

**Lee, Kuen Yong; Yuk, Soon Hong (2007)**

*Polymeric protein delivery systems*

Progress in Polymer Science 32, 669-697

**Lee, Ping I. (1985)**

*Kinetics of drug release from hydrogel matrices*

Journal of controlled release 2, 277-288

**Leuthold, Jan (2003)**

*Untersuchungen zur Qualität von peripheren Blutstammzellpräparaten - ultrastrukturelle Studien zur Beurteilung der Kryoprotektion*

<http://edoc.hu-berlin.de/dissertationen/leuthold-jan-2003-01-16/HTML/leuthold-ch2.html>

12.02.2009, 17:00 Uhr

**Lévy, M. -C.; Andry, M.-C. (1990)**

*Microcapsules prepared through interfacial cross-linking of starch derivate*

International Journal of pharmaceutics 62, 27-35

**Madeira, Pedro P.; Teixeira, Jose A.; Macedo, Eugenia A.; Mikheeva, Larissa M.; Zaslavsky, Boris Y. (2008)**

*"On the Collander equation": Protein partitioning in polymer/polymer aqueous two-phase systems.*

Journal of Chromatography, A 1190, 39-43

**Merck-Katalog, Ausgabe 2002**

**Merrill, Edward W.; Dennison, Kathleen A.; Sung, Cynthia (1993)**

*Partitioning and diffusion of solutes in hydrogels of poly(ethylene oxide)*

Biomaterials 14, 1117-1126

**Meyvis, Tom; De Smedt, Stefaan; Stubbe, Barbara; Hennink, Wim; Demeester, Joseph (2001)**

*On the release of proteins from degrading dextran methacrylate hydrogels and the correlation with the rheologic properties of the hydrogels*

Pharmaceutical Research 18, 1593-1599

**Mine, Shouhei; Ueda, Tadashi; Hashimoto, Yoshio; Imoto, Taiji (2000)**

*Analysis of the internal motion of free and ligand-bound human lysozyme by use of  $^{15}\text{N}$  nmR relaxation measurement: A comparison with those of hen lysozyme*

Protein Science 9,1669–1684

**Miroliaei, Mehran & Nemat-Gorgani, Mohsen (2002)**

*Effect of organic solvents on stability and activity of two related alcohol dehydrogenases: a comparative study*

The International Journal of Biochemistry & Cell Biology 34, 169-175

**Mohammed, Afzal R.; Coombes, Allan G. A.; Perrie, Yvonne (2007)**

*Amino acids as cryoprotectants for liposomal delivery systems*

European Journal of Pharmaceutical Sciences 30, 406-413

**Mosharraf, Mitra; Malmberg, Michael; Fransson, Jonas (2007)**

*Formulation, lyophilization and solid-state properties of a pegylated protein*

International Journal of Pharmaceutics, 336, 215-232

**Muenchow, Goetz; Schoenfeld, Friedhelm; Hardt, Steffen; Graf, Karlheinz (2008)**

*Protein Diffusion Across the Interface in Aqueous Two-Phase Systems*

Langmuir 24, 8547-8553

**Oldfield, T. J. (2001)**

*Creating structure features by data mining the PDB to use as molecular-replacement models*

Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography D57, 1421-1427

**PAA Laboratories (2009)**

persönliche Mitteilung von Dr. Herbert Hermann, 26.01.2009 um 15:20 per E-Mail

**Peppas, N. A.; Bures, P.; Leobandung, W.; Ichikawa, H. (2000)**

*Hydrogels in pharmaceutical formulations*

European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 50, 27-46

**Peppas, N.A. (1985)**

*Analysis of fickian and non-fickian drug release from polymers*

Pharmaceutica acta Helvetiae 60, 110-111

**Rinaki, E.; Valsami, G.; Macheras, P. (2003)**

*The power law can describe the 'entire' drug release curve from HPMC-based matrix tablets: a hypothesis*

International Journal of Pharmaceutics 255, 199–207

**Ritger, Philip L. & Peppas, Nikolaos A. (1987, a)**

*A simple equation for description of solute release II. Fickian and anomalous release from swellable devices*

Journal of Controlled Release 5, 37-42

**Ritger, Philip L. & Peppas, Nikolaos A. (1987, b)**

*A simple equation for description of solute release I. Fickian and non-fickian release from non-swellable devices in the form of slabs, spheres, cylinders or discs*

