



**BIOABBAUBARE ANTIBIOTIKATRÄGERSYSTEME  
ZUR LOKALEN BEHANDLUNG  
DER CHRONISCHEN OSTEOMYELITIS**

DISSERTATION  
ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES  
DER MATHEMATISCH-NATURWISSENSCHAFTLICHEN FAKULTÄT  
DER CHRISTIAN-ALBRECHTS-UNIVERSITÄT  
ZU KIEL

VORGELEGT VON  
**MARIEKE GOSAU**

KIEL 2010

Referent: Prof. Dr. Dr. h. c. B. W. Müller  
Korreferent: Prof. Dr. H. Steckel  
Tag der Disputation: 06. Mai 2010  
Zum Druck genehmigt: 06. Mai 2010

Prof. Dr. L. Kipp  
(Dekan)

Teile dieser Arbeit sind bereits veröffentlicht oder zur Veröffentlichung eingereicht in:

Gosau, M. und Müller, B. W., Effect of tributyl citrate on drug release from melt extruded PLGA implants. German Chapter Annual Meeting of the Controlled Release Society, Halle (2009)

Gosau, M. und Müller, B. W., Impact of PEG 400 on drug release from hot melt extruded PLGA implants. 5<sup>th</sup> German-Polish Symposium, Posen, Polen (2009)

Gosau, M. und Müller, B. W., Drug release from Taurolidine loaded, hot melt extruded PLGA-implants. 7<sup>th</sup> World Meeting of Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology (APV), Valletta, Malta (2010)

Gosau, M. und Müller, B. W., Release of gentamicin sulphate from biodegradable PLGA-implants produced by hot melt extrusion. Die Pharmazie, zur Veröffentlichung akzeptiert



Meinen Eltern gewidmet.



Wer kein Ziel vor Augen hat, kann auch keinen Weg hinter sich bringen.

Ernst Ferstl



Das Fehlen einer besonderen Kennzeichnung oder eines entsprechenden Hinweises auf ein Warenzeichen, ein Gebrauchsmuster oder einen Patentschutz lässt nicht den Schluss zu, dass über die in dieser Arbeit angegebenen Dinge frei verfügt werden kann.

---

**INHALTSVERZEICHNIS**

<b>1</b>	<b>Einleitung und Zielsetzung</b>	<b>1</b>
1.1	Einleitung	1
1.2	Zielsetzung der Arbeit	3
<b>2</b>	<b>Theoretischer Hintergrund</b>	<b>5</b>
2.1	Osteomyelitis	5
2.1.1	Endogene Osteomyelitis	6
2.1.2	Exogene Osteomyelitis	7
2.1.3	Chronische Osteomyelitis	7
2.1.4	Mikroorganismen	8
2.2	Diagnose und Behandlung der Osteomyelitis	16
2.2.1	Systemische Antibiotikatherapie	19
2.2.2	Antibiotikaträgersysteme zur lokalen Therapie	20
2.2.3	Forschungsprojekte zu lokalen Arzneistoffträgersystemen	25
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>32</b>
3.1	Material	32
3.1.1	Polylaktid-co-glykolid	32
3.1.1.1	Physiko-chemische Eigenschaften	35
3.1.1.2	Degradationsverhalten der Polymere	37
3.1.1.3	Verwendete Polymere	41
3.1.2	Arzneistoffe	42
3.1.2.1	Gentamicinsulfat	42
3.1.2.2	Taurolidin	45
3.1.3	Weichmacher	48
3.2	Methoden	51
3.2.1	Schmelzextrusion	51
3.2.1.1	Grundlagen der Schmelzextrusion	51
3.2.1.2	Verwendete Extruder	54

3.2.1.3	Herstellung der Extrudate .....	56
3.2.2	Charakterisierung.....	57
3.2.2.1	Differenz-Kalorimetrie .....	57
3.2.2.2	Röntgendiffraktometrie.....	59
3.2.2.3	Laserdiffraktometrie .....	60
3.2.2.4	Viskositätsmessungen der Polymerschmelzen.....	61
3.2.2.5	Rasterelektronenmikroskopie .....	64
3.2.2.6	Wirkstoffgehalt .....	64
3.2.2.7	Freisetzung .....	65
3.2.2.8	Arzneistoffquantifizierung.....	65
3.2.2.9	Quellung.....	70
3.2.2.10	Masseverlust.....	71
3.2.2.11	Verlauf des pH-Wertes.....	71
3.2.2.12	Strahlensterilisation.....	72
<b>4</b>	<b>Entwicklung von Gentamicinsulfat-Implantaten.....</b>	<b>73</b>
4.1	Vorauswahl geeigneter Weichmacher.....	73
4.2	Weichmachereinfluss auf Wirkstoff-Extrudate.....	80
4.2.1	Charakterisierung der Extrudate .....	81
4.2.2	In vitro Freisetzung .....	88
4.3	Modifizierung des Freisetzungsprofils .....	91
4.3.1	Einfluss der PLGA-Qualität auf das Freisetzungsprofil .....	93
4.3.2	Extrudate mit dem Weichmacher Tributylcitrat .....	94
4.3.2.1	Glasübergangs- und Extrusionstemperaturen .....	95
4.3.2.2	Freisetzung aus den Tributylcitrat-Formulierungen .....	97
4.3.3	Extrudate mit dem Weichmacher PEG 400 .....	101
4.3.3.1	Glasübergangs- und Extrusionstemperaturen .....	103
4.3.3.2	Freisetzung aus den PEG 400-Formulierungen .....	105
4.3.4	Vergleich der Extrudate mit PEG 400 und TBC.....	117
4.4	Charakterisierung der Gentamicinsulfat-Extrudate .....	118

---

4.4.1	Rheologische Betrachtungen der Polymerschmelzen .....	120
4.4.2	Reproduzierbarkeit und Gleichförmigkeit des Gehalts.....	125
4.4.3	Freisetzung .....	128
4.4.4	Vergleich mit Septopal® .....	132
4.4.5	Degradation der Extrudate.....	135
4.4.6	Oberflächenmorphologische Betrachtungen der Extrudate .....	142
4.4.7	Einfluss einer Strahlensterilisation .....	147
4.5	Zusammenfassung des Kapitels .....	150
<b>5</b>	<b>Entwicklung von Taurolidin-Implantaten .....</b>	<b>153</b>
5.1	Herstellung erster Taurolidin-Extrudate.....	153
5.1.1	Glasübergangs- und Extrusionstemperaturen .....	155
5.1.2	Charakterisierung des vorliegenden dispersen Systems .	158
5.1.3	In vitro Freisetzung .....	162
5.2	Charakterisierung der Taurolidin-Extrudate .....	168
5.2.1	Rheologische Betrachtungen der Polymerschmelzen .....	169
5.2.2	Reproduzierbarkeit und Gleichförmigkeit des Gehalts.....	171
5.2.3	In vitro Freisetzung .....	174
5.2.4	Degradation der Extrudate.....	177
5.2.5	Oberflächenmorphologische Betrachtungen der Extrudate .....	182
5.2.6	Einfluss einer Strahlensterilisation .....	185
5.3	Zusammenfassung des Kapitels .....	188
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung der Arbeit.....</b>	<b>192</b>
<b>7</b>	<b>Abstract.....</b>	<b>195</b>
<b>8</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>198</b>
8.1	Abkürzungen .....	198
8.2	Verwendete Substanzen .....	201
<b>9</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>203</b>

---



# 1 EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG

## 1.1 EINLEITUNG

Osteomyelitis (griechisch: Knochenmarkentzündung) ist eine progressiv entzündliche Infektion des Knochens, die sowohl als akute als auch als chronische Erkrankung auftreten kann. Dabei ist insbesondere die chronische Form schwer zu therapieren und stellt damit eine enorme Herausforderung für die behandelnden Ärzte dar (Garvin und Feschuk, 2005). Die Knochenmarkentzündung wird in der Regel durch Bakterien, vor allem durch den Erreger *Staphylococcus aureus*, verursacht. In seltenen Fällen kann sie aber auch durch Viren oder Pilze hervorgerufen werden (Lew und Waldvogel, 2004).

Bei der Knochenmarkentzündung wird zwischen endogener (oder auch hämatogener) und exogener Infektion unterschieden. Die endogene Osteomyelitis wird durch Bakterien verursacht, die von einem anderen Infektionsherd im Körper stammen und über das Blut ins Knochenmark gelangen (Bertram, 2006). Eine exogene Infektion hingegen kann nach Verletzungen oder Operationen entstehen, wodurch Erreger von außen eingeschleppt werden. Beide Formen können akut und chronisch verlaufen. Während bei endogenen und meist auch bei akuten Verlaufsformen normalerweise eine rein systemische Antibiotikatherapie kombiniert mit der Ruhigstellung des betroffenen Bereiches zur Genesung führt, ist dies bei chronischer Knochenmarkentzündung in der Regel nicht möglich. Die chronische Form der Erkrankung ist charakterisiert durch eine langandauernde Infektion, Nester von abgestorbenem und infiziertem Knochenmaterial, ischämischem Gewebe und einen refraktären klinischen Verlauf (Gentry, 1997). Neben einer systemischen Antibiotikatherapie ist bei der Behandlung der chronischen Osteomyelitis eine Operation, bei der ein Débridement, das

heißt eine Entfernung des gesamten infizierten und abgestorbenen Knochenmaterials und Gewebes, durchgeführt wird, unumgänglich (Cierny et al., 2003). Zusätzlich erfolgt häufig eine lokale antibiotische Therapie mit arzneistoffbeladenen Kugelketten, die in den durch das Débridement entstandenen Hohlraum eingebracht werden. Dadurch werden lokal hohe und gleichzeitig systemisch niedrige Wirkstoffkonzentrationen erreicht und somit wird eine signifikante Senkung der Nebenwirkungen erzielt (Blaha et al., 1993). Die Matrix dieser Kugeln besteht aus Polymethylmethacrylat, einem nicht bioabbaubaren Polymer. Aufgrund dessen müssen die Kugelketten in einer zweiten Operation wieder entfernt werden. Um diese zusätzliche Belastung für die Patienten und die mit der zweiten Operation verbundenen Kosten zu senken, ist die Entwicklung bioabbaubarer Arzneistoffträgersysteme Gegenstand vieler Untersuchungen.

## 1.2 ZIELSETZUNG DER ARBEIT

Das Ziel dieser Arbeit ist, ein lokales Antibiotikaträgersystem für die Behandlung der chronischen Osteomyelitis zu entwickeln und zu charakterisieren. Um eine optimale Wirkung bei gleichzeitig geringer Belastung des Körpers durch Nebenwirkungen oder durch Folgeoperationen zu erreichen, soll ein solches System Bioabbaubarkeit und Biokompatibilität sowie ein der Erkrankung angepasstes Freisetzungsprofil in sich vereinen.

Als Trägermatrix soll das Copolymer Polylaktid-co-glykolid eingesetzt werden. Es stellt den „Goldstandard“ unter den bioabbaubaren und biokompatiblen Polymeren aufgrund der variablen Eigenschaften durch unterschiedliche Zusammensetzungen des Polymers (zum Beispiel Monomerenverhältnisse) und die ausreichende Erfahrung bei der Anwendung im Humanbereich dar (Beck-Broichsitter et al., 2010).

Die Herstellung der Implantate, das bedeutet die Inkorporation eines Wirkstoffs in die Polymermatrix, soll dabei durch Schmelzextrusion erfolgen, ein Verfahren das zunehmend bei der Entwicklung innovativer Arzneiformen eine Rolle spielt. Es handelt sich um einen einfachen, lösungsmittelfreien und kontinuierlichen Prozess, bei dem das Gut mittels einer Schnecke durch ein Zylinder gefördert, aufgeschmolzen, homogenisiert und anschließend durch eine Düse gepresst wird. Da sowohl der Arzneistoff als auch das Polymer bei diesem Herstellungsverfahren einer gewissen Temperaturbelastung ausgesetzt sind, soll untersucht werden, ob und in welchem Umfang die Prozesstemperatur durch Weichmacher erniedrigt werden kann. Weiterhin soll der Einfluss der Weichmacher auf die Arzneiform und deren Freisetzungsverhalten untersucht werden.

Um die produzierten Implantate mit den etablierten Polymethylmethacrylat-Kugeln vergleichen zu können, soll zunächst zur



Entwicklung der Arzneiform derselbe Wirkstoff, das Aminoglykosid Gentamicinsulfat, in das Matrixsystem eingebettet werden. Gentamicinsulfat ist ein potentes Breitspektrumantibiotikum, das unter anderem aufgrund seiner hohen Thermostabilität häufig zur Inkorporation in Matrices durch einen Schmelzprozess verwendet wird. Abschließend soll versucht werden, das Arzneistoffträgersystem auf den Wirkstoff Taurolidin zu übertragen. Taurolidin ist ein antimikrobielles Chemotherapeutikum mit einem breiten Wirkspektrum gegen Bakterien, Mykobakterien und einige Pilze, das zusätzlich bakterielle Endo- und Exotoxine inaktiviert und deutlich die Adhärenz pathogener Mikroorganismen an Wirtszellen mindert. Der Wirkmechanismus des Taurolidins – eine chemische irreversible Reaktion mit der Bakterienzellwand – verhindert die Entwicklung von Resistenzen, wodurch die Anwendung von Taurolidin insbesondere bei der Therapie der chronischen Osteomyelitis vorteilhaft ist, da die Persistenz häufig durch resistente Keime hervorgerufen wird (Torres-Viera et al., 2000).

## 2 THEORETISCHER HINTERGRUND

### 2.1 OSTEOMYELITIS

Osteomyelitis ist eine akute oder chronische Infektion des Knochenmarks und wird im Allgemeinen durch Bakterien, in Ausnahmefällen aber auch durch Mykobakterien oder Pilze hervorgerufen. Diese Erkrankung ist sehr schmerzhaft für die betroffenen Patienten und zusätzlich schwer zu behandeln. Trotz der enormen Fortschritte in der Behandlung von infektiösen Krankheiten bereitet die Knochenentzündung noch immer große Probleme und stellt nach wie vor eine enorme Herausforderung an die Ärzte dar (Lazzarini et al., 2004). Basierend auf der Pathogenese lässt sich die Osteomyelitis in drei Kategorien einteilen (Haas und McAndrew, 1996):

1. Infektion hervorgerufen durch ein Ereignis wie einen offenen Knochenbruch (posttraumatisch) oder eine Operation am angrenzenden Knochen oder Gelenk (postoperativ).
2. Osteomyelitis als Folge vaskulärer Insuffizienz, zum Beispiel bei Diabetikern oder Patienten mit Dekubitus, wo eine Entzündung des umgebenden Gewebes sich auf den Knochen ausbreitet.
3. Hämatogene Knochenmarksentzündung, die durch Keime ausgelöst wird, die über die Blutbahn von einem Infektionsherd außerhalb des Knochens in das Knochenmark gelangen und die insbesondere bei Kindern und Jugendlichen auftritt.

Nach Gross et al. (2002) tritt die erste Kategorie mit 47% am häufigsten auf, während die Osteomyelitis als Folge von vaskulärer Insuffizienz bei 34% und die hämatogene Osteomyelitis nur bei 19% der Patienten die Ursache darstellt.

Die posttraumatische und die postoperative Osteomyelitis lassen sich mit der sekundär zur vaskulären Insuffizienz auftretenden Osteomyelitis

unter exogener Osteomyelitis zusammenfassen, da die Keime von außen in den Knochen eindringen und sich ausbreiten. Eine weitere Unterteilung der Osteomyelitis begründet sich auf den klinischen Verlauf der Erkrankung unabhängig von der Pathogenese. So spricht man bei einer Infektion, die sich über einen Zeitraum von einigen Tagen bis zu einigen Wochen hinzieht, von einer akuten Osteomyelitis. Nicht genau davon abgegrenzt hat die chronische Osteomyelitis eine Dauer von einigen Wochen bis hin zu mehreren Jahren bei einer persistierenden Form der Erkrankung (Lew und Waldvogel, 2004).

Die Symptome der Osteomyelitis sind sehr unterschiedlich, lassen sich aber allgemein mit einem Krankheitsgefühl, starken Schmerzen im Bereich des infizierten Knochens und Fieber zusammenfassen. Zusätzlich können unter anderem Symptome wie diffuse Schmerzen, wiederkehrende Schwellungen, Fisteln und Funktionseinschränkungen auftreten.

### **2.1.1 ENDOGENE OSTEOMYELITIS**

Die hämatogene (endogene) Osteomyelitis tritt zu 80% im Kindesalter auf und wird aufgrund dessen auch in Säuglings-, juvenile und Erwachsenenosteomyelitis unterteilt. Auslösende Bakterienherde finden sich etwa bei einer Mandelentzündung, Nasennebenhöhlenentzündung, Zahnwurzelentzündung oder auch bei einer Entzündung der Talgdrüsen (Furunkeln).

Die Knocheninfektion der hämatogenen Osteomyelitis hat zumeist ihren Ursprung in den Gefäßen der Metaphyse, der wachstumsaktiven Zone des Knochens. Aufgrund der zunehmenden Gefäßgröße und der großvolumigen Venen nimmt hier die Blutflussgeschwindigkeit ab, wodurch die Bakterien leichter adhären und bakterielle Embolien auslösen können (Haas und McAndrew, 1996). Diese rufen wiederum

eine Nekrose des Gewebes hervor, in der es zur weiteren Vermehrung der Keime kommt und somit zur Abzessbildung im Knochenmark, die sich unbehandelt weiter ausbreiten kann.

### **2.1.2 EXOGENE OSTEOMYELITIS**

Die exogene Osteomyelitis wird durch Bakterien hervorgerufen, die durch eine Wunde in den Körper eingetreten sind. Ursachen dafür sind hauptsächlich offene Knochenbrüche und Operationen, können aber auch kleine Wunden in Kombination mit einer schlechten Durchblutung des umgebenden Gewebes wie zum Beispiel bei einem diabetischen Fuß sein. Betroffen sind hauptsächlich männliche Erwachsene, da diese häufiger als Frauen Unfälle mit offenen Knochenbrüchen haben.

Allgemein spielt bei der exogenen Osteomyelitis eine schlechte Durchblutung - hervorgerufen durch Primärerkrankungen wie zum Beispiel Diabetes und Dekubitus, durch geronnenes Blut, devitalisierten Knochen sowie gequetschtem und nekrotischem Weichteilgewebe bei posttraumatischer Osteomyelitis - eine große Rolle (Peters, 2006). Dieses minder durchblutete Gewebe bietet den Bakterien einen optimalen Nährboden und sie können sich leicht vermehren. Einige Bakterien, wie zum Beispiel *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), können außerdem gut an körperfremdes Material wie metallische Platten, die bei Knochenbrüchen zur Stabilisation eingesetzt werden, oder Osteosynthesematerialien adhären. Fremdmaterial bildet somit einen weiteren Risikofaktor für eine exogenen Knocheninfektion (Tsukayama, 1999).

### **2.1.3 CHRONISCHE OSTEOMYELITIS**

In 15-30% der Fälle entsteht aus der akuten eine chronische Osteomyelitis (Gross et al., 2002). Sie entwickelt sich dabei im

Allgemeinen aus der exogenen Knocheninfektion als sekundäre, chronische Form, kann aber auch sekundär aus der hämatogenen Form entstehen oder als primäre chronische Form auftreten. Charakterisiert wird die chronische Osteomyelitis durch die Persistenz der Erreger, durch eine langdauernde Infektion, Bildung von Fisteln und das Auftreten von Sequestern (abgestorbene Knochenstücke) (Lew und Waldvogel, 2004). Diese Sequester stellen optimale Nester für die bakterielle Persistenz dar (Haas und McAndrew, 1996), da die Bakterien an das abgestorbene Gewebe leicht adhären können, wodurch auch eine physiologische Transformation zu koloniebildenden pathogenen Keimen hervorgerufen wird. Innerhalb einer undurchdringbaren Glykokalix (Kapsel bestehend aus Polysacchariden) sind die Bakterien vor der körpereigenen Immunabwehr durch Phagozyten und vor systemisch applizierten Antibiotika geschützt (Cierny und DiPasquale, 2006). Diese eingekapselten Bakterien können selbst nach Jahren der Ruhe eine erneute akute Infektion des Knochens und die damit folgenden ausgiebigen therapeutischen Maßnahmen evozieren.

### **2.1.4 MIKROORGANISMEN**

Je nach Osteomyelitisart unterscheidet sich das Spektrum an vorkommenden Mikroorganismen im infizierten Knochen. Während bei der hämatogenen Osteomyelitis in der Regel nur ein Mikroorganismus für die Infektion verantwortlich ist, werden bei der exogenen Osteomyelitis in 30-50% der Fälle verschiedene Mikroorganismen aus dem Knochen isoliert. Das für Osteomyelitis typische Erregerspektrum ist in Tabelle 2.1 aufgeführt (Gentry, 1997).

Tabelle 2.1: Erregerspektrum der Osteomyelitis

Form der Osteomyelitis	Vorkommende Mikroorganismen
Hämatogene (endogene)	Staphylococcus aureus Escherichia coli Streptococcus pyogenes Staphylococcus epidermidis Pseudomonas aeruginosa Streptokokken der Gruppe B Gram-negative Bakterien
Exogene	Staphylococcus aureus Staphylococcus epidermidis Gram-negative Bakterien Anaerobe Bakterien Mykobakterien Enterococcus faecalis Candida sp. Streptokokken

Sowohl bei der hämatogenen als auch bei der exogenen Osteomyelitis ist *Staphylococcus aureus* der bei weitem am häufigsten auftretende Keim. So sind circa 75% der Mikroorganismen, die aus dem infizierten Knochen isoliert werden, *S. aureus* und Koagulase-negative Staphylokokken (Brady et al., 2006). *S. aureus* wird daher im Folgenden näher betrachtet.

*S. aureus* ist ein kugelförmiges, unbewegliches, nichtsporenbildendes, fakultativ anaerobes, gram-positives Bakterium mit einer Größe von 0,8 bis 1,2  $\mu\text{m}$ . Dieser Keim ist ubiquitär in der Natur verbreitet; so tragen 20% bis 30% der Bevölkerung diesen Keim in der Nase und ca. 50% auf der Haut. Neben *Escherichia coli* gehört *S. aureus* zu den häufigsten Erregern bakterieller Infektionen beim Menschen. *S. aureus* besitzt eine Reihe von Pathogenitätsfaktoren, die weniger schwere Erkrankungen

wie kleinere Hautinfektionen (Furunkel) oder Keratitis (Hornhautentzündung) bis hin zu lebensbedrohlichen Krankheiten wie Endokarditis (Herzhautentzündung), Meningitis (Hirnhautentzündung), Sepsis (Blutvergiftung) und Osteomyelitis auslösen können.

Die Pathogenität von *S. aureus* begründet sich dabei auf verschiedene Faktoren. Zu Beginn einer Infektion werden hauptsächlich Proteine exprimiert, die das Anhaften an Oberflächen (Adhäsine) und die Kolonisation fördern, wie zum Beispiel das Fibronektin-bindende Protein, der Clumping-Faktor A und die Koagulase. Fibronektin ist unter anderem für Gewebsreparaturen verantwortlich, lagert sich aber auch an Fremdmaterialoberflächen an und ermöglicht somit *S. aureus* die Adhäsion an zum Beispiel Implantaten (Peters, 2006). Der Clumping-Faktor A ist ein Fibrinogen-Rezeptor, während sich die Koagulase mit menschlichem Prothrombin zu Staphthrombin verbindet. Dieses wiederum wandelt Fibrinogen in Fibrin um, so dass an die Bakterienwand gebundene Fibrin-Fasern entstehen. Aufgrund des körpereigenen Fibrins entsteht eine Schutzschicht und der Keim wird nicht mehr vom Immunsystem als körperfremd erkannt. Auch das Protein A, das in dieser Phase ausgeschüttet wird, schützt das Bakterium vor der Immunabwehr, indem es Immunoglobuline so bindet, dass Phagozyten diese nicht mehr erkennen können. Wenn hohe Zelldichten erreicht sind, werden Toxine und Enzyme freigesetzt, die die Immunabwehr aktivieren, aber auch die umgebenden Körperzellen schädigen, Nährstoffe vom Wirt einholen und die Ausbreitung fördern (Brady et al., 2006).

Ein weiterer enormer Pathogenitätsfaktor ist die Persistenz der Infektionen, begründet durch die Fähigkeit einiger *S. aureus* Stämme Biofilme zu produzieren (Ziegler, 2006). Biofilme sind Zusammenschlüsse aus Bakterien, auch verschiedener Spezies, eingebettet in eine

Glykokalix oder schleimige Matrix bestehend aus Polysacchariden angeheftet an ein Substrat. Bei einer schleimigen Matrix bestehen im Gegensatz zur Bakterienkapsel keine kovalenten Bindungen der Polysaccharide mit der Zellmembran des Bakteriums. Diese Biofilme können an Oberflächen von devitalisiertem Gewebe, Sequestern oder auch Implantaten angelagert sein (Gristina et al., 1985; Stewart und Costerton, 2001). Die Zellen des Biofilms sind mit einer Matrix aus Exopolysacchariden ummantelt. Die so gebildete Kapsel schützt die Bakterien aufgrund der geringen Penetration in den Biofilm vor der Immunabwehr des Wirtes und gegen Antibiotika. Empfindlichkeitstests an einem in vitro Biofilm-Modell zeigten, dass Bakterien in einem Biofilm teilweise 100- bis 1000-fache Antibiotika-Konzentrationen der minimalen Hemmkonzentration überleben können (Ceri et al., 1999). Innerhalb des Biofilms können die Bakterien durch kleine hormonähnliche Moleküle kommunizieren (Quorum sensing) und können so zum Beispiel die Produktion von Exopolysacchariden zur Kapselbildung oder die Expression von Pathogenitätsfaktoren induzieren (Kong et al., 2006). Die Fähigkeit von *S. aureus*, selbst an inerten Oberflächen zu binden, und die Möglichkeit, Biofilme zu bilden, sind entscheidende Faktoren bei der Entstehung von akuter und chronischer Osteomyelitis ausgelöst durch diesen Keim.

Neben den zahlreichen Pathogenitätsfaktoren von *S. aureus* erschwert aber auch seine Fähigkeit, Antibiotikaresistenzen auszubilden, die Behandlung einer solchen Infektion. 1961 wurden in den USA kurz nach Einführung des Antibiotikums Methicillin die ersten resistenten *S. aureus* Stämme beobachtet (MRSA = **M**ulti-resistenter **S**taphylococcus **a**ureus). Diese Stämme verfügen über zwei verschiedene Mechanismen, die für die Resistenzen gegen  $\beta$ -Laktam-Antibiotika verantwortlich sind. Zum einen besitzen sie ein verändertes Penicillin-Bindeprotein (PBP 2a), das



sie aufgrund einer geringeren Bindungsaffinität gegen sämtliche  $\beta$ -Laktam-Antibiotika unempfindlich macht. Das normale PBP ist die bakterielle Transpeptidase, die für die Quervernetzung der Peptidoglykane in der bakteriellen Zellwand grampositiver Bakterien zuständig ist.  $\beta$ -Laktam-Antibiotika binden irreversibel an dieses Enzym und unterbinden so die Synthese der Zellwand. Zum anderen verfügen sie über die Möglichkeit zur Bildung des Enzyms  $\beta$ -Laktamase, welches den  $\beta$ -Laktam-Ring aller  $\beta$ -Laktam-Antibiotika hydrolysiert und diese somit inaktiviert. Gegen diesen zweiten Resistenzmechanismus wurden penicillinasefeste Antibiotika wie Methicillin und Oxacillin entwickelt, gegen die aber dennoch der erste Resistenzmechanismus wirksam ist. Somit konnten sich Methicillin-resistente *S. aureus* Stämme bilden.

MRSA wird in drei Gruppen unterteilt, je nach Bereich, in welchem die resistenten Keime erworben wurden:

- a. haMRSA (**h**ospital or **h**ealthcare acquired MRSA) → im Krankenhaus
- b. caMRSA (**c**ommunity acquired MRSA) → ambulant
- c. laMRSA (**l**ivestock-associated MRSA) → bei Tieren der landwirtschaftlichen Tierzucht

Die Gruppe der haMRSA ist in Deutschland am weitesten verbreitet, und sie nimmt auch innerhalb der nosokomialen (im Krankenhaus erworbenen) Infektionen eine herausragende Stellung ein. So stieg der Anteil der resistenten *S. aureus* Stämme im Zeitraum von 1990 bis 2004 von 1,7% auf 22,6% (Abbildung 2.1), wobei sich die Prävalenzrate in den letzten Jahren stabilisiert hat (Kresken et al., 2006). Im europa- und weltweiten Vergleich liegt Deutschland im Mittelfeld. Während in den südeuropäischen Ländern, Großbritannien, USA und Japan die Prävalenz mit  $> 30\%$  deutlich höher liegt, schaffen es die skandinavischen Länder und die Niederlande durch umfangreiche

Maßnahmen, die Raten unter 5% zu halten (Kluytmans und Struelens, 2009).

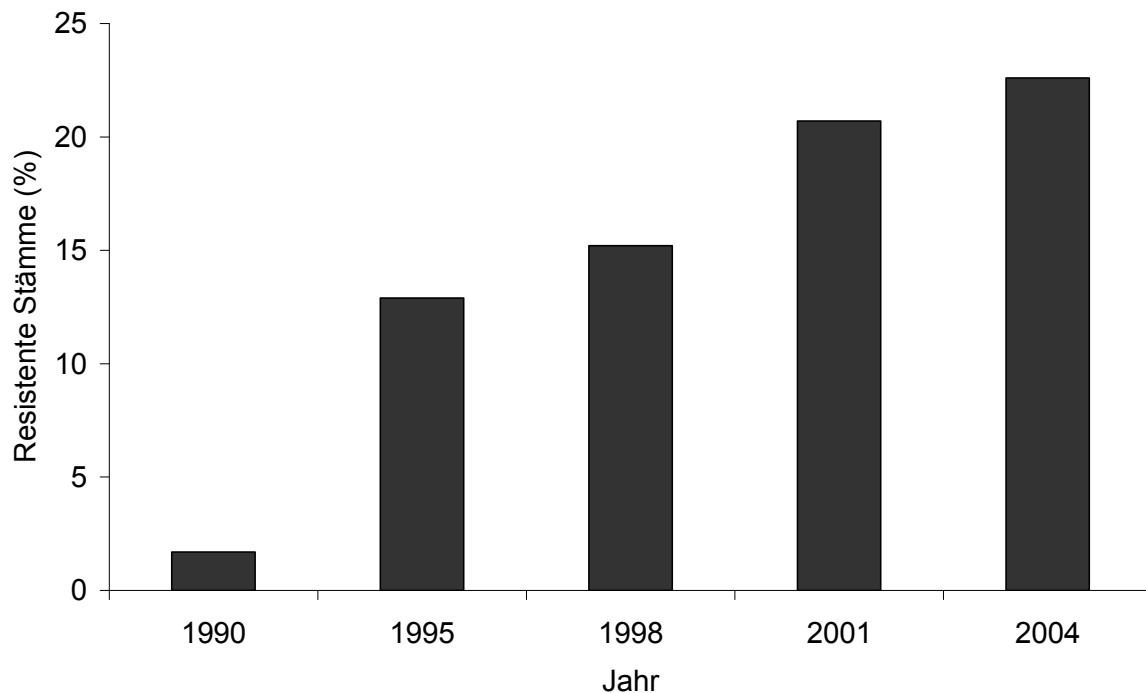


Abbildung 2.1: Zunahme resistenter *S. aureus* Stämme in Deutschland von 1990 bis 2004

Allgemein gelten Krankenhausaufenthalte, chronische Pflegebedürftigkeit, ambulante chirurgische Eingriffe, Dialyse, chronische Infektionen und liegende Katheter als Risikofaktoren für eine Infektion mit haMRSA (Zimmerli, 2005). Dagegen tritt caMRSA bei gesunden Menschen auf, die nicht den oben genannten Risikofaktoren ausgesetzt waren, und manifestiert sich meistens durch Hautinfektionen, wie Furunkel, Abzesse oder Follikulitis, kann aber auch zu schwerwiegenden Infektionen wie Osteomyelitis führen.

In der dritten Gruppe der MRSA - laMRSA - werden Personen von Tieren, vor allem von Schweinen, mit dem Keim infiziert. Das Krankheitspotenzial dieser Bakterien und auch die genauen Übertragungswege sind derzeit Gegenstand unterschiedlicher Studien (Friedrich, 2009).

MRSA, insbesondere haMRSA, ist häufig auch resistent gegen Antibiotika anderer Gruppen wie zum Beispiel Aminoglykoside, Makrolide, Lincosamide, Streptogramine und Fluorochinolone. Die Aminoglykosid-Resistenz wird durch die Fähigkeit hervorgerufen, die Enzyme Acetyltransferase und Phosphorylase bilden zu können. Diese beiden Enzyme können dann Aminoglykoside wie zum Beispiel Gentamicin acetylieren, bzw. phosphorylieren und damit ebenfalls einen Wirkungsverlust bewirken (Maurer, 2009). Die Resistenz gegen Makrolide, Lincosamide und Streptogramine beruht auf folgenden Mechanismen: chemische Modifikation der zellulären Angriffsstelle der Arzneistoffe, enzymatische Inaktivierung sowie Ausschleusung der Wirkstoffe und Mutationen ribosomaler Proteine und rRNA (Petridu, 2002). Kreuzresistenzen bei Fluorchinolonen bilden sich heraus, wenn der Resistenzmechanismus auf Mutationen in der bakteriellen Gyrase basiert.

Lange Zeit wurde bei multiresistenten *S. aureus* Stämmen das Reserveantibiotikum Vancomycin (ein Glykopeptid) eingesetzt. Mittlerweile treten aber auch schon Vancomycin intermediär resistente **S. aureus** (VISA) (seit 1997) und Vancomycin resistente **S. aureus** (VRSA; seit 2002) Stämme in Erscheinung. Die Unempfindlichkeit der VISA Stämme beruht auf einer Änderung der Zellphysiologie durch Genmutation und veränderte Expression bestimmter Gene. Dies ruft eine charakteristische Verdickung der Zellwand hervor, welche die Wirkung aller Glykopeptid-Antibiotika herabsetzt (Cui et al., 2003). Die VRSA Stämme dagegen erreichen eine Resistenz durch ein Vancomycin-Resistenz-Plasmid, das von *Enterococcus faecalis* durch Konjugation übertragen wird. *Enterococcus faecalis* weist drei Resistenzmechanismen gegen Glykopeptid-Antibiotika durch die Gene VanA, VanB und VanC auf. VanC liegt auf dem Bakterienchromosom und ist somit nicht auf andere

Stämme übertragbar. Die Gene VanA und VanB sind auf konjugativen Plasmiden lokalisiert und 2003 konnte erstmals die in vivo Übertragung des Gens VanA von *Enterococcus faecalis* auf *Staphylococcus aureus* nachgewiesen werden (Weigel et al., 2003). Vancomycin hemmt den Aufbau der bakteriellen Zellwand, indem es mit den Bausteinen zur Quervernetzung, den D-Alanyl-D-Alanin-Gruppen, Komplexe bildet. Die Resistenzgene exprimieren nun einen anderen Baustein (D-Lactat anstelle von D-Alanin), an das das Vancomycin nicht binden und somit die Quervernetzung nicht blockieren kann.

In Abbildung 2.2 sind die Trends der Resistenzentwicklungen bei *S. aureus* in Deutschland im Zeitraum 2002 bis 2006 gegen die Antibiotikagruppen  $\beta$ -Laktam-Antibiotika (Oxacillin), Fluorchinolone (Ciprofloxacin), Aminoglykoside (Gentamicin, Tobramycin), Makrolide (Erythromycin) und Lincosamide (Clindamycin) dargestellt (**German Network for Antimicrobial Resistance Surveillance, GENARS**).

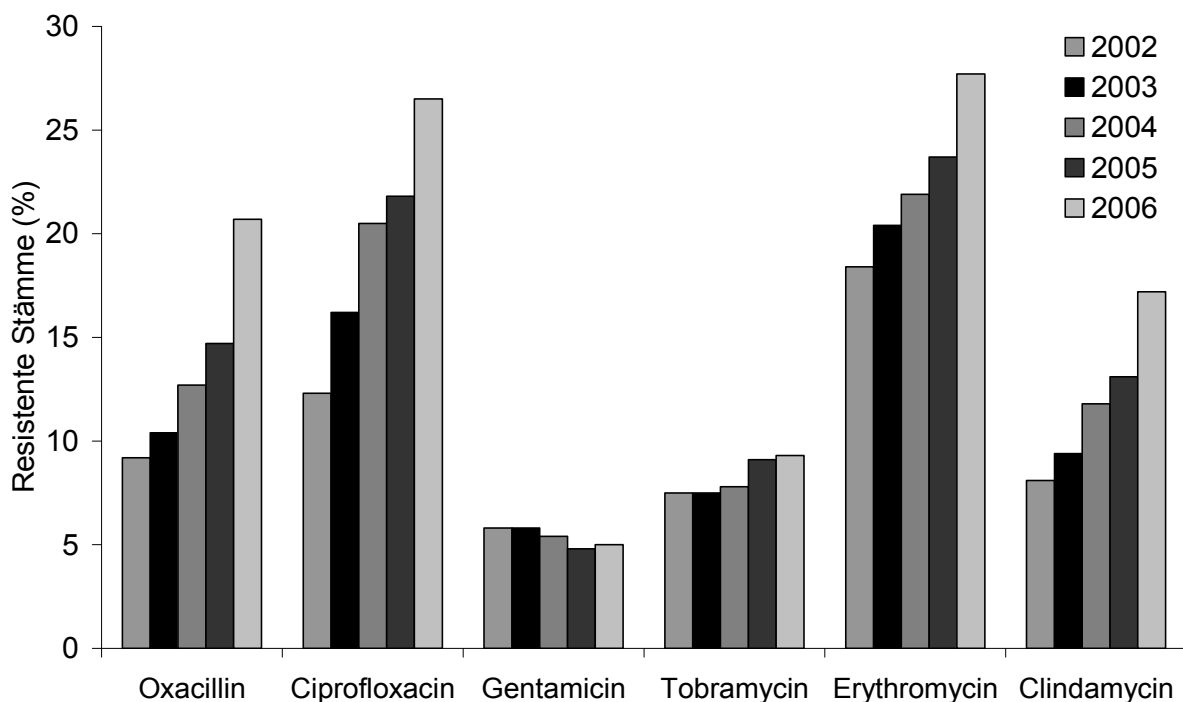


Abbildung 2.2: Auftreten resistenter Bakterienstämme gegen verschiedene Antibiotika von 2002 bis 2006 (in %)

Deutlich ist ein kontinuierlicher Anstieg der Resistenzprävalenzen gegen die unterschiedlichen Antibiotikagruppen erkennbar. Einzige Ausnahme bildet dabei das Aminoglykosid Gentamicinsulfat, das insgesamt relativ niedrige Resistenzraten von um die 5% und zusätzlich sogar einen leicht rückläufigen Trend aufzeigt.

### **2.2 DIAGNOSE UND BEHANDLUNG DER OSTEOMYELITIS**

Osteomyelitis ist eine Infektion, die schwerwiegende Folgen wie Funktionseinschränkungen, Amputationen oder auch das Versterben des Patienten haben kann. Grundsätzlich ist daher bei allen Arten der Osteomyelitis eine frühzeitige Diagnose und ein aggressives Vorgehen bei der Behandlung essentiell.

Diagnostiziert wird Osteomyelitis mithilfe von körperlichen Untersuchungen, Blutanalysen, Erregeranzucht und bildgebenden Verfahren wie Röntgen, Ultraschall und Skelettszintigraphie.

Wenn eine Diagnose gestellt wurde, unterscheidet sich das Vorgehen je nach Art der Osteomyelitis. Bei der hämatogenen und akuten exogenen Osteomyelitis wird direkt nach Diagnose mit einer systemischen Breitspektrum-Antibiotikatherapie begonnen. Zeitgleich wird eine Biopsie durchgeführt, um den Erreger zu bestimmen und ein Antibiogramm (Bestimmung der Empfindlichkeit und Resistenz) durchzuführen. Nach Auswertung der Ergebnisse wird eine spezifischere Antibiotikatherapie vorgenommen. Im Frühstadium der zumeist akuten hämatogenen Osteomyelitis können eine rein antibiotische Therapie und eine konsequente Ruhigstellung der betroffenen Region ausreichen. Sollte allerdings während der Behandlung keine Besserung des klinischen Befunds auftreten, wird eine Operation unvermeidlich. Das weitere Vorgehen ist dann mit dem bei der chronischen exogenen Osteomyelitis identisch (Bertram, 2006).

Bei der chronischen Osteomyelitis wird immer eine Operation mit einer Antibiotikatherapie kombiniert und auch hier wird wie bei der hämatogenen Osteomyelitis sofort nach der Diagnosenstellung zunächst mit einer Therapie mit einem Breitspektrumantibiotikum begonnen.