Journal of Controlled Release 5, 23-36

**Robert J. Hunter (2001)**

*Foundations of Colloid Science*

Oxford University Press Inc., New York, 2nd Edition, 634-635

**Roche Lexikon Medizin (2003)**

© Elsevier GmbH, Urban & Fischer Verlag, München – Jena, 5. Auflage

<http://www.gesundheit.de/roche/>

**Rote Liste (2008)**

*Fachinformationen*

Rote Liste® Service GmbH, 60329 Frankfurt/Main

**Salgado, J. Cristian; Andrews, Barbara A.; Ortuzar, Maria Fernanda; Asenjo, Juan A. (2008)**

*Prediction of the partitioning behaviour of proteins in aqueous two-phase systems using only their amino acid composition*

Journal of Chromatography, A 1178, 134-144

**Saravanan, Settu; Reena, Johny A.; Rao, Jonnalagadda R.; Murugesan, Thanapalan; Nair, Balachandran U. (2006)**

*Phase Equilibrium Compositions, Densities, and Viscosities of Aqueous Two-Phase Poly (ethylene glycol ) + Poly (acrylic acid) System at Various Temperatures*

Journal of Chemical & Engineering Data 51, 1246-1249

**Sasakawa, Shigeru; Walter, Harry (1972)**

*Partition behavior of native proteins in aqueous dextran-poly(ethylene glycol)-phase systems*

Biochemistry 11, 2760-2765

**Scheibe, Kristin (2008)**

*Hydrogele auf der Basis von Hydroxyethylstärke als Drug Delivery Systeme für die kontrollierte Freisetzung von Proteinen*

Dissertation, Braunschweig, Technische Universität, Fakultät für Lebenswissenschaften

**Schluck, A.; Maurer, G.; Kula, M.-R. (1995)**

*The influence of electrostatic interactions on partition in aqueous polyethylene glycol/dextran biphasic systems: part II*

Biotechnology and Bioengineering 47, 252-60

**Schwalbe, Harald; Grimshaw, Shaun B.; Spencer, Andrew; Buck, Matthias; Boyd, Jonathan; Dobson, Christopher M.; Redfield, Christina; Smith, Lorna J. (2001)**

*A refined solution structure of hen lysozyme determined using residual dipolar coupling data*

Protein Science 10, 677-688

**Schwedt, Georg (1981)**

*Fluorimetrische Analyse*

Verlag Chemie Weinheim Deerfield Beach Florida Basel, 1. Auflage, 27 ff

**Selby, Colin (1999)**

*Interferences in immunoassay*

Annals of Clinical Biochemistry 36, 704-721

**Shanbhag, Vithaldas P.; Axelsson, Claes G. (1975)**

*Hydrophobic interaction determined by partition in aqueous two-phase systems. Partition of*

---

*proteins in systems containing fatty-acid esters of poly(ethylene glycol)*

European Journal of Biochemistry 60, 17-22

**Sharon, N. & Eshdan, Y. (1974)**

*Lysozyme*

Herausgeber: E. F. Osserman, R. E. Canfield and S. Beychok, Academic Press, New York, London, 8. Auflage, 195

**Sigma-Aldrich Produktinformation**

[http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?N4=FD70S|SIGMA&N5=SEARCH\\_CONCAT\\_PNO|BRAND\\_KEY&F=SPEC](http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?N4=FD70S|SIGMA&N5=SEARCH_CONCAT_PNO|BRAND_KEY&F=SPEC)

16.02.2009, 17:30 Uhr

**Srinivasan, C.; Katare, Y. K.; Muthukumaran, T.; Panda, A. K. (2005)**

*Effect of additives on encapsulation efficiency stability and bioactivity of entrapped lysozyme from biodegradable polymer particles*

Journal of Microencapsulation, Vol. 22, Nr. 2, 127-138

**Stenekes, Robert J. H., Franssen, Okke; van Bommel, Elvira M. G.; Crommelin, Daan J. A.; Hennink, Wim E. (1999)**

*The use of aqueous PEG/dextran phase separation for the preparation of dextran microspheres*

International Journal of Pharmaceutics 183, 29-32

**Stolz, Werner (1996)**

*Radioaktivität – Grundlagen, Messung, Anwendung*

B. G. Teubner Verlagsgesellschaft Stuttgart, Leipzig, 3. Auflage

**Suihko, Eero J.; Forbes, Robert T.; Apperley, David C. (2005)**

*A solid-state NMR study of molecular mobility and phase separation in co-spray-dried protein-sugar particles*

European Journal of Pharmaceutical Sciences, 25, 105-112

**Taylor, Diana C.; Cripps, Allan W.; Clancy, Robert L. (1992)**

*Measurement of lysozyme by an enzyme-linked immunosorbent assay*

Journal of Immunological Methods 146, 55-61

**Tintinger, Ralf; Zhu, Jiandung; Grossmann, Christoph; Maurer, Gerd (1997)**

*Partitioning of Some Amino acids and Low Molecular Mass Peptides in Aqueous Two - Phase Systems of Poly(ethylene glycol) and Dextran in the Presence of Small Amounts of  $K_2HPO_4/KH_2PO_4$ -Buffer at 293 K: Experimental Results and Correlation*

Journal of Chemical and Engineering Data 42, 975-984

**Tjerneld, F.; Berner, S. & Cajaville, A. (1986)**

*New aqueous two-phase systems based on hydroxypropyl starch useful in enzyme purification*

Enzyme and Microbial Technology 8, 417-423

**Tzannis, Stelios T.; Prestrelski, Steven J. (1999)**

*Moisture effects on protein-excipient interactions in spray-dried powders. Nature of destabilizing effects of sucrose*

Journal of Pharmaceutical Sciences 88, 360-70.

**Ulijn, Rein V.; Bibi, Nurguse; Jayawarna, Vineetha; Thornton, Paul D.; Todd, Simon J.; Mart, Robert J.; Smith, Andrew M.; Gough, Julie E. (2007)**

*Bioresponsive hydrogels*

Materials Today 10, 40-48

**van Berlo, M.; Ottens, M.; Luyben, K. C. A. M.; van der Wielen, L. A. M. (2000)**

*Partitioning behavior of amino acids in aqueous two - phase systems with recyclable volatile salts*

Journal of Chromatography, B: Biomedical Sciences and Applications 743, 317-325

**van de Weert, Marco; Andersen, Mia Bendix; Frokjaer, Sven (2004)**

*Complex coacervation of lysozyme and heparin: Complex characterization and protein stability*

Pharmaceutical Research 21, 2354-2359

**Van Dijk-Wolthuis, W. N. E.; Hoogeboom, J. A. M.; van Steenberg, M. J.; Tsang, S. K. Y; Hennink, W. E. (1997, a)**

*Degradation and Release Behaviour of Dextran-Based Hydrogels*

Macromolecules 30, 4639-4645

---

**Van Dijk-Wolthuis, W. N. E.; Tsang, S. K. Y.; Kettenes-van den Bosch, J. J.; Hennink W. E. (1997, b)**

*A new class of polymerizable dextrans with hydrolyzable groups: hydroxyethyl methacrylated dextran with and without oligolactate spacer*

Polymer 38, 6235-6242

**Van Thienen, T. G.; Lucas, B.; Flesch, F. M.; van Nostrum, C. F; Demeester, J.; De Schmedt, S. (2005)**

*On the Synthesis and Characterization of Biodegradable Dextran Nanogels with Tunable Degradation Properties*

Macromolecules 38, 8503-8511

**Venancio A; Teixeira J A; Mota M. (1993)**

*Evaluation of crude hydroxypropyl starch as a bioseparation aqueous - phase -forming polymer*

Biotechnology progress 9, 635-639

**Venâncio, Armando; Almeida, Catarina; Teixeira, Jose A. (1996)**

*Enzyme purification with aqueous two-phase systems: comparison between systems composed of pure polymers and systems composed of crude polymers*

Journal of Chromatography, B: Biomedical Applications 680, 131-136.