Ein radikales Débridement, bei dem Nekrosen, Sequester und möglichst sämtliche Fremdmaterialien inklusive Metallimplantate entfernt werden, ist dabei unumgänglich, um ein späteres erneutes Aufflammen der Infektion zu vermeiden (Simpson et al., 2001). Bei der Operation wird zusätzlich Material zur Keimbestimmung und für ein Antibiotogramm gewonnen. Ein adäquates Débridement hinterlässt im Knochen und umliegenden Gewebe große Lücken, die zu einer Destabilisierung des Knochens führen können und zum Beispiel mittels externer Fixateure aufgefangen werden müssen (Peters, 2006). Für den Erfolg einer solchen Operation ist ein entsprechendes Management des Totraums zur Rezidivprophylaxe erforderlich, da dieser aufgrund der schlechten Durchblutung ein hohes Risiko für die bakterielle Keimvermehrung darstellt (Tetsworth und Cierny, 1999). Zur Füllung/Behandlung des Totraums gibt es verschiedene Techniken. Die Wichtigsten werden im Folgenden kurz dargestellt:

- Das Auffüllen des Totraums mit körpereigener Spongiosa hat den Vorteil, dass schnell eine Revaskulierung stattfindet und die Spongiosa in die neue Knochenstruktur eingebaut wird. Allerdings ist autologer Knochen nur begrenzt verfügbar und die Entnahme birgt ebenfalls Risiken. Zusätzlich hat dieses Verfahren eine beträchtliche Fehlrate aufgrund der Tatsache, dass auch nach einem radikalen Débridement häufig persistierende Keime zurückbleiben (Lew und Waldvogel, 2004).
- Absorbierbare Knochenersatzmaterialien, zum Beispiel aus Kalziumsulfat und Hydroxylapatit, weisen den gleichen Nachteil wie

das Transplantieren von autologer Spongiosa auf, da in dem ausgeräumten Knochen Bakterien zurückbleiben können. Die autologe Spongiosa stellt bis heute mit ihren Eigenschaften den Goldstandard für die Knochenersatzstoffe dar und bisher ist kein Material gefunden worden, welches zu vergleichbar guten Ergebnissen käme. Dieses Verfahren der Knochendefektbehandlung beschränkt sich auf kleine metaphysäre Defekte im ansonsten gesunden, gut durchbluteten Knochen (Schieker et al., 2008).

- Das Schließen der Wunde kann auch ohne weiteres Auffüllen des Totraums mit der Lappenplastik erfolgen, das heißt es werden körpereigene Gewebeverbände (Haut oder auch Muskeln) verpflanzt. Lokale Lappenplastiken sind begrenzt, haben aber den Vorteil, dass sie nach wie vor vom Entnahmegebiet durchblutet werden können (Bischoff et al., 1999).
- Das zeitweilige Auffüllen des Volumens mit nicht absorbierbaren Antibiotikaträgern hat den Vorteil, dass lokal hohe Konzentrationen an Antibiotikum erreicht und die eventuell restlichen persistierenden Bakterien bekämpft werden. Die meist aus **Polymethylmethacrylat (PMMA)** bestehenden Arzneistoffträger können vom Chirurgen selbst mit individuell auf den Patienten abgestimmtem Antibiotikum beladen werden oder in Europa fertig als mit Gentamicinsulfat beladene Ketten (Septopal<sup>®</sup>, Biomet Deutschland GmbH, Berlin, Deutschland) käuflich erworben werden. Da allerdings Methacrylat nicht bioabbaubar ist, muss dieses nach einiger Zeit (in der Regel nach zwei bis vier Wochen) in einer zweiten Operation entfernt werden. Der anschließend erneut auftretende Totraum wird zumeist mit Spongiosa aufgefüllt.

### **2.2.1 SYSTEMISCHE ANTIBIOTIKATHERAPIE**

Die individuelle Antibiotikatherapie wird aufgrund der Ergebnisse des Antibiogramms, welches Auskunft über die Bakterienart und deren eventuelle Resistenzen gibt, und der Verfassung des Patienten ausgewählt. Zusätzlich muss eine gute Penetrierfähigkeit des Antibiotikums in den Knochen vorliegen und die eventuellen Nebenwirkungen müssen für den Patienten tolerierbar sein. In Tabelle 2.2 sind die häufig verwendeten Antibiotika für die entsprechenden Keime aufgeführt.

Die Antibiotika werden systemisch peroral oder intravenös über einen Zeitraum von vier bis sechs Wochen verabreicht. Der Zeitraum von vier Wochen entspricht ungefähr der Dauer, die der Knochen zur Revaskulierung nach dem Débridement benötigt. Des Weiteren haben Versuche gezeigt, dass auch eine längere Verabreichung von Antibiotika nicht zu besseren Ergebnissen führt (Lazzarini et al., 2004). Die eingeschränkte Blutzirkulation im Skelettgewebe führt allerdings häufig zu einer reduzierten Wirksamkeit der systemischen Therapie. So wird bei einer systemischen Verabreichung eines Arzneistoffes dieser im gesamten Körper verteilt, infolge dessen nur ein Bruchteil des Antibiotikums den Infektionsort erreicht. Die oftmals vorkommenden Biofilme der Bakterien verursachen eine weitere Reduktion der Konzentration, wodurch die Therapie scheitern kann (Soundrapandian et al., 2007).



Tabelle 2.2: Pathogene der Osteomyelitis und zu deren Bekämpfung häufig eingesetzte Antibiotika

Pathogen	Antibiotika (Auswahl)
Methicillin-sensitive S. aureus	Cefazolin Clindamycin Nafcillin Oxacillin
Methicillin-resistente S. aureus	Vancomycin Teicoplanin
Streptokokken	Ampicillin Benzylpenicillin Vancomycin Clindamycin
Enterobakterien	Ciprofloxacin
Pseudomonas aeruginosa	Piperacillin Ciprofloxacin
Anaerobe Bakterien	Clindamycin Metronidazol

---

### 2.2.2 ANTIBIOTIKATRÄGERSYSTEME ZUR LOKALEN THERAPIE

Eine lokale Antibiotikatherapie hat gegenüber einer systemischen Verabreichung den entscheidenden Vorteil, lokal hohe Wirkstoffkonzentrationen zu erreichen, die mit systemischer Gabe aufgrund damit verbundener starker Nebenwirkungen nicht möglich sind. Da der Knochen allgemein - und bei einer Infektion besonders - schlecht durchblutet ist, bietet die lokale Verabreichung der Antibiotika eine zusätzliche sinnvolle Option bei der Behandlung von Osteomyelitis. Die

---

hohe lokale Antibiotikakonzentration ermöglicht außerdem die Eradikation der bakteriellen Biofilme und kann somit für die Verhinderung eines Rezidivs sorgen (Habib et al., 1999).

Bei einer lokalen Antibiotikatherapie werden hauptsächlich die Aminoglykoside Gentamicinsulfat und Tobramycin aufgrund guter pharmakokinetischer (Gentry, 1997), antimikrobieller (bakterizid bei geringer Konzentration) und chemisch-physikalischer Eigenschaften wie hohe Wasserlöslichkeit und Hitzestabilität verwendet (Popham et al., 1991; van de Belt et al., 2001). Daneben werden die Antibiotikaträger auch mit Penicillinen, Cephalosporinen, Clindamycin und Vancomycin versetzt.

Als lokales Antibiotikaträgersystem wird im Allgemeinen das nicht bioabbaubare PMMA entweder als Knochenzement oder als Kugelketten verwendet, da hier die größte Erfahrung vorliegt. Antibiotikabeladener Knochenzement kommt vor allem zur Infektionsprophylaxe bei der Implantation von Prothesen zum Einsatz. So verwenden etwa 90% der orthopädischen Chirurgen in den USA zur Fixierung von Implantaten



Abbildung 2.3: Intramedulläre PMMA-Ketten

Antibiotika-imprägnierten Knochenzement (Heck et al., 1995). Bei der Behandlung der Osteomyelitis hat sich vielmehr die Verwendung von Kugelketten etabliert (Wininger und Fass, 1996). Die Kugeln sind weniger problematisch als der Knochenzement, da dieser im Gegensatz zu den Kugeln im Körper verbleibt und nach einer gewissen Zeit die freigesetzte Menge Arzneistoff unterhalb der minimalen Hemmkonzentration (MHK) absinkt, so dass resistente Bakterienstämme entstehen können (van de Belt et al., 2001). Neben den in Europa

kommerziell verfügbaren Kugelketten beladen mit dem Aminoglykosid Gentamicinsulfat (Septopal®), können entsprechende Kugelketten auch mit individuell ausgewähltem Antibiotikum vom Chirurgen direkt während der Operation hergestellt werden. Dazu wird der pulverige Arzneistoff zur Zerstörung der Agglomerate durch ein nicht näher spezifiziertes Sieb gegeben und anschließend mit dem ebenfalls pulverförmigen PMMA und einem Radikalstarter wie zum Beispiel Benzoylperoxid vermischt. Wenn die Masse nach Start der Polymerisation eine moderate Viskosität erreicht hat, wird diese in Kugelformen gegossen. Diese können zusätzlich noch mit einem Edeldraht zu einer Kette verbunden werden (Tetsworth und Cierny, 1999). Während der Polymerisationsreaktion des PMMA werden Temperaturen von bis zu 100°C erreicht, weshalb viele Antibiotika wie zum Beispiel die aus Aminosäuren bestehenden Glykopeptidantibiotika (Vancomycin) aufgrund zu geringer Hitzestabilität weniger geeignet sind (Englert et al., 2007). Durch die Herstellungsweise begründet, ist es nicht verwunderlich, dass die industriell hergestellten Produkte gleichmäßigere Freisetzungprofile aufweisen (Flick et al., 1987; Nelson, 2004).

Trotz allem zeigen sowohl die manuell gefertigten als auch die kommerziell erhältlichen PMMA-Antibiotikasyeme sehr gute Ergebnisse bei der Behandlung von Osteomyelitis. Durch die lokale Arzneistofffreisetzung werden im infizierten Bereich hohe Konzentrationen erreicht, die weit oberhalb der minimalen Hemmkonzentration der meisten Pathogene liegt. Systemisch dagegen bleibt die Konzentration sehr gering, so dass weitestgehend keine Nebenwirkungen auftreten und somit die lokalen Systeme sehr gut verträglich sind. Die gute Wirksamkeit der PMMA-Antibiotikasyeme wurde in vielen Untersuchungen und klinischen Studien belegt.

In einer multizentrischen, randomisierten, kontrollierten Studie mit 364 Patienten wurde eine rein systemische Antibiotikatherapie mit Septopal<sup>®</sup> und mit einer kombinierten Therapie verglichen. Bei der Septopal<sup>®</sup>-Gruppe war eine zusätzliche systemische Behandlung über fünf Tage nach dem Débridement gestattet. Die Ergebnisse wiesen nicht auf eine Überlegenheit einer Therapieform bei der Behandlung der Knocheninfektion hin. Allerdings korrelierte das Auftreten von Nebenwirkungen mit der parenteralen Verabreichung des Arzneistoffs, sie traten häufiger bei der systemischen und kombinierten Therapie auf. Darüber hinaus deuteten die Daten auf niedrigere Kosten bei der Septopal<sup>®</sup>-Gruppe hin (Blaha et al., 1993).

Calhoun et al. (1993) verglichen in einer prospektiven, randomisierten, kontrollierten Studie vier Wochen intravenöse Antibiotikatherapie mit einer Septopal<sup>®</sup>-Therapie nach dem Débridement. Die Septopal<sup>®</sup>-Gruppe hat auch in dieser Studie zwei bis vier Tage nach der Operation systemisch Antibiotikum bekommen. Bei der Behandlung mit Septopal<sup>®</sup> wurde eine Erfolgsrate von 89% (25 von 28 Patienten) und bei der Kontrollgruppe eine Rate 83% (20 von 24 Patienten) erreicht. Zusätzlich wurden geringere Kosten für die Septopal<sup>®</sup>-Gruppe festgestellt.

In einer ähnlichen Studie (prospektiv, multizentrisch, randomisiert, kontrolliert) zeigte sich ebenfalls eine leicht bessere Erfolgsrate der Septopal<sup>®</sup>-Gruppe mit 100% (12 Patienten) im Vergleich zur systemischen Therapie mit 95% (20 von 21 Patienten). Auch hier wurde bei der lokalen Therapie fünf Tage postoperativ systemisch ein Antibiotikum verabreicht (Patzakis et al., 1993).

Nichtkontrollierte, nichtrandomisierte Studien über die Wirksamkeit von Septopal<sup>®</sup> nach adäquatem Débridement lassen sich mit einer Erfolgsrate von 90% und einer Rückfallquote von ungefähr 10% zusammenfassen (Diefenbeck et al., 2006).

Die Studien und Untersuchungen konstatieren, dass die Kombination lokaler PMMA-Antibiotikasyteme mit einer kurzzeitigen Gabe systemischer Antibiotika zu vergleichbaren Erfolgsraten in der Behandlung von chronischer Osteomyelitis führt, wie die alleinige Langzeitgabe systemischer Antibiotika, bei gleichzeitig erheblich seltenerem Auftreten von Nebenwirkungen und geringeren Kosten. Nachteilig an der Verwendung von Septopal<sup>®</sup> ist die zusätzliche Operation, die benötigt wird, um die nicht bioabbaubaren Kugelketten wieder zu entfernen. Ein weiteres Problem stellt die in einigen Fällen beschriebene Adhäsion resistenter Bakterien in Form von Biofilmen an die inerte Oberfläche der PMMA-Kugeln dar (Neut et al., 2001). Die Oberfläche der Kugeln agiert dabei als Biomaterialoberfläche, an die einige Bakterien, die die Fähigkeit zur Ausbildung von Biofilmen besitzen, vorzugsweise adhäreren (zum Beispiel *S. aureus*). Geschützt durch den Biofilm können die Bakterien Resistenzen ausbilden und erneute Infektionen hervorrufen. Um die Nachteile der zweiten Operation und die Gefahr der Adhäsion von Bakterien an der Polymeroberfläche zu vermeiden, wurden bioabbaubare lokale Antibiotikaträgersysteme entwickelt (Lazzarini et al., 2004). So sind auch lokale Antibiotika-trägersysteme kommerziell erhältlich, wie das Septocoll<sup>®</sup> (Kollagenvlies beladen mit Gentamicin) oder Targobone<sup>®</sup> (Kollagen-Lyophilisat beladen mit Teicoplanin), die den Vorteil haben bioabbaubar zu sein. Sie bestehen aus bioabbaubarem Kollagen gewonnen aus Pferdesehnen. Allerdings erfolgt die Antibiotikaabgabe zum Beispiel des Gentamicins aus dem Kollagen weitaus ungleichmäßiger als aus dem PMMA und zusätzlich innerhalb eines sehr viel kürzeren Zeitraums. Wachol-Drewek et al. (1996) zeigten, dass die gesamte Arzneistoffmenge innerhalb von nur drei bis vier Tagen unabhängig vom Herstellungsverfahren freigesetzt wurde.

Aufgrund der genannten Nachteile der kommerziell erhältlichen lokalen Antibiotikaträgersysteme ist die Entwicklung weiterer lokaler bioabbaubarer Systeme Gegenstand vieler Untersuchungen.

### **2.2.3 FORSCHUNGSPROJEKTE ZU LOKALEN ARZNEISTOFFTRÄGERSYSTEMEN**

Bei der Entwicklung von lokalen, bioabbaubaren Antibiotikaträgersystemen gibt es verschiedene Anforderungen an die Arzneiform, um eine möglichst gute Behandlung der Osteomyelitis zu erreichen. Dabei sollte das Freisetzungssystem eine adäquate Wirkstoffkonzentration am Infektionsort hervorrufen, eine langsame und gleichmäßige Freisetzung idealerweise mit einem initialen Bursteffekt gewährleisten, eine gute Biokompatibilität aufweisen, bioabbaubar und einfach am Infektionsort platzierbar sein. Die Intention des initialen Bursteffekts ist die Minderung der höheren Anzahl der Bakterien kurz nach der Operation (Soundrapandian et al., 2007). Die Bioabbaubarkeit der Polymermatrices soll zum einen die nachfolgende Operation zur Entfernung des lokalen Arzneistoffsystems überflüssig machen, zum anderen können kleinere Knochendefekte während des langsamen Polymerabbaus nach und nach mit körpereigenem Gewebe und Knochenmaterial aufgefüllt werden, so dass eventuell eine Rekonstruktion des Knochens entfällt (Wang et al., 2004).

Als Trägersysteme für die lokale Osteomyelitistherapie wurden unterschiedliche bioabbaubare Materialien, wie beispielsweise Apatit-Wollastonit-Glaskeramik, Hydroxylapatit, biomedizinische Polyurethane, Polycaprolactone, Kalziumsulfat, Fibrin-Klumpen, Polylaktide und Polylaktid-co-glykolide getestet. Dabei scheinen Polymere der Monomere Laktid und Glykolid anderen bioabbaubaren Materialien überlegen zu sein, denn sie weisen eine gleichmäßigere und zugleich

schnellere Freisetzung über einen längeren Zeitraum auf (Kanellakopoulou und Giamarellos-Bourboulis, 2000).

Die synthetischen, thermoplastischen Polyester Polylaktid (**polylactic acid**, PLA), Polyglykolid (**polyglycolic acid**, PGA) und Polylaktid-co-glykolid (**poly(lactic-co-glycolic acid)**, PLGA) stehen somit infolge ihrer positiven Eigenschaften wie guter Biokompatibilität, Bioabbaubarkeit und mechanischer Festigkeit sowie einer breiten Akzeptanz als sicheres Material (zugelassen unter anderem von der Food and Drug Administration, USA) im Mittelpunkt vieler Weiterentwicklungen von lokalen Arzneistoffsystemen (Jain, 2000). Zusätzlich soll PLGA einen positiven Effekt auf die Bildung von neuem Knochenmaterial haben (Naraharisetti et al., 2005). Daher wurden für die Therapie von Osteomyelitis verschiedene Arzneiformen auf Grundlage dieser Polymere wie Mikropartikel (Mikrosphärulen und – kapseln), Nanopartikel, Presslinge und Perlen untersucht.

Die Verwendung von Mikropartikeln wurde vielfach erforscht und sie bietet die Möglichkeit über einen längeren Zeitraum Arzneistoff gleichmäßig freizusetzen. Ambrose et al. (2003; 2004) konnten beispielsweise anhand von in vitro und in vivo Untersuchungen bei Kaninchen zeigen, dass eine gleichmäßige verlängerte Freisetzung über vier Wochen von Tobramycin aus PLGA-Mikrosphärulen erreichbar ist und diese im Kaninchenmodell zu einer verbesserten Heilung der Osteomyelitis führen. Allerdings wiesen diese Mikrosphärulen nur eine relativ geringe Wirkstoffbeladung von durchschnittlich 50% auf. In einer anderen Untersuchung zeigten mit Teicoplanin beladene PLGA-Mikrosphärulen eine Freisetzung über fünf Wochen, aber auch hier wiesen die Mikropartikel eine sehr geringe Wirkstoffbeladung von lediglich 17% auf (Yenice et al., 2003).

Das gleiche Problem trat bei der Herstellung von Natriumfusidat-Mikrosphärulen auf; nur circa 20% bis 30% des Arzneistoffs wurden in das PLGA-Polymer inkorporiert. Bei der in vitro Freisetzung der Natriumfusidat-Mikrosphärulen fand eine Arzneistoffliberation über drei Wochen statt (Cevher et al., 2007). Die häufig geringe Beladungskapazität insbesondere von hydrophilen Arzneistoffen bei der Herstellung von Mikropartikeln ist ein bekanntes und beschriebenes Problem (Jain, 2000).

Die Herstellung von Mikro- und Nanopartikeln basiert hauptsächlich auf drei verschiedenen Grundmethoden und Variationen von diesen: Lösungsmittlextraktion/evaporation, Koazervation und Sprühtrocknung (Freitas et al., 2005). Nachteilig an der Verarbeitung von PLA, PGA und PLGA zu Mikro- und Nanopartikeln durch die oben genannten Verfahren ist neben der geringen Wirkstoffbeladung die obligatorische Verwendung von organischen Lösungsmitteln. Die Polymere sind in Wasser unlöslich und müssen dementsprechend zunächst in einem Lösungsmittel wie Dichlormethan, Ethylacetat oder Aceton gelöst werden. Die Verwendung von Lösungsmitteln ist allerdings bei der Herstellung aufgrund höherer Kosten und aufwendigeren Verfahren nachteilig, und zusätzlich können Lösungsmittelrückstände in den Mikropartikeln verbleiben, welche durch zeit- und energieaufwendige Trocknungsverfahren wieder aus dem Produkt entfernt werden müssen. Außerdem sind die Verfahren häufig kompliziert und benötigen eine Reihe von Geräten. So ist zwar die am häufigsten verwendete Methode der Lösungsmittlextraktion/evaporation mit geringem apparativem Aufwand wie Becherglas und Rührer möglich, allerdings ist diese nicht für die Herstellung in größeren Maßstäben geeignet, was somit zu Problemen beim Scale-up führt (Freitas et al., 2005).



Ein weiteres, vergleichsweise neues Verfahren zur parenteralen Applikation von Arzneistoffen ist die Injektion von bioabbaubaren in-situ Implantaten, bei der allerdings auch Lösungsmittel verwendet werden müssen. Dazu wird das Polymer in einem biokompatiblen organischen Lösungsmittel wie N-Methyl-2-pyrrolidon gelöst und anschließend der Arzneistoff zugegeben, der dann ebenfalls gelöst oder suspendiert vorliegen kann. Nach Injektion in den Körper kommt es zu einer Phasenseparation und Präzipitation des PLGAs, in welchem der Arzneistoff inkorporiert vorliegt (Packhaeuser et al., 2004). Die Freisetzung des Arzneistoffs hängt jedoch unter anderem von der Implantatform ab, über die man keine Kontrolle hat. Dies führt zu einer geringen Reproduzierbarkeit der Freisetzungskinetik. Auch fallen Vorteile von in-situ Implantaten wie eine gute Patientencompliance aufgrund des minimalen invasiven Eingriffs weg, da bei der Behandlung von chronischer Osteomyelitis eine Operation obligatorisch ist.

Eine andere Arzneiform entwickelte die Arbeitsgruppe um Naraharisetti et al. (2005), die Mikropartikel zu Presslingen formte, um die häufig auftretende schnelle Freisetzung des Arzneistoffs aus den Partikeln zu verzögern. Zusätzlich wurde der Einfluss verschiedener Additive auf die Einschlusseffektivität und auf das Freisetzungsverhalten untersucht. Der Zusatz von 5% Methylcellulose führte zu einem „akzeptablen“ Freisetzungsprofil über drei Wochen, allerdings befürchtete Naraharisetti aufgrund des aufwendigen Herstellungsverfahrens Probleme bei der Reproduzierbarkeit.

Ein ähnliches Verfahren bei dem Mikrokapseln aus PLGA und Gentamicinsulfat zu Implantaten verpresst wurden, verwendeten Garvin et al. (1994). In einer Tierstudie mit 34 Mischlingshunden wurden diese bioabbaubaren Implantate mit einer systemischen Therapie und mit einer Therapie mit Gentamicinsulfat-beladenen PMMA-Kugeln verglichen.

Beide lokalen Antibiotikatherapien waren gleich effektiv, wiesen aber signifikant bessere Ergebnisse im Vergleich zur systemischen Therapie auf.

In einer anderen Tierstudie, hier mit 96 Kaninchen, konnte gleichermaßen die Effektivität einer lokalen Antibiotikatherapie basierend auf einem bioabbaubaren Polymergemisch (PLA kombiniert mit PLGA) im Vergleich zu einer systemischen Behandlung aufgezeigt werden. Diese Implantate wurden hergestellt durch Lösen der Polymere und des Arzneistoffs (Vancomycin) in Dichlormethan und anschließender Formung zu Perlen nach einer Trockenphase (Calhoun und Mader, 1997).

Schmidt et al. (1995) untersuchten das Freisetzungsverhalten von Gentamicinsulfat-Implantaten hergestellt durch Tablettierung (15 kN/cm<sup>2</sup>) basierend auf einem Polymergemisch von PLA und PLGA in vitro und in vivo bei Ratten. Beide Profile wiesen eine ungünstige längere Verzögerungsphase mit einer nur geringen Arzneistofffreigabe nach einem initialen Bursteffekt auf. In vitro hielt die Formulierung einem Vergleich mit Septopal<sup>®</sup> nicht stand, sie zeigte eine geringere Freisetzung über einen kürzeren Zeitraum. In vivo wurden die Implantate nicht mit Septopal<sup>®</sup> verglichen, allerdings konnte eine gute Verträglichkeit der Implantate aufgezeigt werden.

Das Problem der häufig auftretenden lag-Phase bei Matrixsystemen hergestellt aus PLGA hat die Arbeitsgruppe um Yoo et al. durch Zusatz von Laktid- und Glykolidmonomeren gelöst. Die mittels Direkttablettierung (5 Sekunden mit 1,96 MPa) hergestellten Presslinge zeigten eine gleichmäßige Freisetzung über vier Wochen mit einem initialem Bursteffekt (Yoo et al., 2004). Die so hergestellten Presslinge haben einen Durchmesser von 10 mm, welches bei der Handhabung

durch den Chirurgen speziell bei kleinen Knochendefekten problematisch sein könnte.

Ein anderes Herstellungsverfahren entwickelten Liu et al., wo zunächst eine hohler Zylinder und ein Zylinderdeckel aus einer Arzneistoff-PLGA-Mischung gepresst wurden. Nach einem Sinter-Zwischenschritt (30 Minuten bei 55°C) wurde die zylindrische Kapsel mit weiterem Arzneistoff gefüllt und anschließend mit dem Deckel mit Hilfe einer Ultraschallschweißmaschine versiegelt. Mit diesem aufwendigen Verfahren ließen sich Kapseln produzieren, die den Arzneistoff (Vancomycin, bzw. Gentamicinsulfat) gleichmäßig über drei bis vier Wochen freisetzen (Lin et al., 1999; Wang et al., 2004; Liu et al., 2005; Liu et al., 2007).

Die Arbeitsgruppe Zhang et al. (1994) produzierte PLA-basierte Implantate beladen mit Gentamicinsulfat durch Schmelzextrusion. Bei der in vitro Freisetzung dieser Implantate trat eine lag-Phase auf, die durch das Überziehen der zylindrischen Implantate mit einer PLA-Aceton-Lösung zu einer gleichmäßig kontinuierlichen Arzneistoffliberation modifiziert werden konnte. Durch Längenänderung dieser Zylinder wurde auch eine Beeinflussung des Freisetzungszeitraums möglich.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass es im Bereich der Entwicklung eines lokalen bioabbaubaren Arzneistoffsystems für die Behandlung von Osteomyelitis viele verschiedene Ansätze gibt. So kann mittlerweile aus einem großen Pool unterschiedlicher bioabbaubarer Polymere ein auf die Anforderungen für spezielle Einsatzgebiete abgestimmtes Material ausgesucht werden. Darüber hinaus kann durch die Arzneiform und durch die Herstellungsweise erreicht werden, dass das Endprodukt eine adäquate Arzneistoffliberation über einen gewünschten Zeitraum aufweist. Obgleich Studien die Wirksamkeit solcher Systeme belegen, sind bis zum heutigen Tag keine

entsprechenden Produkte auf dem Markt. Mögliche Ursachen dafür könnten im Vergleich zu dem bisher erhältlichen, allerdings nicht bioabbaubaren, Produkt Septopal® nachteilige Freisetzungsprofile wie eine lange lag-Phase nach dem Bursteffekt, eine schlechte Handhabbarkeit oder eine aufwendige und damit teure Herstellungsmethode sein.

### 3 MATERIAL UND METHODEN

#### 3.1 MATERIAL

##### 3.1.1 POLYLAKTID-CO-GLYKOLID

Nachdem sich die Gruppe der Homo- und Copolymere hergestellt aus den Monomeren Laktid und Glykolid in den 1960er Jahren als bioabbaubares chirurgische Nahtmaterial bewährt hatte, wurde seit den 1970er Jahren diese Polymergruppe auch zur Herstellung von Arzneiformen näher erforscht. So werden sie heute weiterhin als Nahtmaterial aber auch als Hilfsmittel für die Blutstillung, zum Gefäßverschluss, für temporäre Prothesen, Gewebeverklebung, bei der Behandlung von Knochenfrakturen oder als Hilfsstoff für parenterale Depotarzneiformen verwendet (Völkel, 2003).

Die Polymere dieser Gruppe bestehen aus den Monomeren L,L-Laktid, D,L-Laktid, D,D-Laktid und Glykolid (Abbildung 3.1).

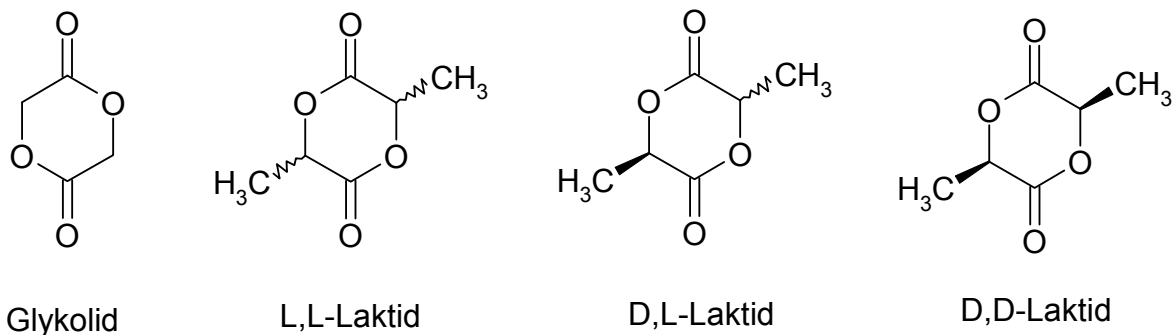


Abbildung 3.1: Grundbausteine der Polyester der Milch- und Glykolsäure

Wenn das Polymer aus nur einer Monomerenart besteht, handelt es sich um ein Homopolymer, mit zwei oder mehreren unterschiedlichen Monomeren um ein Copolymer (Abbildung 3.2).

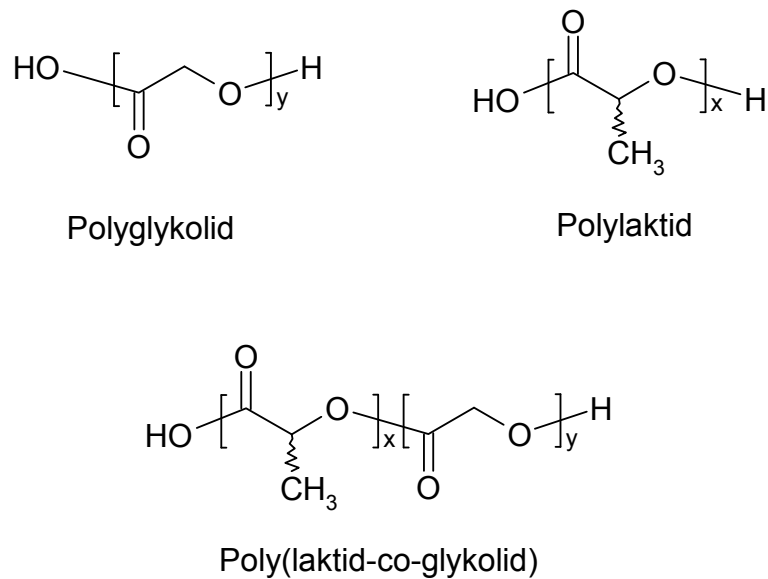


Abbildung 3.2: Homo- und Copolymere der Milch- und Glykolsäure

Da der Polymerabbau unter anderem von der Zusammensetzung der Monomerenverhältnisse abhängt, entsteht eine große Variabilität bezüglich der Zeitdauer des Degradationsprozesses von einigen Wochen bis zu mehreren Jahren, so dass die Polymere für die unterschiedlichsten Arzneistoffsysteme/Einsatzgebiete verwendbar sind. Daneben besitzen die Polymere eine hervorragende Biokompatibilität (Anderson, 1997). Die gute Verträglichkeit der Polymerengruppe liegt sicherlich darin begründet, dass die Polymere aus natürlich vorkommenden Monomeren bestehen und auch zu diesen als Zwischenstufe durch nicht-enzymatische Hydrolyse wieder abgebaut werden. Die entstehende Milchsäure ist ein Zwischenprodukt im Kohlenhydratzyklus und ist dementsprechend ubiquitär im Körper vorhanden. Während L-Laktid über den Zitronensäurezyklus zu Wasser und Kohlendioxid abgebaut wird, wird das D-Laktid unmetabolisiert ausgeschieden. Polyglykolid wird über die Glykolsäure zu Glycin metabolisiert oder direkt über die Niere ausgeschieden (Abbildung 3.3).

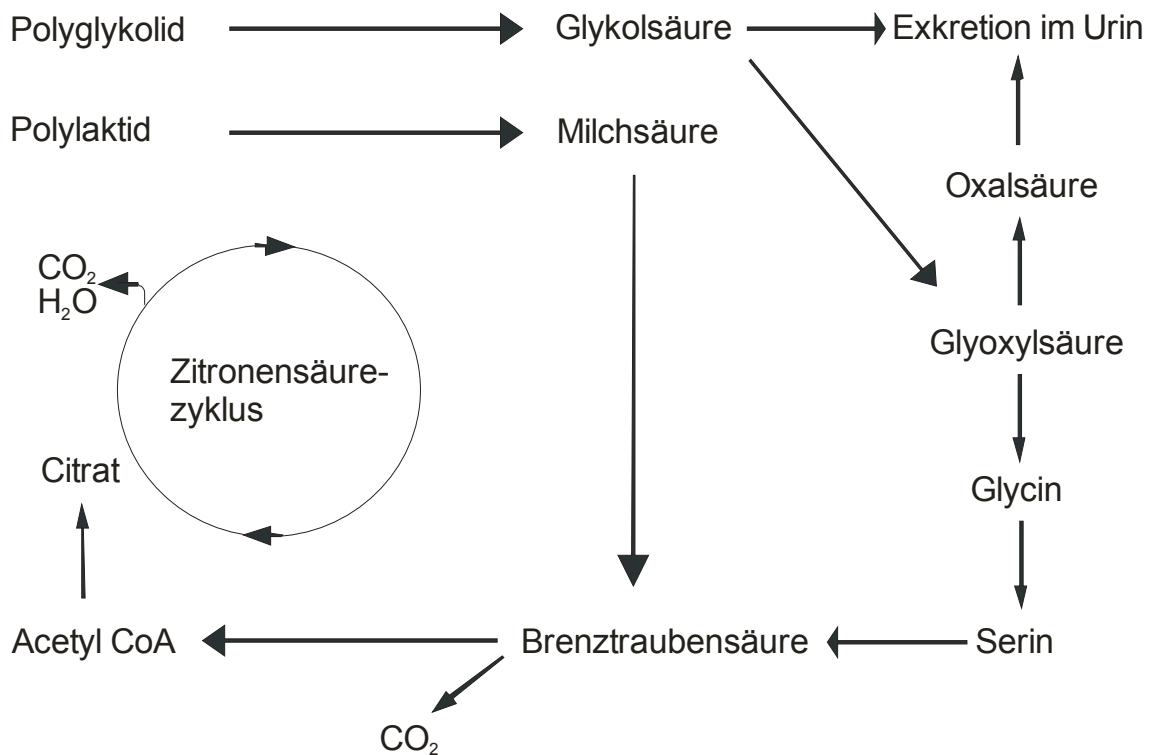


Abbildung 3.3: Metabolisierung des PLGAs im Körper

Polymere der Gruppe der Polylaktid-co-glykolide dienen bereits als Hilfsstoffe in verschiedenen zugelassenen Präparaten, wovon eine Auswahl in der Tabelle 3.1 dargestellt ist. Die meisten auf dem Markt befindlichen Präparate mit dem Hilfsstoff PLGA sind Mikropartikel mit hydrophoben und niedrig zu dosierenden Arzneistoffen wie zum Beispiel Hormone. Daneben gibt es aber auch Produkte wie Profact<sup>®</sup> Depot und Zoladex<sup>®</sup>, bei welchen der Wirkstoff durch Schmelzextrusion in die Polymermatrix eingebettet wird (Breitenbach, 2002). Je nach Zusammensetzung des Copolymers variiert die Dauer der Arzneistoffabgabe meist zwischen einem und drei Monaten.

Tabelle 3.1: Zugelassene Präparate mit PLGA als Matrixbildner (Laktidanteil:Glykolidanteil)

Handelsname	Arzneiform	Polymer	Wirkstoff	Herstellung
Decapeptyl <sup>®</sup> Depot	Mikropartikel	PLGA (1:1)	Triptorelin	Koazervation
Enantone <sup>®</sup> Depot	Mikropartikel	PLGA (3:1)	Leuprorelin	W/O/W-Emulsion Lösungsmittel- extraktion
Profact <sup>®</sup> Depot	Implantat	PLGA (3:1)	Buserelin	Extrusion
Risperdal <sup>®</sup> Consta <sup>®</sup>	Mikropartikel	PLGA (3:1)	Risperidon	W/O/W-Emulsion Lösungsmittel- extraktion
Sandostatin <sup>®</sup> Lar <sup>®</sup>	Mikropartikel	PLGA (45:55)	Octreotid	Koazervation
Zoladex <sup>®</sup>	Implantat	PLGA (1:1)	Goserelin	Extrusion
Zoladex <sup>®</sup>	Implantat	PLGA (5:95)	Goserelin	Extrusion

### 3.1.1.1 PHYSIKO-CHEMISCHE EIGENSCHAFTEN

Die Synthese der Polymere erfolgt entweder durch direkte Polykondensation (bei kurzkettigen Polymeren) oder durch eine Ringöffnungspolymerisation der zyklischen Diester (höhere Molmassen), wobei sukzessiv die Monomeren durch Esterbindungen zu einem linearen aliphatischen Polyester verkettet werden. Als Katalysatoren werden vorzugsweise Zinn(II)-carboxylate verwendet (Beck-Broichsitter et al., 2010). Durch Modifikation der Reaktionsbedingungen wie Temperatur und Reaktionsdauer werden Kettenlänge und Molmassenverteilung beeinflusst. Kommerziell erhältlich sind die



Homopolymere Poly(L-laktid), Poly(D,L-laktid) und Polyglykolid sowie die Copolymere aus L- und D,L-Laktid, L-Laktid und Glykolid und D,L-Laktid und Glykolid.

Das Homopolymer aus L-Laktid ist ein semikristallines Polymer mit einem Kristallinitätsgrad von bis zu 37%. Die Teilkristallinität wird durch die Isotaktizität der Polymerketten hervorgerufen, die eine Ordnung der Ketten zulässt. Dagegen liegt das Poly(D,L-laktid) in amorpher Form vor, da die zufällige Anordnung der beiden isomeren Formen eine kristalline organisierte Struktur nicht erlaubt. Polyglykolid hat wiederum eine Teilkristallinität mit einem kristallinen Anteil von 45-55%. Das Copolymer Poly(L-laktid-co-glykolid) ist mit einem Glykolidanteil von 25-70% amorph, da die Regelmäßigkeit der Polymerkette vom jeweils anderen Monomer unterbrochen wird. Bei dem Copolymer aus D,L-Laktid und Glykolid liegt das Polymer bei einem Glykolid-Anteil von 0% bis 70% amorph vor (Middleton und Tipton, 2000).

Die Glasübergangstemperaturen ( $T_g$ ) und Schmelztemperaturen der Polymere sind in Tabelle 3.2 zusammengefasst. Die Glasübergangstemperatur ist diejenige Temperatur, oberhalb der die Viskosität des erwärmten Polymers sprunghaft abnimmt, was auf molekularer Ebene mit einer erhöhten Kettenbeweglichkeit verbunden ist. Mit zunehmender Kettenlänge steigen die Glasübergangs- und Schmelztemperatur der Polylaktide bis zu einer mittleren Molmasse von 92000 g/mol. Bei höheren Molmassen findet nur noch eine geringfügige Erhöhung der Temperaturen statt (Omelczuk und McGinity, 1992).

Tabelle 3.2: Glasübergangs- und Schmelztemperaturen der Polymere auf Basis von Laktid und Glykolid

Polymer	T <sub>g</sub> in °C	Schmelztemp. in °C
Poly(L-laktid)	60-65	180-185
Poly(D,L-laktid)	38-52	amorph
Polyglykolid	35-40	220-225
Poly(L-laktid-co-D,L-laktid)	56-62	amorph
Poly(L-laktid-co-glykolid)	54-63	amorph
Poly(D,L-laktid-co-glykolid)	42-50	amorph

### 3.1.1.2 DEGRADATIONSVERHALTEN DER POLYMERE

Die Geschwindigkeit des Polymerabbaus von Formulierungen dieser Polymerfamilie hängt von folgenden Faktoren ab:

- Molmasse
- Monomerstereochemie
- Kristallinität
- Monomerenverhältnis
- Größe, Porosität und Morphologie der Arzneiform

Ein geringeres Molekulargewicht der Polymere beschleunigt den Abbau und somit die Arzneistofffreisetzung, da von Anfang an kürzere Polymerketten vorliegen, die dementsprechend schneller zu Oligomeren und Monomeren abgebaut werden. Diese sind unter einer Molmasse von 1050-1150 g/mol löslich und können somit durch Diffusion abtransportiert werden (Park, 1994; Grayson et al., 2005).