**Vidal, Mary-Laure; Gautron, Joeel; Nys, Yves (2005)**

*Development of an ELISA for quantifying lysozyme in hen egg white*

Journal of Agricultural and Food Chemistry 53, 2379-2385

**Virella, G. (1975)**

*The Electrophoretic Mobility of Serum Lysozyme*

Experientia 31/12, 1465-1467

**Vlugt-Wensink, K. D. F.; Meijer, Y. J.; van Steenberg, M. J.; Verrijck, R.; Jiskoot, W.; Crommelin, D. J. A.; Hennink, W. E. (2007)**

*Effect of excipients on the encapsulation efficiency and release of human growth hormone from dextran microspheres*

European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 67, 589 – 596

**Voller, A.; Bartlett, A.; Bidwell, D. E. (1978)**

*Enzyme immunoassays with special reference to ELISA techniques*

Journal of Clinical Pathology 31, 507-520

**Walter, Harry & Johansson, Gote (1986)**

*Partitioning in aqueous two-phase systems: an overview*

Analytical Biochemistry 155, 215-242

**Wang, Wei (2005)**

*Protein aggregation and its inhibition in biopharmaceutics*

International Journal of Pharmaceutics 289, 1-30

**Wieland, Th.; Goldmann, H., Kern, W., Schultze, H. E., Matheka, H. D. (1953)**

*Versuche zur Fraktionierung von Proteingemischen mit Polyacrylsäuren*

Die Makromolekulare Chemie 10, 136-146

**Wu, You-Ting; Zhu, Zi-Qiang (1999)**

*Modeling of interfacial tension of aqueous two-phase systems*

Chemical engineering Science 54, 433-440

**Yan, Yao-de; Burns, Janine L.; Jameson, Graeme J.; Biggs, Simon (2000)**

*The structure and strength of depletion force induced particle aggregates*

Chemical Engineering Journal 80, 23–30

**Yao-de Yan; Janine L. Burns; Graeme J. Jameson; Simon Biggs (2000)**

*The structure and strength of depletion force induced particle aggregates*

Chemical Engineering Journal 80, 23–30

**Zhang, Yeli & Chuy, Chih-Chang (2002)**

*In Vitro Release Behavior of Insulin from Biodegradable Hybrid Hydrogel Networks of Polysaccharide and Synthetic Biodegradable Polyester*

Journal of Biomaterials Applications 16, 305-325

**Zündorf, Ilse & Dingermann, Theodor (2008)**

*Besonderheiten einer besonderen Wirkstoffklasse - Rekombinante Wirkstoffe*

Österreichische Apothekenzeitung Aktuell 25

## 8 Anhang

### Residuenplots

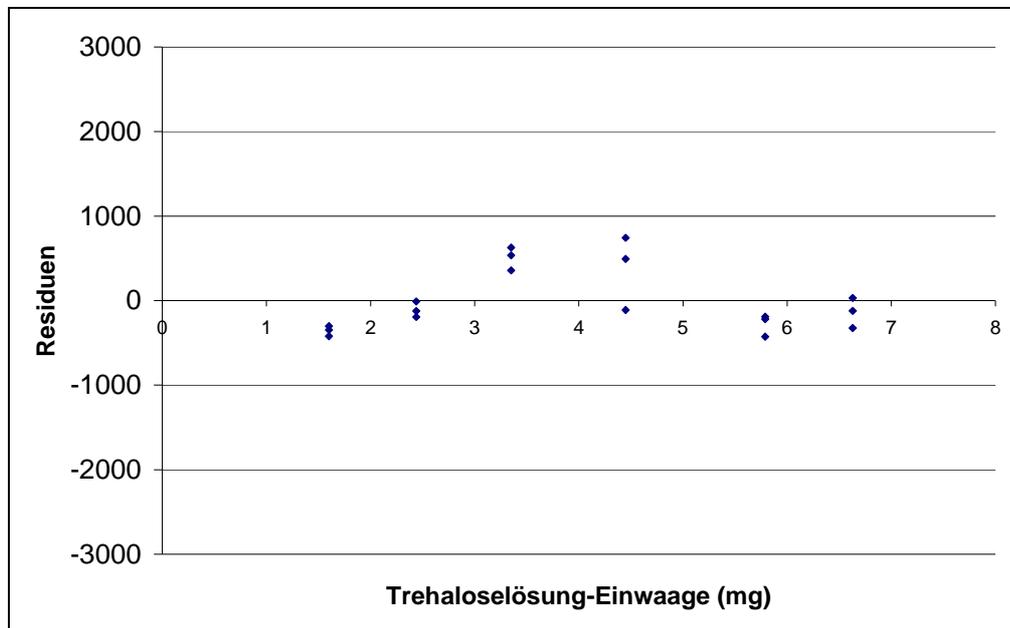


Abbildung 8-1: Residuenplot für U-<sup>14</sup>C-Trehalose (Kalibrierung und zugehörige Parameter siehe Kapitel 3.3.3.3)