Die Monomerstereochemie bedingt die Kristallinität des Polymers und somit auch die Wasseraufnahmefähigkeit. Wasser kann am einfachsten in die amorphen Bereiche des Polymers eindringen, so dass zunächst hauptsächlich dort der hydrolytische Abbau stattfindet. Poly(L-laktid) wird

aufgrund seiner hohen Kristallinität folglich langsamer als die amorphen Copolymere abgebaut. Der Kristallinitätsgrad des Polymers nimmt durch den schnelleren Abbau der amorphen Bereiche während der Degradation zu. Die Zunahme der Kristallinität wird auf die durch die höhere Mobilität der kürzeren Ketten erleichterte Neuorientierung zu kristallinen Bereichen zurückgeführt (Pistner et al., 1993; Grayson et al., 2005).

Das Monomerenverhältnis der Polymere beeinflusst die Geschwindigkeit des Abbaus in hohem Maße. Poly(L-laktid) und Poly(D-laktid) werden aufgrund eines ähnlichen Kristallinitätsgrads gleich schnell abgebaut (18-24 Monate), allerdings etwas langsamer als Polyglykolid, da sie durch die zusätzliche Methylgruppe etwas hydrophober sind (Holland et al., 1986). Das Poly(D,L-laktid) wird im Vergleich zu den anderen Homopolymeren schneller abgebaut, weil es durch seinen amorphen Charakter eine erhöhte Wasseraufnahme zeigt. Es wird über einen Zeitraum von mehreren Wochen bis Monaten abgebaut. Die Copolymere zeigen in den Monomerenverhältnissen, bei denen sie amorph vorliegen, einen beschleunigten Abbau. Miller et al. (1977) untersuchten die Abbaugeschwindigkeit von Poly(L-laktid-co-glykolid) mit verschiedenen Verhältnissen in vivo in Ratten. Die erhaltenen Halbwertszeiten sind in Abbildung 3.4 dargestellt. Mit einem Glykolid-Anteil von 25-75% (amorpher Bereich) beträgt die Halbwertszeit des Abbaus nur wenige Wochen mit einem Minimum bei dem Monomerenverhältnis von 50:50.

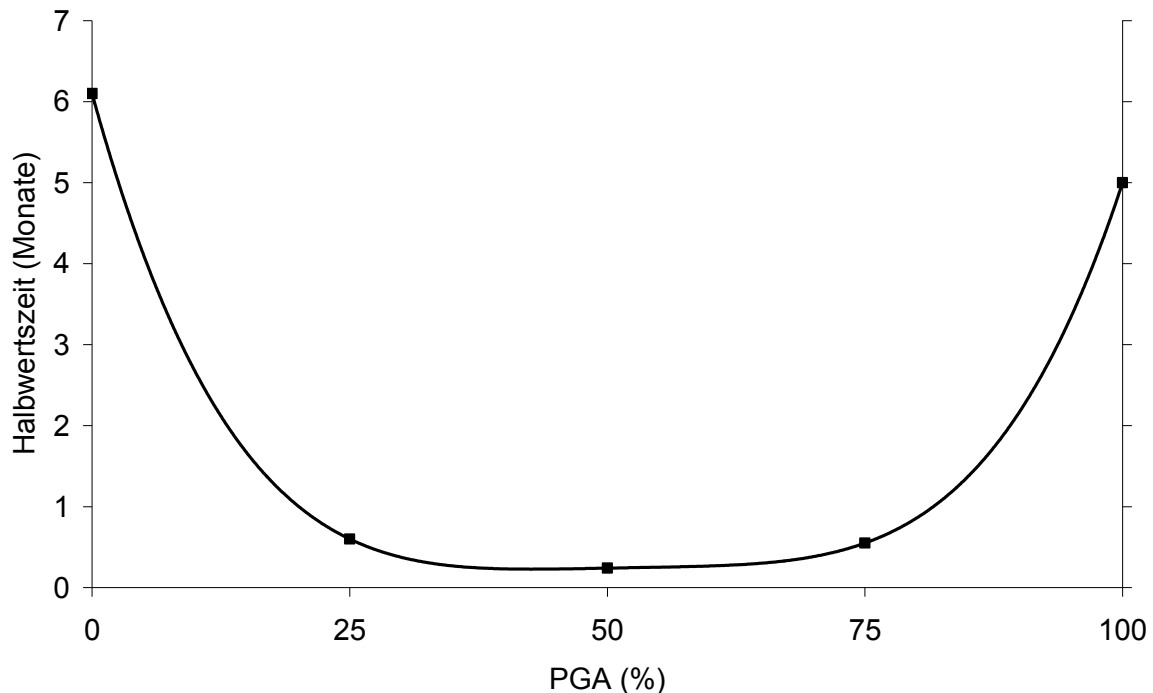


Abbildung 3.4: Halbwertszeiten von Poly(L-laktid-co-glykoliden) mit steigendem Glykolid-Anteil in Ratten (Miller et al., 1977)

Die Größe, Porosität und Morphologie der Arzneiform hat ebenfalls einen enormen Einfluss auf den Abbau der Polymere und somit auf das Freisetzungverhalten. So findet bei größeren Arzneiformen wie beispielsweise Perlen ein schnellerer Polymerabbau statt als bei kleinen Arzneiformen wie Mikropartikel (Grizzi et al., 1995). Dunne et al. konnten einen linearen Zusammenhang zwischen der Mikropartikelgröße (PLGA-Matrix) und der Degradationsrate belegen, mit einem schnelleren Polymerabbau bei den größeren Partikeln (Dunne et al., 2000; Berkland et al., 2003). Dieses Phänomen ist auf den heterogenen Abbau in den Matrixsystemen und die damit verbundenen autokatalytischen Effekte zurückzuführen. Bei Matrices aus Polylaktid oder Polylaktid-co-glykolid findet eine „Bulk Erosion“ statt (Göpferich, 1997). Zunächst diffundiert Wasser in die Matrix, wodurch diese quillt und das Polymer hydrolytisch in kürzere Ketten gespalten wird. Die Endgruppen der gespaltenen Ketten sind Carboxylgruppen, die zu einer Erniedrigung des pH-Wertes

und zu einer Erhöhung der Wasseraufnahme aufgrund der zunehmenden Hydrophilie führen. Da die Esterspaltung durch Protonen katalysiert wird, führt eine Senkung des pH-Wertes zu einem beschleunigten Abbauprozess (Autokatalyse). Kleinere Oligomere ( $< 1100$  g/mol) und Monomere können aus der Matrix ins Medium diffundieren und dort neutralisiert werden, aber auch Medium diffundiert in die Arzneiform und neutralisiert dort die entstehenden Carboxylgruppen. Da allerdings der Massentransport in einer Polymermatrix relativ langsam ist, werden im Kern mehr saure Gruppen gebildet als neutralisiert, so dass autokatalytisch der Abbauprozess weiter beschleunigt wird (Shenderova et al., 1999). Mit Zunahme der Arzneiformgröße findet somit eine Verkleinerung des Oberflächen:Volumen-Verhältnisses statt, wodurch sowohl die Pufferpenetration als auch die Freisetzung von Degradationsprodukten erniedrigt wird. Folglich findet durch die Autokatalyse und die größere Diffusionsbehinderung in der Matrix der Abbau bevorzugt im Kern statt, im Zuge dessen der Polymerkörper lange seine Gestalt behält. Die Arzneistofffreisetzung aus solchen Polymermatrices hängt allerdings nicht alleinig vom Polymerabbau ab, sondern auch von Diffusionsmechanismen, von der Arzneiformbeschaffenheit (zum Beispiel Porosität) und den Wirkstoffcharakteristika (zum Beispiel hydrophil vs. hydrophob). So analysierten Berkland et al. (2003) das Freisetzungsverhalten von Rhodamine und Piroxicam aus PLGA-Mikropartikeln mit unterschiedlichen Größen und konnten mit zunehmender Partikelgröße eine abnehmende Freisetzungsgeschwindigkeit ungeachtet der zunehmenden Polymerdegradation feststellen. Auch Siepmann et al. (2004) untersuchten den Einfluss der Größe und Porosität von Mikropartikeln aus PLGA auf das Freisetzungsverhalten und konnten bei porösen Partikeln eine langsamere Arzneistoffliberation mit zunehmender Partikelgröße aufzeigen. Bei den nichtporösen

Mikropartikeln war kein Effekt der Größe auf die Freisetzungsrates zu beobachten. Gleichwohl bei den porösen Mikropartikeln eine Autokatalyse im Inneren, wenn auch in geringeren Maße als bei den Nichtporösen, nachgewiesen werden konnte, führte eine Vergrößerung der Partikel zu einer Verlangsamung der Arzneistofffreisetzung. Der autokatalytische Effekt und der damit verbundene schnellere Polymerabbau wurden durch die längeren Diffusionswege mit steigender Partikelgröße überkompensiert (Klose et al., 2006).

Allgemein lässt sich feststellen, dass die Polymerdegradation und die Arzneistofffreisetzung von vielen Faktoren wie Polymer- und Arzneistoffeigenschaften sowie Morphologie der Arzneiform abhängen und aufgrund der Komplexität der auftretenden Phänomene oft schwer vorhersagbar sind, so dass in der Regel ein aufwendiges „Versuch-und-Irrtum“-Vorgehen bei der Entwicklung notwendig ist (Siepmann und Siepmann, 2010).

### 3.1.1.3 VERWENDETE POLYMERE

Für die lokale Antibiotikatherapie der Osteomyelitis wird eine Arzneistofffreisetzung über eine Zeitdauer von drei bis sechs Wochen angestrebt (Schmidt et al., 1995; Brady et al., 2006). Für die Untersuchungen in dieser Arbeit wurden daher Poly(D,L-laktid-co-glykolid)-Polymere mit einem Monomerenverhältnis von 50:50 verwendet, da diese Polymere in vivo eine Degradationszeit von acht bis zehn Wochen aufweisen. Es wurden zwei verschiedene Polymere eingesetzt, die sich primär durch ihre Endgruppen unterscheiden.

Für die Vorversuche wurde ein PLGA mit dem Produktnamen 5050 DLFR1 von Lakeshore Biomaterials (Birmingham, Großbritannien) mit einer endständigen Laurylgruppe verwendet. Da dieses Polymer aufgrund der hydrophoben Endgruppe schon bei den Vorversuchen

ungünstige Freisetzungsprofile aufzeigte, wurde für die weiteren Versuche ein hydrophileres Polymer mit einer freien Carboxylgruppe als Endgruppe mit dem Handelsnamen Resomer<sup>®</sup> RG 503 H (Boehringer Ingelheim, Ingelheim, Deutschland) verwendet (siehe Kapitel 4.3).

### 3.1.2 ARZNEISTOFFE

#### 3.1.2.1 GENTAMICINSULFAT

Gentamicin, das in Form seines Sulfatsalzes eingesetzt wird, ist ein von *Mikromonospora purpurea* gebildetes Aminoglykosidantibiotikum und seit den 1960er Jahren in Deutschland auf dem Markt (Abbildung 3.5). Das Breitspektrum-Antibiotikum ist ein Gemisch strukturell sehr ähnlicher Aminoglykosidverbindungen, die sich hauptsächlich in ihren Endgruppen unterscheiden (Tabelle 3.3).

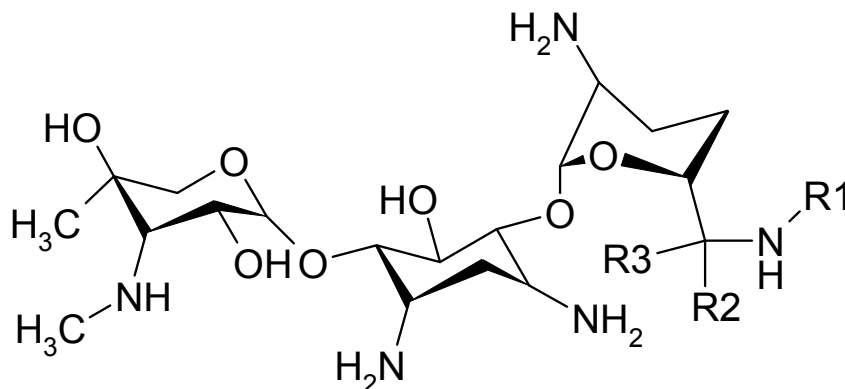


Abbildung 3.5: Strukturformel der Grundform des Gentamicins

Tabelle 3.3: Reste der Gentamicine des Typ C

Gentamicin	R1	R2	R3
C <sub>1</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H
C <sub>1a</sub>	H	H	H
C <sub>2</sub>	H	CH <sub>3</sub>	H
C <sub>2a</sub>	H	H	CH <sub>3</sub>
C <sub>2b</sub>	CH <sub>3</sub>	H	H

Der pharmazeutisch verwendete Wirkstoff besteht zu 20-40% aus Typ C<sub>1</sub>, zu 10-30% aus Typ C<sub>1a</sub> und zu 40-60% aus den Typen C<sub>2</sub>, C<sub>2a</sub> und C<sub>2b</sub>. Es ist ein weißes Pulver, das leicht löslich in Wasser und praktisch unlöslich in Ethanol 96% ist. Der Wirkungsmechanismus der gesamten Aminoglykosid-Gruppe beruht auf einer irreversiblen Bindung an die 30S-Untereinheit der bakteriellen Ribosomen nach Anreicherung in der Bakterienzelle, die die Bindung von N-Formylmethionyl-tRNA blockiert und so den Beginn der Proteinsynthese verhindert. Zusätzlich stoppt Gentamicin die Verlängerung der begonnenen Peptidkette, und es findet eine Störung der Translation statt, wodurch falsche Proteine gebildet werden, die irreversible Membranschäden hervorrufen.

Gentamicin wirkt bakterizid im Ruhe- und Proliferationsstadium auf ein breites Spektrum von Bakterien (Tabelle 3.4). Bei Infektionen durch anaerobe Bakterien ist Gentamicin unwirksam, da die Aufnahme in die Bakterienzelle sauerstoffabhängig ist. Außerdem ist Gentamicin unwirksam gegen Pilz- und virale Infektionen.

Tabelle 3.4: Wirkspektrum des Gentamicins

Gramnegative Bakterien	
	Enterobacteriae
	Escherichia coli
	Gonokokken
	Haemophilus influenzae
	Klebsiellen
	Neisserien
	Proteus mirabilis u. vulgaris
	Pseudomonas aeruginosa
	Salmonellen
	Shigella sp.
Grampositive Bakterien	
	Staphylokokken



Da Gentamicin bei peroraler Gabe praktisch von der Darmschleimhaut nicht absorbiert wird, erfolgt die therapeutische Anwendung parenteral. Die Elimination von Gentamicin findet unmetabolisiert in mikrobiologisch aktiver Form überwiegend renal durch glomeruläre Filtration statt (Jao und Jackson, 1964).

Resistenzen gegenüber Gentamicin können auf folgenden Mechanismen beruhen:

- Enzymatische Inaktivierung
- Verminderte Penetration und aktiver Efflux
- Veränderung der Zielstruktur durch Modifikationen innerhalb der Ribosomen (eher selten)

Die wichtigste Form der Resistenz ist dabei die enzymatische Inaktivierung des Gentamicins. Dafür sind zumeist plasmidkodierte Acetyltransferasen, Phosphotransferasen und Adenyltransferasen verantwortlich. Die Acetyltransferasen katalysieren eine Acetylierung der Aminogruppen, während die Adenyltransferasen und Phosphotransferasen die Hydroxylgruppen adenylieren bzw. phosphorylieren.

Als Aminoglykosid hat Gentamicin die Nebenwirkungen Ototoxizität und Nephrotoxizität (Martinez-Salgado et al., 2007). Die Nierenschäden sind häufig infolge der Regenerationsfähigkeit des Tubulusepithels reversibel, während die Gleichgewichts- bzw. Hörschäden nach einer initialen reversiblen Phase bei Fortsetzung der Therapie irreversibel sind. Die Nebenwirkungen von Gentamicin sind meist aber weniger ausgeprägt als bei den anderen Antibiotika der gleichen Gruppe.

## 3.1.2.2 TAUROLIDIN

Taurolidin (4,4'-Methylen-bis-1,2,4-thiadiazan-1,1-dioxid) ist ein antimikrobielles Chemotherapeutikum, erstmals in den 1970er Jahren synthetisiert, mit einem breiten Wirkspektrum gegen klinisch bedeutsame Erreger. Es ist ein weißes kristallines Pulver mit einem Molekulargewicht von 284,4 g/mol und einem Schmelzpunkt von 163-179°C. In wässriger Lösung liegt Taurolidin zu 98% in seinen hydrolytischen Spaltungsprodukten Taurultam und Hydroxymethyltaurultam (= Methylol-taurultam) vor, dargestellt in Abbildung 3.6 (Erb et al., 1982).

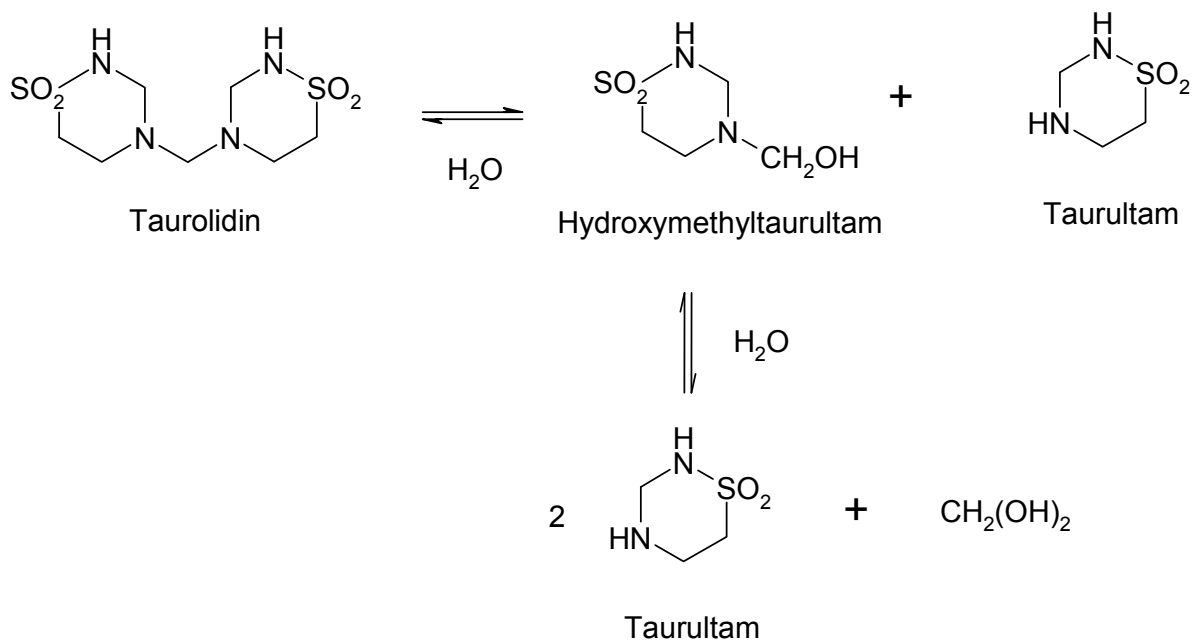


Abbildung 3.6: Gleichgewicht von Taurolidin, Hydroxymethyltaurultam und Taurultam in wässriger Lösung

Im Körper wird Taurultam bzw. Hydroxymethyltaurultam enzymatisch weiter zu Taurinamid bzw. Hydroxymethyltaurinamid, Taurin und Kohlendioxid metabolisiert (Abbildung 3.7). Bei der Metabolisierung entstehendes Taurinamid und Taurin wird über die Niere ausgeschieden.

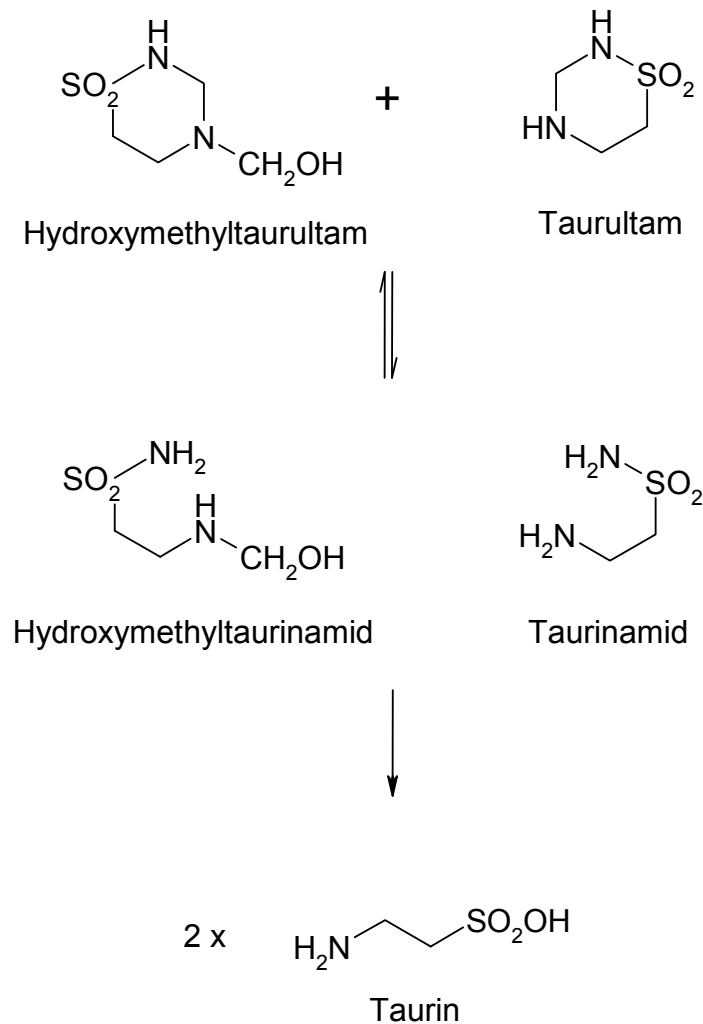


Abbildung 3.7: Metabolisierung des Hydroxymethyltaurultams und Taurultams

Der bakterizide Wirkmechanismus von Taurolidin beruht auf einer chemischen Reaktion der aktiven Metaboliten Hydroxymethyltaurultam und Hydroxymethyltaurinamid mit der bakteriellen Zellwand (Browne et al., 1976). Dabei reagieren die Methylol-Gruppen mit den freien Aminogruppen der Mureine der Bakterienzellwand, mit den Lipopolysacchariden (LPS) der Endotoxine und den Polypeptiden der Exotoxine, wodurch die Bakterien langsam getötet und die Exo- und Endotoxine inaktiviert werden. Aufgrund der irreversiblen chemischen Reaktion mit der Bakterienzellwand, bzw. der  $\text{NH}_2$ -Gruppen der Exo- und Endotoxine sind keine Resistenzen gegen Taurolidin bekannt (Geistlich Pharma, 2008). In vitro liegt die Abtötungszeit bei Zimmertemperatur bei 15-30

Minuten, wobei diese in vivo durch eine schnellere Reaktionsgeschwindigkeit hervorgerufen durch die Temperaturerhöhung auf 37°C verkürzt wird. Die bakterizide Wirkung wird durch Körperflüssigkeiten wie Blut, Serum und Eiter nicht beeinträchtigt (Pfirrmann, 1985). Tatsächlich wirkt Taurolidin in vivo besser als in vitro, da der Taurultam-Ring zunächst durch Enzyme des Serums geöffnet wird und dann erst das bakterizid wirksame Hydroxymethyltaurinamid vorliegt. Die MHK-Werte lassen sich somit nicht einfach auf die Klinik übertragen. Die Wirksamkeit von Taurolidin liegt in vivo bis zu achtfach höher als in vitro (Pfirrmann, 1985; Schulz et al., 1989; Blenkarn, 1990).

Zusätzlich zu der bakteriziden Wirkung weist Taurolidin auch eine signifikante antiadhäsive Aktivität gegen verschiedene Mikroorganismen auf (Gorman et al., 1987). Taurolidin hat ein breites Wirkspektrum, das nicht nur Bakterien sondern auch Pilze umfasst (Tabelle 3.5).

Neben der antibakteriellen, antiendotoxischen und antiexotoxischen Wirkung, besitzt Taurolidin auch eine antineoplastische Wirkung. Die selektive und direkte antineoplastische Wirkung durch Induktion des programmierten Zelltodes erfolgt bei wesentlich niedrigeren Konzentrationen als für den antimikrobiellen Effekt notwendig sind (Stendel, 2007). Außerdem reduziert Taurolidin die Expression von Zytokinen wie Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) und Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) aus LPS-stimulierten Makrophagen, die ein Tumorwachstum induzieren können. Auch konnte eine Reduktion der Proliferationsrate, Adhäsion und Migration von Tumorzellen durch Taurolidin gezeigt werden (Nestler et al., 2005).

Nebenwirkungen von Taurolidin, mit Ausnahme von lokalen Reizungen und Schmerzen, treten nur sehr selten auf. Bei zu rascher intravenöser Infusion kann es zu vagotonen Nebenwirkungen wie Tränenfluss, Miosis und Agitation kommen. Die mittlere letale Dosis bei der Maus liegt bei

mehr als 4 g/kg Körpermasse bei intravenöser Gabe (Pfarrmann, 1985; Jacobi et al., 2005; Gong et al., 2007).

Tabelle 3.5: Wirkspektrum des Taurolidins

---

Gramnegative Bakterien	Bacteriodes fragilis Escherichia coli Klebsiella pneumoniae Proteus ssp. Pseudomonas aeruginosa Salmonella typhimurium Serratia marcescens
Grampositive Bakterien	Enterokokken Clostridien Streptococcus faecalis Staphylokokken
Pilze	Aspergillus niger Cryptococcus neoformans Candida ssp.

---

### 3.1.3 WEICHMACHER

Weichmacher sind Materialien, die in Polymere inkorporiert werden, um die Verarbeitbarkeit und/oder die physiko-chemischen und mechanischen Eigenschaften des Endproduktes zu verbessern. Nach der International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) ist ein Weichmacher definiert als eine Substanz, inkorporiert in ein Material (normalerweise ein Plastik oder ein Elastomer), die die Flexibilität, Verarbeitbarkeit oder Dehnbarkeit erhöht. Weiterhin kann ein

Weichmacher die Schmelzviskosität, die Temperatur des Übergangs zweiter Ordnung oder das Elastizitätsmodul des Produkts erniedrigen. Zur Wirkungsweise der Weichmacher wurden verschiedene Theorien aufgestellt (Shtarkman, 1983; Marcilla und Beltrán, 2004).

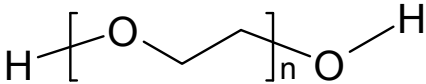
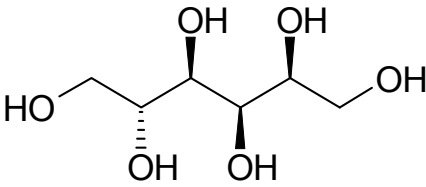
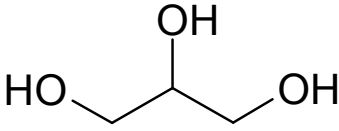
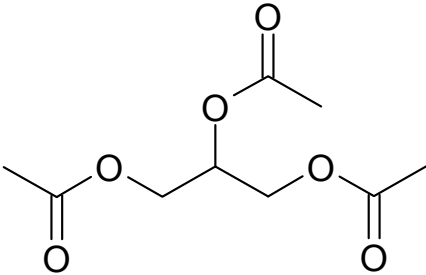
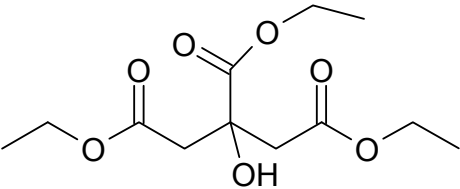
Die „Lubricity“-Theorie beruht auf der Annahme, dass die Inflexibilität der Polymere durch intermolekulare Reibung hervorgerufen wird. Der Weichmacher separiert die Polymerketten und ermöglicht so deren Bewegung gegeneinander. Es entsteht eine interne Schmierung, das Polymer wird flexibler, weicher und dehnbarer.

Die Geltheorie erachtet „Interaktionspunkte“ wie Wasserstoffbrückenbindungen, ionische Wechselwirkungen oder van der Waals Kräfte als Ursache für die intermolekularen Kräfte in einem Polymer. Diese werden durch Zugabe eines Weichmachers durch Polymer-Weichmacher-Interaktionen abgelöst.

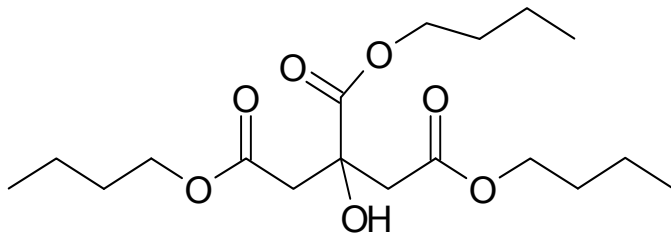
Die „Free Volume“-Theorie besagt, dass durch Zugabe von Weichmacher das freie Volumen in einem Polymer zunimmt und somit die Ketten beweglicher werden. Weichmacher sind sehr viel kleinere Moleküle und haben dadurch mehr freies Volumen (Wang, 2000).

In dieser Arbeit wurden Weichmacher verwendet, um die Glasübergangstemperatur des PLGAs zu senken und somit die Prozessierbarkeit während der Schmelzextrusion zu verbessern. Weiterhin sollte der Einfluss der Weichmacher auf die Arzneiform und das Freisetzungverhalten untersucht werden. Es wurden dazu Weichmacher mit unterschiedlicher Hydrophilie verwendet. Als hydrophile Weichmacher wurden Polyethylenglykol 400 und 4000, Sorbitol und Glycerol, als bedingt wasserlösliche Weichmacher Glyceroltriacetat und Triethylcitrat und als lipophile Weichmacher Tributylcitrat und Dibutylsebacat eingesetzt (Tabelle 3.6).

Tabelle 3.6: Verwendete Weichmacher

Weichmacher	Eigenschaften
Polyethylenglycol (PEG, Macrogol) 	Kennzahl: mittleres Molekulargewicht PEG 400: flüssig PEG 4000: fest, wachsartig Löslich in Wasser
Sorbitol 	Weißes, kristallines Pulver Hygroskopisch Löslich in Wasser Schmelzpunkt: 91-93°C
Glycerol 	Flüssig Farb- und geruchlos Hygroskopisch Löslich in Wasser
Glyceroltriacetat (Triacetin) 	Flüssig Farb- und geruchlos Löslich in Alkohol, Ether Bedingt löslich in Wasser
Triethylcitrat 	Flüssig Farb- und geruchlos Bedingt löslich in Wasser

Tributylcitrat

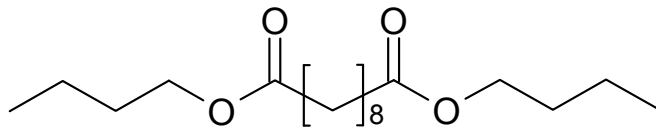


Flüssig

Farb- und geruchlos

Löslich in Ethanol und Ether

Dibutylsebacat



Ölige farblose Flüssigkeit

Löslich in Ethanol und Aceton

## 3.2 METHODEN

### 3.2.1 SCHMELZEXTRUSION

#### 3.2.1.1 GRUNDLAGEN DER SCHMELZEXTRUSION

Schmelzextrusion ist ein kontinuierlicher Herstellungsprozess, ursprünglich aus der Plastikindustrie kommend, der auf wachsendes Interesse in der pharmazeutischen Industrie stößt. So steigen Anmeldungen für Schmelzextrusionspatente für pharmazeutische Systeme kontinuierlich seit den 1980er Jahren an (Crowley et al., 2007). Für pharmazeutische Produkte bietet die Schmelzextrusion einige Vorteile gegenüber traditionellen Herstellungsverfahren (McGinity et al., 2007):

- Schmelzextrusion ist ein lösungsmittelfreies Verfahren, so dass keine Vorbehalte bezüglich Lösungsmittelhandhabung und -rückgewinnung bestehen.
- Es sind nur wenige Prozessschritte notwendig; es entfallen beispielsweise zeitraubende Trocknungsschritte.



- An den Arzneistoff bestehen keine Anforderungen hinsichtlich der Kompressibilität.
- Das intensive Mischen und Umwälzen während des Prozesses bewirkt eine Desaggregation von suspendierten Arzneistoffpartikeln, wodurch eine gleichförmige Dispersion resultiert.
- Die Bioverfügbarkeit eines Arzneistoffs kann enorm verbessert werden, wenn der Arzneistoff molekular dispers in dem Polymer vorliegt.

Immer mehr der neu synthetisierten Arzneistoffe (50-70%) haben aufgrund einer sehr niedrigen Wasserlöslichkeit eine schlechte Bioverfügbarkeit und stellen somit eine große Herausforderung an die Entwicklung der Arzneiform dar. Durch die Schmelzextrusion ist es möglich, die Bioverfügbarkeit solcher Arzneistoffe erheblich zu verbessern, indem der Arzneistoff molekular in das Polymer inkorporiert wird und somit feste Lösungen entstehen (Breitenbach, 2000).

Schmelzextrusion lässt sich mit Schneckenextrudern durchführen, die als Ein- und Zweischneckenausführung erhältlich sind. Einschneckenextruder sind die weltweit am häufigsten eingesetzten Extruder. Sie besitzen aufgrund ihres mechanisch einfachen Aufbaus einen Kostenvorteil gegenüber den Zweischneckenextrudern. Der Einschneckenextruder hat eine Schnecke, die in einem Zylindermantel rotiert und die Vorgänge Fördern, Schmelzen, Mischen und Entgasen ermöglicht. Der Zweischneckenextruder besitzt zwei Schnecken, die gleich- oder gegenläufig rotieren können. Gegenläufig rotierende Zweischneckenextruder weisen gegenüber den Gleichläufigen die Nachteile von potentielltem Luft einschluss, hohem Druck und niedrigen Rotationsgeschwindigkeiten auf. Gleichläufige Zweischneckenextruder sind aufgrund der ineinander greifenden Schnecken selbstreinigend, so dass keine Areale mit geringerer Bewegung entstehen. Es wird dadurch

ein gleichmäßiger und effektiver Transport und somit eine kurze Verweildauer der Extrusionsmasse erreicht. Allgemein haben die Zweischncken- gegenüber den Einschnckenextrudern einige Vorteile wie einfachere Zuführung des Materials aufgrund des besseren Materialeinzugs, höhere Knet- und Mischleistung, geringere Tendenz zur Überhitzung und kürzere Transit-Zeiten (Crowley et al., 2007).

Der Schmelzextrusionsprozess lässt sich in vier Abschnitte aufteilen:

- Zuführung der Produktmischung in den Extruder
- Fördern, Mischen und Erweichen der Masse
- Durchfließen der Düse
- „Downstream“-Prozess

Zur Zuführung der Extrusionsmasse wird diese über den Einfülltrichter in den Extruder gegeben. Je nach Art des Extruders (Ein- oder Zweischnckenextruder, Länge der Schncken, etc.) und den Eigenschaften der Pulvermischung (kohäsiv, frei fließend, etc.) ist eine vorherige Mischung, eventuelle Vorgranulierung oder der Einsatz einer Zuführ-einheit notwendig. Der Extrusionskanal besteht aus einer Einfüllzone, einer Übergangszone und einer Schmelzzone. Die Einfüllzone wird zumeist auf eine relativ niedrige Temperatur eingestellt, so dass das Material noch nicht in eine Schmelze überführt wird, sondern zunächst nur gefördert wird. In der Übergangszone findet eine Durchmischung, Kompression und Schmelzung statt. Die Temperatur wird in der Regel 30-60°C oberhalb der Glasübergangstemperatur des Polymers gesetzt. Die Schmelze erreicht dann die Schmelzzone als homogene plastische Schmelze, geeignet für das Durchfließen der Düse. Die Schmelzzone reduziert die Pulsation der Strömung und ermöglicht so einen gleichmäßigen Materialfluss durch die Düse (Breitenbach, 2002). Die Verweilzeiten der Schmelzen in den Extrudern sind relativ kurz und liegen normalerweise zwischen 1,5 und 4 Minuten (Bruce et al., 2007).

---

Der Extrusionsprozess beinhaltet immer ein Downstreaming-Prozess, wo der prinzipiell endlose Extrusionsstrang in die letztendliche Arzneiform gebracht wird. Im einfachsten Fall wird der Extrusionsstrang mittels eines Pelletizers in Pellets geschnitten, wobei dieser Schritt entweder im heißen, noch nicht erhärteten Zustand (Hot Face Cutting) oder nach dem Abkühlen (Strand Extrusion) stattfinden kann. Die Pellets können weiterhin, wenn sie nicht die Endarzneiform darstellen sollen, gemahlen und zu Tabletten gepresst oder in Kapseln abgefüllt werden. Es ist aber auch möglich, mit Hilfe von gekühlten Kalandervalzen Filme, Folien oder größere tablettenähnliche Festkörper zu produzieren (Gryczke, 2008).

### 3.2.1.2 VERWENDETE EXTRUDER

Die Herstellung der Extrudate erfolgte sowohl mit einem Einschnecken- als auch mit einem Zweisechneckenextruder. Welcher Extruder für die Herstellung der jeweiligen Chargen verwendet wurde, ist in den Kapiteln des praktischen Teils aufgeführt.

Der verwendete Einschneckenextruder E15T-20D (Herbert Stork Maschinen GmbH, Mörfelden, Deutschland) besteht aus einem Fülltrichter, einer Schnecke, drei Temperiermanschetten und einer Düse (Abbildung 3.8). Die Schnecke hat einen Durchmesser von 15 mm und eine Länge von 35 cm. Die drei Temperiermanschetten lassen sich individuell einstellen, so dass drei Temperaturzonen entstehen.

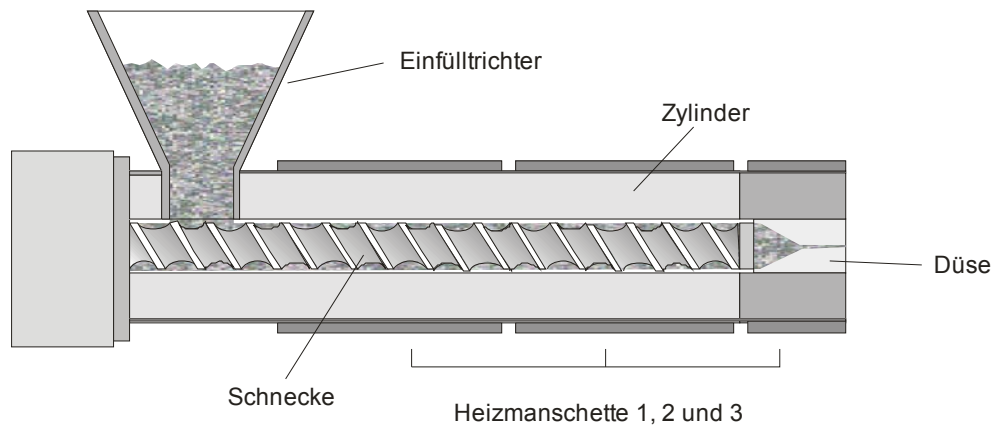


Abbildung 3.8: Schematische Darstellung des Einschneckenextruders E15T-20D von Stork

Bei dem eingesetzten gleichläufigen Zweischneckenextruder handelt es sich um den Minilab II Haake Rheomex CTW5 der Firma ThermoFisherScientific (Karlsruhe, Deutschland), dargestellt in Abbildung 3.9.

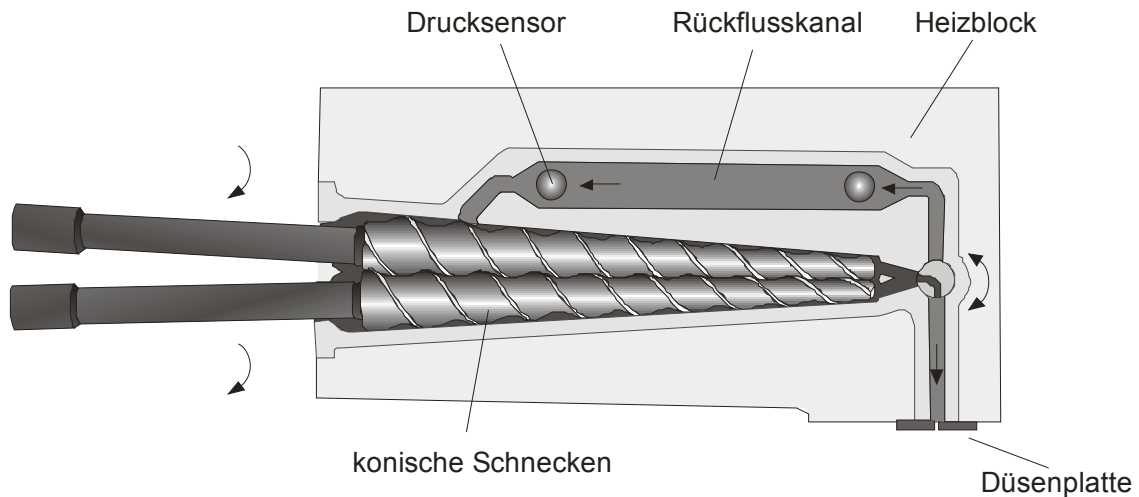


Abbildung 3.9: Schematische Skizze des Schmelzextruders Minilab II mit integriertem Rückflusskanal

Dieser Extruder ist besonders gut geeignet für die Anwendung in Forschung und Entwicklung, denn es werden nur sehr geringe Produktmengen ( $7 \text{ cm}^3$ ) benötigt, was insbesondere bei teuren oder nur in geringen Mengen vorhandenen Stoffen vorteilhaft ist. Der integrierte

Rückflusskanal des Extruders erlaubt außerdem mit Hilfe zweier Drucksensoren die Messung der Schmelzviskosität.