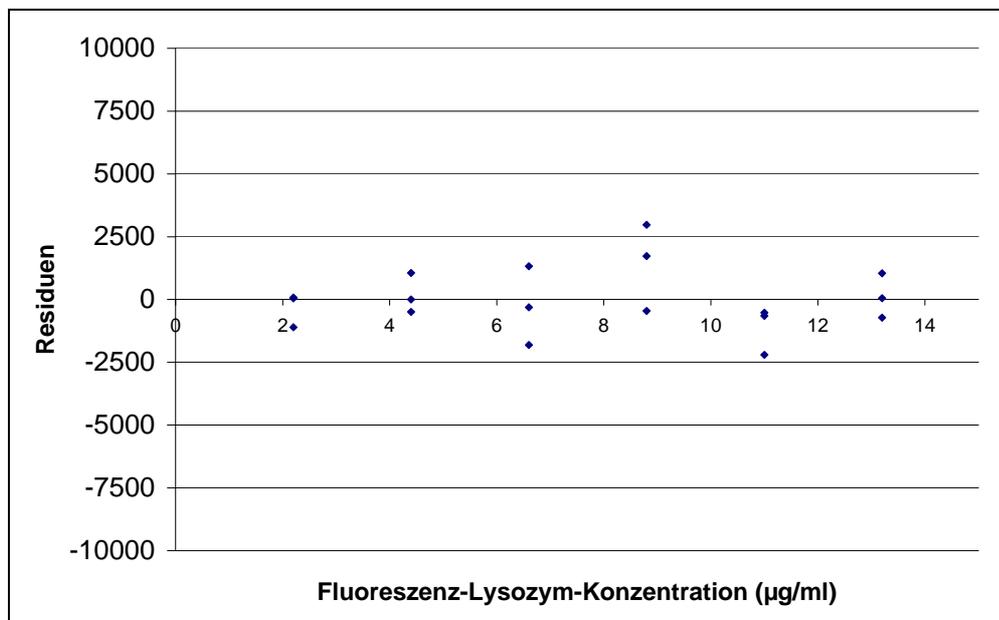


Abbildung 8-2: Residuenplot für Fluoreszenz-Lysozym in der PEG-Phase im System mit 5 % Saccharose (Kalibrierung und zugehörige Parameter siehe Kapitel 3.3.4.2.1)