### 3.2.1.3 HERSTELLUNG DER EXTRUDATE

Unabhängig vom Extrudertyp wurden vor der Schmelzextrusion die Bestandteile gemischt. Dazu wurden die pulvrigen Komponenten eingewogen und mit einem Turbulamischer (Willy A. Bachofen AG, Muttenz, Schweiz) 15 Minuten gemischt. Da der Taurolidin-Rohstoff teils grobe Partikel aufwies (visuelle Beurteilung), wurde das Taurolidin zuvor in der Reibschale zerkleinert und gesiebt (Maschenweite 90  $\mu\text{m}$ ). Die flüssigen Weichmacher wurden anschließend zu der Pulvermischung eingewogen und manuell mindestens fünf Minuten eingearbeitet. Die Pulvermischung wurde in den Schmelzextruder gegeben und bei möglichst geringer Temperatur extrudiert. Die Temperatureinstellung erfolgte abhängig von der Zusammensetzung der Formulierung und wird in den jeweiligen Kapiteln des praktischen Teils diskutiert. Bei beiden Extrudern wurde eine Umdrehungsgeschwindigkeit der Schnecke bzw. Schnecken von 40  $\text{min}^{-1}$  eingestellt und eine Düse mit einem Durchmesser von 2 mm verwendet. Der resultierende Extrudatstrang wurde nach dem Erkalten in einheitliche Extrudatstücke mit einem Gewicht von  $10,0 \pm 0,2$  mg geschnitten.

Bei der Herstellung mit dem Einschneckenextruder wurden relativ große Ansatzgrößen (ca. 40 g) benötigt, da der gesamte Extruder zunächst komplett mit Material gefüllt sein muss, um eine Extrusion des Produkts zu erreichen. Außerdem verbleibt aufgrund der fehlenden selbstreinigenden Eigenschaften des Geräts eine dem inneren Volumen des Extruders entsprechende Menge des Produkts im Extruder. Da dieses Gerät nur in der Phase der Formulierungsfindung eingesetzt wurde und

die Produktbestandteile zum Teil sehr kostenintensiv sind, wurde pro Formulierung nur eine Charge hergestellt.

Im Laufe dieser Arbeit wurde der Zweischnuckenextruder Minilab II erworben, der nur sehr geringe Ansatzgrößen erfordert und der durch die selbstreinigende Wirkung der ineinander greifenden Schnecken nur wenig Produktverlust aufweist. Mit diesem Extruder war es daher möglich, für jede Formulierung drei Chargen zu produzieren und zu analysieren.

### **3.2.2 CHARAKTERISIERUNG**

#### **3.2.2.1 DIFFERENZ-KALORIMETRIE**

Zur Bestimmung der Glasübergangstemperatur ( $T_g$ ) der Polymere, der Formulierungen und des Gentamicinsulfats sowie des Schmelzpunkts des Taurolidins wurde das thermoanalytische Verfahren der dynamischen Differenz-Kalorimetrie (engl. **Differential Scanning Calorimetry**, DSC) angewendet. Bei dem eingesetzten Gerät handelt es sich um eine DSC 7 (Perkin Elmer, Norwalk, USA), wobei die erhaltenen Daten mit der Software Pyris, Version 3.81 (Perkin Elmer), ausgewertet wurden. Bei der leistungskompensierten DSC-Messung werden Probe und Referenzprobe in zwei getrennten Öfen unabhängig voneinander nach einem definierten Temperaturprogramm aufgeheizt. Erfolgt in der Probe eine Phasenumwandlung, so wird entweder Energie frei oder benötigt. Dementsprechend muss dem Probeofen mehr oder weniger Energie zugeführt werden, um keine Temperaturdifferenz zum Referenzofen auftreten zu lassen. Gemessen wird der Heizleistungsunterschied, welcher der Wärmestromänderung entspricht. Zur Vermessung wurde 5-10 mg der Probe genau in ein Aluminiumpfännchen eingewogen und mit einem Deckel versiegelt. Der Deckel wurde angestochen (open pan), um einen Druckausgleich während der

Messung zu gewährleisten, so dass es nicht zu einem Platzen des Pfännchens kommt. Die Proben wurden anschließend einem Heizprogramm unterworfen, das entsprechend der Probe so gewählt wurde, dass das thermische Ereignis erfasst werden konnte. Das Temperaturprogramm wurde mit einer Heizrate von 10 K/min durchgeführt, wobei vor dem Start des Aufheizens die Probe zwei Minuten bei der Starttemperatur equilibriert wurde. Um Relaxationsenthalpien, die bei der Lagerung durch Alterungsprozesse entstehen und somit eine Art Gedächtnis bilden, zu entfernen, wurden die Proben nach dem ersten Aufheizen, rasch heruntergekühlt und erneut aufgeheizt. Bei Proben, die bereits zuvor aufgeschmolzen worden sind, um entweder Weichmacher oder Arzneistoff zu inkorporieren oder bei extrudierten Proben, wurde auf eine Abkühl- und Wiederaufheizkurve verzichtet. In Voruntersuchungen hatte sich gezeigt, dass die Vorbehandlung keinen Effekt auf diese DSC-Kurven hatte. Die verwendeten Temperaturprogramme sind in Tabelle 3.7 zusammengefasst.

Tabelle 3.7: Temperaturprogramme der DSC

Probe	Starttemperatur	Maximaltemperatur
Gentamicinsulfat	20°C	280°C
Taurolidin	30°C	250°C
PLGA	10°C	80°C
PLGA mit Weichmacher	-10°C	80°C

Als charakteristische Größe zur Beschreibung der Glasübergangstemperatur wurde die Temperatur des Mittenpunktes der Wendetangente (halbe Stufenhöhe zwischen Onset- und Endtemperatur), projiziert auf die Messkurve verwendet (Half Step-Glasübergangstemperatur) (Höhe

et al., 1996). Eine beispielhafte Auswertung ist in Abbildung 3.10 dargestellt. Die DSC wurde gegen einen Indium-Standard kalibriert.

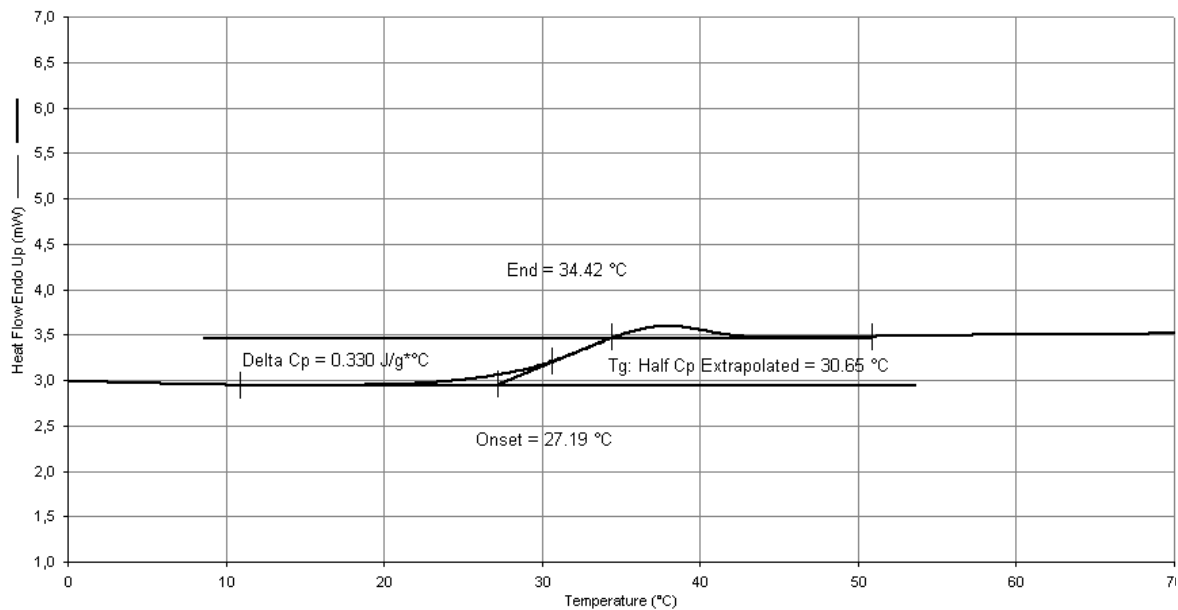


Abbildung 3.10: DSC-Kurve, beispielhafte Auswertung der Probe Resomer RG 503 H mit 40% Taurolidin und 5% PEG 400

### 3.2.2.2 RÖNTGENDIFFRAKTOMETRIE

Zur Untersuchung der Proben hinsichtlich ihrer Kristallinität wurde ein Röntgendiffraktometer verwendet. Bei der Röntgendiffraktometrie wird von einer Röntgenröhre ein Röntgenstrahl emittiert, der auf eine Probe prallt, gebeugt wird und auf einen Detektor trifft. Die Wellenlänge von Röntgenstrahlen liegt im Bereich von Atom- bis Molekülgröße, so dass Kristalle, die ein dreidimensionales Gitter aus Atomen und Molekülen darstellen, auf Röntgenstrahlen wie eine Vielzahl von in parallelen Ebenen angeordneten Beugungsgittern (Netzebenen) wirken. Wenn Röntgenstrahlen auf eine kristalline Substanz treffen, entsteht ein Beugungsbild der Röntgenstrahlung, welches durch die Bragg'sche Gleichung beschrieben wird. Gemäß dieser wird ein Röntgenstrahl, der auf einen Kristall trifft, so gebeugt, dass Reflexe an diskreten Orten im Raum auftreten. Das Diffraktometer detektiert nun Ort und Intensität der



auftretenden Reflexe (Fix, 2004). Während kristalline Feststoffe charakteristische Beugungsintensitätsmaxima (Peaks) zeigen, weisen amorphe Stoffe nur eine diffuse Streuung („Halo“) auf, was im Röntgendiffraktogramm als flacher, breiter Berg erkennbar ist.

Das eingesetzte Gerät Stadi P (Stoe & Cie GmbH, Darmstadt, Deutschland) ist mit einer Kupferanode mit einer Leistung von 1200 Watt (Beschleunigungsspannung von 40 kV, Stromstärke von 30 mA) ausgestattet. Bei der angewendeten Transmissionsmessung befindet sich die Probe in einem Probenhalter zwischen zwei Mylar<sup>®</sup>-Folien (PETP). Die Detektion der Röntgenreflexe fand in einem Bereich von 5 bis 50 2-Theta statt.

### 3.2.2.3 LASERDIFFRAKTOMETRIE

Zur Bestimmung der Partikelgröße und der Partikelgrößenverteilung der Ausgangssubstanzen wurde das Verfahren der Laserdiffraktometrie angewendet, bei dem es sich um ein Lichtbeugungsverfahren handelt. Wenn Licht auf ein Teilchen trifft, entstehen unterschiedliche Beugungsbilder, abhängig von Größe und Gestalt der Teilchen, wobei kleinere Teilchen das Licht stärker beugen. Die Lichtquelle ist ein Laserlicht, das durch ein Linsensystem aufgeweitet wird. Nachdem der Laser auf das Partikel getroffen ist und gebeugt wurde, sorgt eine nachgeschaltete Fourier-Linse dafür, dass die Beugungsbilder unabhängig von der Position des Teilchens im Messvolumen, immer auf dieselbe Position des Detektors projiziert werden. Die Stärke des Lichts und das Beugungsmuster werden von dem Detektor erfasst und vom Computer basierend auf der Fraunhofer-Theorie ausgewertet. In dieser Arbeit wurde ein Laserdiffraktometer Typ HELOS der Firma Sympatec GmbH (Clausthal-Zellerfeld, Deutschland) eingesetzt. Zur Dispergierung der Proben wurde das Trockendispergiermodul RODOS verwendet, das

das Pulver mit 3 bar Pressluft vor der Linse dispergiert. Ab einer optischen Mindestkonzentration von 0,5% wurden Messdaten aufgezeichnet. Für die Vermessung des Gentamicinsulfats und des PLGAs wurde die Linse R4 mit einem Messbereich von 1,8 bis 350  $\mu\text{m}$  und für die Vermessung des Taurolidins die Linse R3 mit einem Messbereich von 0,9 bis 175  $\mu\text{m}$  eingesetzt. Es wurden mindestens Dreifachbestimmungen durchgeführt. Die Auswertung der Daten erfolgte mit der Software Windox (Version 4, Sympatec).

#### 3.2.2.4 VISKOSITÄTSMESSUNGEN DER POLYMERSCHMELZEN

Rheologie ist die Lehre von der Verformung von Feststoffen, Flüssigkeiten oder Gasen unter Einwirkung einer äußeren Kraft. Ideale Festkörper verhalten sich dabei elastisch, das heißt die Verformung ist komplett reversibel, während ideale Flüssigkeiten unter Einfluss einer äußeren Kraft fließen und sich somit irreversibel verformen (Newtonsche Flüssigkeiten). Reale Körper weisen jedoch meist eine Mischung aus beiden Eigenschaften und damit ein viskoelastisches Verhalten auf.

Polymerschmelzen, als nicht-Newtonsche Flüssigkeiten, zeigen im Allgemeinen ein strukturviskoses (pseudoplastisches) Fließverhalten: mit zunehmendem Geschwindigkeitsgefälle erfolgt eine Viskositätsabnahme, da sich die verzweigten und ineinander verschlungenen Molekülketten bei angelegter tangentialer Kraft entwirren, orientieren und strecken und somit der innere Widerstand sinkt. Allerdings weisen Polymerschmelzen bei niedrigen Geschwindigkeitsgefällen analog zu Newtonschen Flüssigkeiten eine konstante Viskosität auf, da die Brown'sche Molekularbewegung die Moleküle in einer zufälligen Anordnung hält (erster newtonscher Bereich oder Nullviskosität  $\eta_0$ ). Erst oberhalb einer kritischen Schergeschwindigkeit  $\dot{\gamma}_c$ , bei der die Entwirrung und Orientierung der Molekülketten die beliebig gerichtete Brown'sche

Molekularbewegung übersteigt, fällt die Viskosität ab. In diesem strukturviskosen Bereich weist die Viskosität im logarithmischen Maßstab näherungsweise eine Gerade auf (Abbildung 3.11). Wenn die Polymerketten vollständig entknäult und entsprechend der Fließrichtung orientiert sind, führt eine weitere Erhöhung des Geschwindigkeitsgefälles zu keiner Erniedrigung der Viskosität, der zweite Newtonsche Bereich ist erreicht (Pahl et al., 1995).

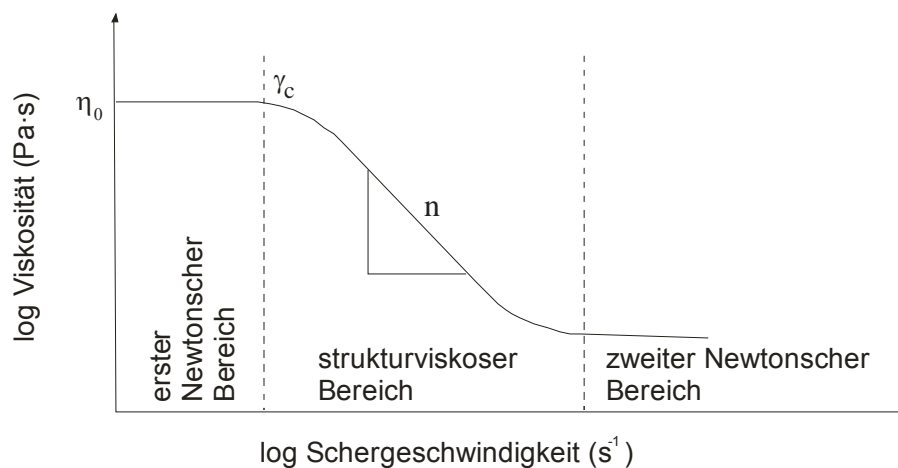


Abbildung 3.11: Viskositätskurve einer strukturviskosen Substanz in logarithmischer Darstellung

Eine einfache Möglichkeit sich dem strukturviskosen Fließverhalten im linearen Bereich der log-log-Darstellung zu nähern, ist das Potenzgesetz (Ostwald-de-Waele-Gleichung), wobei  $\tau$  die Schubspannung,  $k$  die Konsistenz,  $\dot{\gamma}$  das Geschwindigkeitsgefälle und  $n$  den Fließindex darstellen (Gleichung 3.1).

$$\tau = k \cdot \dot{\gamma}^n \quad (\text{Gleichung 3.1})$$

Die Vermessung der rheologischen Eigenschaften der Polymer-schmelzen wurde mit dem Schmelzextruder Minilab II durchgeführt. Der integrierte Rückflusskanal im Extruder stellt ein Kapillar-Viskosimeter mit Schlitzdüse dar, mit dessen Hilfe die Viskositäten der Schmelzen ermittelt werden konnten. Der Kanal definierter Größe ist eine Schlitz-

---

Kapillare, durch den die Extruderschnecke die Schmelze mit programmierter veränderlicher Fließgeschwindigkeit treibt. In dem Kanal entsteht durch das erzwungene Fließen ein viskositätsproportionales Druckgefälle, welches durch zwei Drucksensoren mit definiertem Abstand am Anfang und am Ende des Kanals gemessen wird. Die Drucksensoren müssen dabei einen ausreichenden Abstand zum Düseneingang und zum Kanalende haben, um eventuelle Störeinflüsse zu vermeiden. Außerdem sollte die Kanalweite im Vergleich zur Tiefe des Kanals möglichst groß sein, um Seitenwandeffekte klein zu halten (Schramm, 1995). Druckverluste, die elastizitätsbedingt oder durch nicht-laminare Strömung hervorgerufen werden, bleiben bei dieser Messmethode unberücksichtigt. Da hier allerdings die Viskositäten der Formulierungen im Vergleich zueinander betrachtet werden sollten, war die Kenntnis der Absolutwerte nicht erforderlich. Durch den gemessenen Druckverlust in dem Rückflusskanal lässt sich mit Hilfe der Schlitzgeometrie die Schubspannung  $\tau$  berechnen. Das Geschwindigkeitsgefälle  $\dot{\gamma}$  wird ebenfalls über die Schlitzgeometrie und zusätzlich aus dem Volumenstrom berechnet, wobei sich der Volumenstrom wiederum aus der Drehzahl der Extruderschnecken ergibt. Die Viskosität der Polymerschmelze lässt sich aus der Schubspannung  $\tau$  und dem Geschwindigkeitsgefälle  $\dot{\gamma}$  ermitteln.

Da die Viskosität von Flüssigkeiten bzw. Schmelzen stark temperaturabhängig ist und somit ein Vergleich zwischen den Formulierungen bei unterschiedlichen Messtemperaturen nicht möglich gewesen wäre, war es erforderlich, die Temperatur während des gesamten Messvorgangs konstant zu halten. Somit wurden alle Formulierungen bei 110°C vermessen, der niedrigsten Temperatureinstellung, bei der die Förderung der Formulierung mit der höchsten Viskosität noch ohne Probleme möglich war. Die rheologischen

Versuche wurden mit Drehzahlen von 10 bis 200 s<sup>-1</sup> in logarithmischer Steigerung mit zehn Messschritten durchgeführt. Zur Auswertungen der erhaltenen Fließkurven wurde durch Regressionsrechnung die Steigung des linearen Segmentes in log-log-Darstellung ermittelt. Zur Regressionsrechnung wurde die Ostwald-de-Waele-Gleichung (Gleichung 3.1) verwendet, um daraus die Viskositäten der Formulierungen bei einem Geschwindigkeitsgefälle von 100 s<sup>-1</sup> zu berechnen.