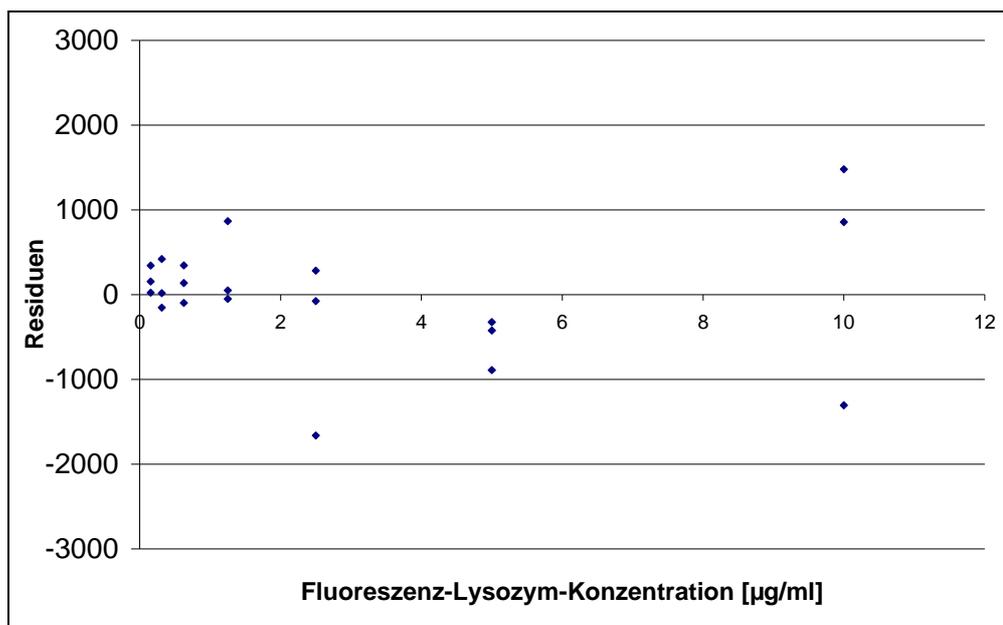
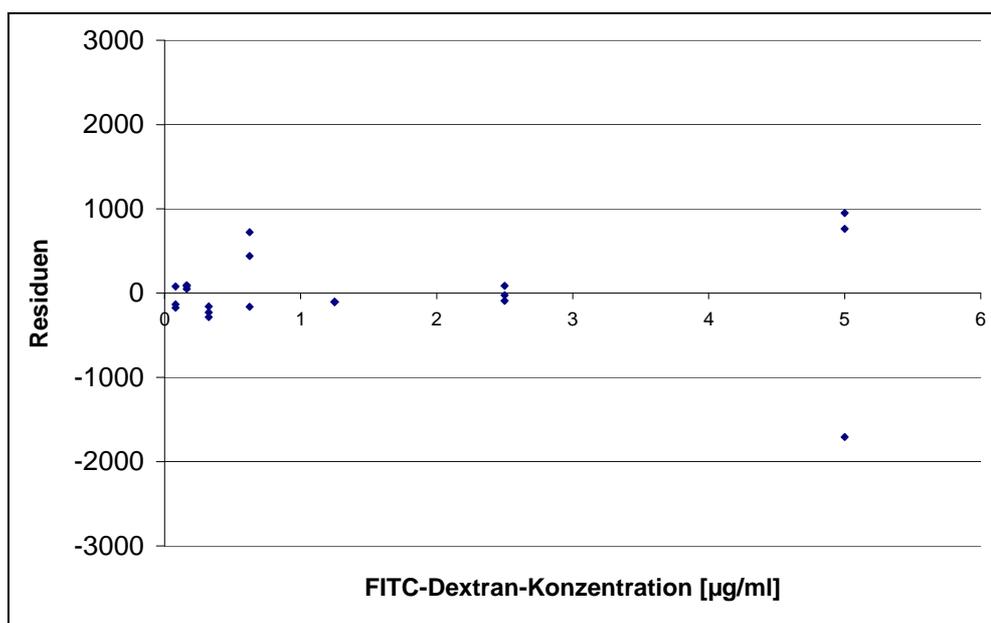


Abbildung 8-3 Residuenplot für Fluoreszenz-Lysozym in Humanserum (Kalibrierung und zugehörige Parameter siehe Kapitel 3.4.5.1)



Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren

Briel, Eger, Eisenhut, Fricker, Hilgenfeldt, Jäschke, Metzler-Nolte, Nieber, Rauwald, Reich,  
Reichling, Süß, Wießler, Wink

## Lebenslauf

24.04.1978	Geboren in Leipzig
08/92 – 06/96	Ehrenberg-Gymnasium, Delitzsch
09/96 – 06/98	Ausbildung zur pharmazeutisch-technischen Assistentin, Leipzig
07/98 – 02/99	Anerkennungspraktikum in der Kosmas-Apotheke, Ostfildern-Nellingen
WS 99/00 – SS 01	Studium der Pharmazie an der Universität Leipzig
08/01	1. Abschnitt der pharmazeutischen Prüfung
WS 01/02 – SS 03	Studium der Pharmazie an der Ruprecht-Karls-Universität, Heidelberg
10/03	2. Abschnitt der pharmazeutischen Prüfung
11/03 – 04/04	Pharmaziepraktikum in der Abteilung Forschung und Entwicklung bei Fa. GlaxoSmithKline Consumer Healthcare GmbH & Co. KG, Herrenberg
05/04 – 10/04	Pharmaziepraktikum in der Mörike-Apotheke, Nürtingen
12/04	3. Abschnitt der pharmazeutischen Prüfung, Approbation zur Apothekerin
01/05 – 09/05	Anstellung als Development Assistant Manager in der Abteilung Forschung und Entwicklung bei Fa. GlaxoSmithKline Consumer Healthcare GmbH & Co. KG, Herrenberg
10/05 – 06/09	Wissenschaftliche Angestellte am Lehrstuhl für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie der Eberhard Karls Universität, Tübingen  Beginn der Dissertation zum Thema „Einfluss von Kryoprotektoren auf Hydroxyethylstärke-basierte Hydrogele als Drug Delivery Systeme für die kontrollierte Freisetzung von Proteinen“ unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Rolf Daniels