### 3.2.2.5 RASTERELEKTRONENMIKROSKOPIE

Um die Oberflächenmorphologie und den Degradationsverlauf der Extrudate visualisieren zu können, wurden rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen gemacht. Dazu wurden die Extrudate auf einen mit einer leitfähigen Folie (Leit-Tabs, Plannet GmbH, Wetzlar, Deutschland) beklebten Aluminiumprobenhalter gesetzt. Eine Goldbeschichtung wurde in einer Argon-Atmosphäre (50 Pa) bei einer Stromstärke von 50 mA in 50 Sekunden in einem Sputter Coater SCD 005 (Bal-Tec AG, Liechtenstein) aufgetragen. Zu Beginn der Arbeit wurde ein Philips XL 20 Rasterelektronenmikroskop (Philips, Eindhoven, Niederlande), später ein Zeiss DSM 940 Rasterelektronenmikroskop (Carl Zeiss GmbH, Oberkochen, Deutschland) verwendet.

### 3.2.2.6 WIRKSTOFFGEHALT

Zur Bestimmung des Wirkstoffgehalts in den Extrudaten mussten diese zunächst aufgelöst und der Wirkstoff extrahiert werden. Dazu wurden die Extrudatstücke genau gewogen und einzeln in 2 ml Dichlormethan in einem Schnappdeckelgefäß gelöst. Nach Zugabe von 4 ml Wasser wurde die Proben auf einem Laborschüttler (Schüttler SM, Edmund Bühler GmbH, Hechingen, Deutschland) eine Stunde gemischt. Nach

kurzer Ruhe und damit Trennung der Phasen konnten Proben aus den wässrigen Phasen entnommen werden. Um die Wiederfindung des Arzneistoffs bestimmen zu können, wurde eine definierte Menge eingewogen und wie mit den restlichen Proben verfahren ( $n = 3$ ). Der Gehalt des Arzneistoffs in der wässrigen Phase wurde mittels HPLC (siehe 3.2.2.8) bestimmt. Zur Berechnung des Arzneistoffsgehalts wurde sowohl die Einwaage des Extrudatstücks als auch die Wiederfindung berücksichtigt.

### 3.2.2.7 FREISETZUNG

Um den Freisetzungsverlauf *in vitro* verfolgen zu können, wurden jeweils fünf Extrudatstücke (bzw. im Falle des Septopals<sup>®</sup> eine Kugel) mit einem annähernd gleichen Gewicht von 10,0 mg ( $\pm 0,2$  mg) in 3 ml FreisetzungsmEDIUM bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Als FreisetzungsmEDIUM wurde Phosphatpuffer pH 7,4 nach Ph. Eur. verwendet, welcher aus 250,0 ml Kaliumhydrogenphosphat-Lösung (0,2 mol/l) und 393,4 ml Natriumhydroxid-Lösung (0,1 mol/l) zusammengesetzt ist. Alle 72 Stunden, beginnend von Tag 1, wurde der Phosphatpuffer entnommen und durch frisches MEDIUM ersetzt. Bis zur Bestimmung des Arzneistoffgehalts in dem FreisetzungsmEDIUM mittels HPLC (siehe 3.2.2.8) wurden die Proben bei -30°C tiefgefroren.

### 3.2.2.8 ARZNEISTOFFQUANTIFIZIERUNG

Die quantitative Bestimmung des Arzneistoffgehalts in den Proben der Gehaltsbestimmung und der Freisetzung wurde mit Hilfe von Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl. **high performance liquid chromatography**, HPLC) durchgeführt. Da sowohl Gentamicinsulfat als auch Taurolidin bzw. seine hydrolytischen Zersetzungsprodukte keine UV-absorbierenden Chromophore besitzen, mussten beide Arzneistoffe

durch Derivatisierung der UV-Detektion zugänglich gemacht werden. Für die quantitative Bestimmung des Gentamicinsulfats wurde die HPLC-Methode zur Gehaltsbestimmung der Gentamicine C<sub>1</sub>, C<sub>1a</sub> und C<sub>2</sub> der USP 30 modifiziert. Die HPLC-Analytik von Taurolidin dagegen wurde basierend auf einer von Gong et al. (2007) beschriebenen Methode entwickelt.

Für die Analytik beider Arzneistoffe wurde eine Agilent-HPLC-Anlage (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) mit den Komponenten Pumpe, Entgaser, Autosampler, Säulenofen und Photodioden-Array-Detektor eingesetzt. Als stationäre Phase wurde eine RP-18 Säule (LiChroChart 125-4, LiChroSpher 100 RP-18, 5 µm) mit einer Vorsäule (LiChroChart 4-4, LiChroSpher 100 RP-18, 5 µm, beide Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) verwendet. Die Auswertung erfolgte mit der geräteeigenen Software Chemstation.

### Gentamicinsulfat-Methode

Die Derivatisierung des Gentamicinsulfats erfolgte mit ortho-Phthalaldehyd (OPA), das in Anwesenheit von reduzierenden Schwefelverbindungen mit primären Aminen zu stark fluoreszierenden Isoindol-Derivaten reagiert (Abbildung 3.12).

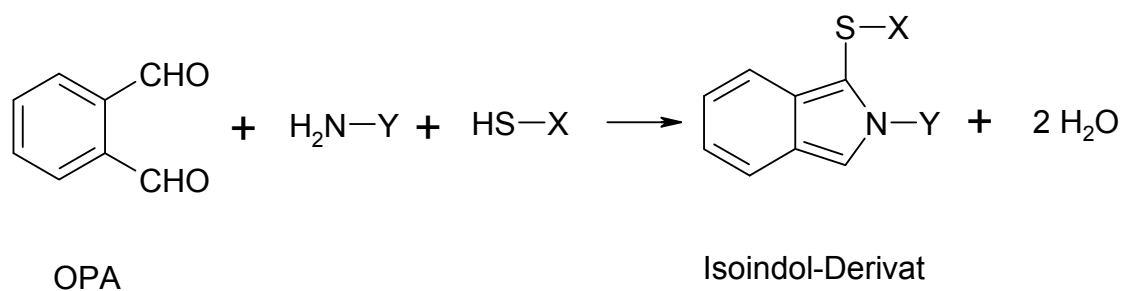


Abbildung 3.12: Derivatisierung des Gentamicins mit OPA

Bei Raumtemperatur ist diese Reaktion in einem alkalischen Medium normalerweise innerhalb von 30 Sekunden abgeschlossen. Da das o-Phthalaldehyd nur mit primären Aminogruppen reagiert, ergeben

gleiche Konzentrationen der vier Hauptkomponenten des Gentamicins wegen der variierenden Anzahl dieser Gruppen unterschiedliche Peakflächen. Es ist daher erforderlich, zur Kalibrierung die gleiche Charge des Gentamicinsulfat zu verwenden, die auch zur Herstellung des Produktes diente, damit die Hauptkomponenten des Gentamicins im gleichen Verhältnis vorliegen (Van Duijn et al., 1988). Über die Summe der Peakflächen der Gentamicine  $C_{1a}$ ,  $C_{2a}$  und  $C_2$  wurde der Gehalt an Gentamicin in der Probe kalkuliert (Weigand und Coombes, 1983). Die Kalibrierung erfolgte mit Hilfe von einem externen Standard in Konzentrationen zwischen 50 µg/ml und 500 µg/ml (Bestimmtheitsmaß > 0,999).

Zur Herstellung des Derivatisierungsreagenzes wurde 1,0 g o-Phthalaldehyd in 5 ml Methanol gelöst und anschließend mit 95 ml 0,4 M Borsäurelösung (eingestellt auf pH 10,4) versetzt. Nach Zugabe von 2 ml Thioglykolsäure wurde der pH-Wert auf 10,4 mit einer 8 N KOH-Lösung eingestellt. Die Derivatisierung der Proben wurde mit 1 ml Probe durchgeführt, die mit 0,5 ml Isopropanol und 0,4 ml Derivatisierungsreagenz versetzt wurde. Nach kurzem Schütteln wurden weitere 0,6 ml Isopropanol zugesetzt und anschließend die Proben bei 60°C 15 Minuten inkubiert. Die Analysenparameter der HPLC-Methode sind in der Tabelle 3.8 zusammengefasst.



Tabelle 3.8: Analysenparameter der Gentamicin-HPLC-Methode

Säulentemperatur	Temperiert: 25°C
Mobile Phase	700 ml Methanol 250 ml Wasser 50 ml Eisessig 5 g Natrium-1-heptansulfonat
Injektionsvolumen	50 µl
Flussrate	1,0 ml/min
Laufzeit	16 min
Detektionswellenlänge	330 nm
Retentionszeiten	C <sub>1a</sub> = 8,5 min; C <sub>2a</sub> = 10,8 min; C <sub>2</sub> = 12,4 min

### Taurolidin-Methode

Die quantitative Bestimmung des Taurolidins erfolgte indirekt über das hydrolytische Zersetzungsprodukt Taurultam (siehe Kapitel 3.1.2.2.), zu welchem es in wässriger Lösung praktisch vollständig zerfällt (Myers et al., 1980; Günter, 2003). Die Derivatisierung der Proben erfolgte mit 9-Fluorenylmethylchlorformiat (Fmoc) (Abbildung 3.13) (Gong et al., 2007).

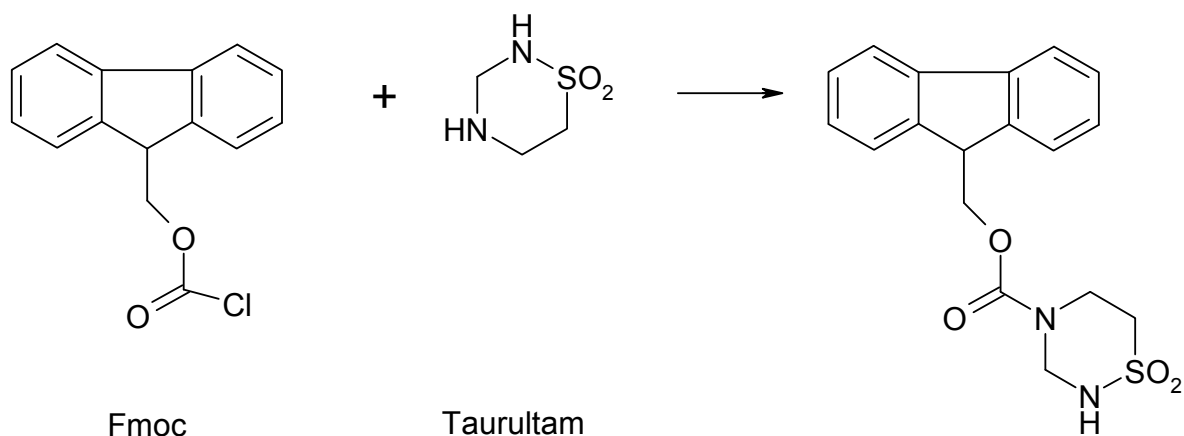


Abbildung 3.13: Derivatisierung des Taurultams mit Fmoc

Die Proben wurden dazu zunächst mit Acetonitril verdünnt (mindestens im Verhältnis 4:5), um ein Ausfällen des Derivatisierungsreagenzes zu vermeiden. Zu 1 ml der Probelösungen wurden jeweils 200 µl des in Acetonitril gelösten Derivatisierungsreagenzes (15 mM) zugesetzt und die Lösung anschließend bei Raumtemperatur für 30 Minuten geschüttelt. Die Proben wurden nachfolgend sechs Stunden bei Raumtemperatur stehen gelassen, um eine ausreichende Stabilität der derivatisierten Proben zu erreichen. Vorversuche zur Etablierung dieser Methode hatten gezeigt, dass die Fläche des Taurultampeaks mit der Zeit zunimmt, bis es zu einem Plateau kommt (Abbildung 3.14). Vermutlich wird das Taurultam durch die Derivatisierungsreaktion dem Gleichgewicht zwischen Hydroxymethyltaurultam und Taurultam, Formaldehyd komplett entzogen.

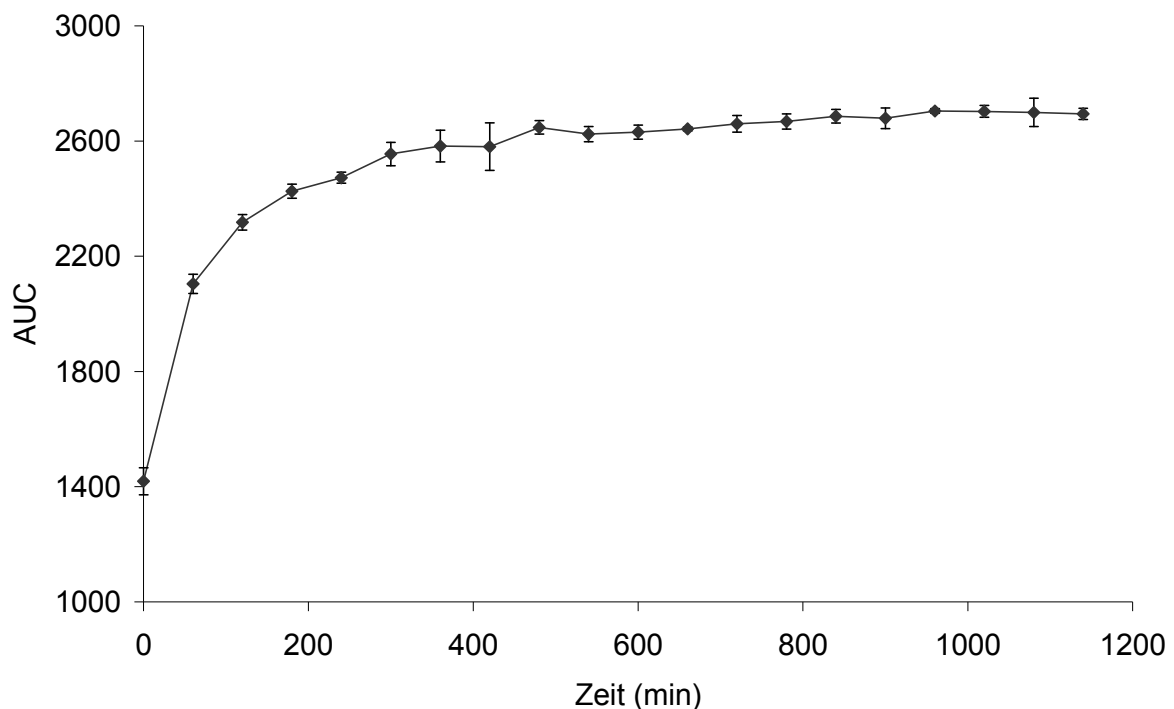


Abbildung 3.14: Veränderung der AUC des Taurultam-Peaks mit der Zeit;  
Konzentration 60 µg/ml, n = 3

Die Gerätedaten und die Analysenparameter sind in der Tabelle 3.9 aufgeführt. Die Kalibrierung erfolgte mittels externer Standards in

Konzentrationen zwischen 20 µg/ml und 100 µg/ml mit einem Bestimmtheitsmaß größer 0,999.

Tabelle 3.9: Analysenparameter der Taurolidin-HPLC-Methode

Säulentemperatur	Temperiert: 20°C			
Mobile Phase	A	45%	Acetonitril	
		55%	0,1% Trifluoressigsäure in Aqua bidest.	
	B	100%	Acetonitril	
Gradientenprofil	Laufzeit (min)	A (%)	B (%)	
		0-7,5	55	45
		7,5-9	33	67
		9-13	33	67
		13-14,5	55	45
		14,5-17	55	45
Injektionsvolumen	10 µl			
Flussrate	1,0 ml/min			
Laufzeit	17 min			
Detektionswellenlänge	220 nm			
Retentionszeiten	8,5 min			

### 3.2.2.9 QUELLUNG

Die Quellung der Extrudate im Freisetzungsmedium wurde an fünf Extrudatstücken pro Formulierung getestet. Dazu wurden diese genau gewogen (10 mg ± 0,2 mg) und bei 37°C auf einem Schüttelwasserbad in 3 ml Phosphatpuffer pH 7,4 (Ph.Eur.) inkubiert. Nach definierten Zeiträumen wurden die Extrudate dem Freisetzungsmedium entnommen

und das an der Oberfläche anhaftende Wasser mit einem Präzisionswischtuch (Kimtech Science, Kimberly-Clark, Surrey, UK) vorsichtig entfernt. Zur Bestimmung der Wasseraufnahme wurden die Extrudate anschließend feucht gewogen.

#### 3.2.2.10 MASSEVERLUST

Um den Masseverlust der Extrudate während des Freisetzungsvorgangs beobachten zu können, wurde die Proben zur Bestimmung der Quellung nach dem Feuchtwiegen getrocknet. Zur Trocknung der Extrudate wurde ein Gefriertrockner (Gefriertrockner Alpha 1-4 LDC-1M, Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode, Deutschland) verwendet. Die Einfriertemperatur lag bei  $-20^{\circ}\text{C}$  (ca. 4 Stunden) und die Primärtrocknung wurde bei  $-5^{\circ}\text{C}$  und einem Druck von 4,02 mbar über etwa 24 Stunden durchgeführt. Die Sekundärtrocknung erfolgte bei  $15^{\circ}\text{C}$  und 0,08 mbar. Nach dem Trocknen wurden die Extrudate erneut gewogen, um den Masseverlust zu bestimmen. Dieser Vorgang war nur so lange möglich, wie die Extrudate in Form blieben und nicht bei Berührung zerfielen.

#### 3.2.2.11 VERLAUF DES pH-WERTES

Die Veränderungen des pH-Wertes, während die Extrudate einem wässrigen Medium ausgesetzt waren, wurden ebenfalls untersucht. Die Proben wurden hierfür in Phosphatpuffer pH 7,4 (Ph.Eur.) gelegt und in Zeitabständen von drei Tagen wurde mit dem Präzisions-pH-Meter inolab pH 730 (WTW Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH, Weilheim, Deutschland) der pH-Wert vermessen.

### 3.2.2.12 STRAHLENSTERILISATION

Der Einfluss einer Strahlensterilisation auf die Extrudate wurde untersucht, da Arzneiformen zur parenteralen Anwendung sterilisiert werden müssen. Das europäische Arzneibuch führt folgende möglichen Sterilisationsverfahren auf:

- Dampfsterilisation
- Sterilisation durch trockene Hitze
- Strahlensterilisation
- Gassterilisation
- Filtration durch bakterienzurückhaltende Filter

Da die Extrudate aufgrund des nicht thermostabilen Matrixsystems PLGA (Glasübergangstemperatur 42-50°C) Verfahren bei erhöhter Temperatur nicht zulassen und die Gassterilisation nur eine Oberflächensterilisation darstellt, so dass eingeschlossene Keime nicht abgetötet werden, wurden die Proben durch ionisierende Strahlen sterilisiert. Die Strahlensterilisation wurde von der Firma Beta-Gamma-Service GmbH & Co. KG (Wiehl, Deutschland) durchgeführt. Die Proben wurden dabei mit Gammastrahlen mit einer Oberflächendosis von 28 kGy bzw. 56 kGy bestrahlt.

## **4 ENTWICKLUNG VON GENTAMICINSULFAT-IMPLANTATEN**

### **4.1 VORAUSWAHL GEEIGNETER WEICHMACHER**

Bei der Herstellung einer Arzneiform durch Schmelzextrusion wird ein Wirkstoff durch einen Schmelzprozess in eine Matrix (Polymer, Wachs oder Fett) eingebettet. Die Matrix kann zusätzlich noch weitere Hilfsstoffe wie Weichmacher, Schmiermittel, Antioxidantien o. ä. enthalten. Die Verwendung eines Polymers als Matrix erfordert in der Regel den Zusatz eines Weichmachers, um entweder die Prozesstemperatur und somit die thermische Belastung des Arzneistoffs und des Polymers während der Herstellung zu senken, oder um die physikalischen und mechanischen Eigenschaften des Endprodukts zu verbessern. Zusätzlich kann der Weichmacher das Freisetzungsprofil modifizieren und das äußere Erscheinungsbild der Arzneiform verbessern (Zhu et al., 2002).

Weichmacher sind Substanzen, meist mit niedrigem Molekulargewicht, die inkorporiert in ein Polymer die intermolekularen Bindungen zwischen den Polymerketten schwächen und somit seine Elastizität und Flexibilität erhöhen sowie die Glasübergangstemperatur ( $T_g$ ) und die Schmelzviskosität erniedrigen (Felton, 2007). Die verschiedenen Theorien zur Wirkungsweise der Weichmacher sind in Kapitel 3.1.3 beschrieben. Durch die Senkung der  $T_g$  und der Schmelzviskosität ermöglichen Weichmacher Herstellungsprozesse bei niedrigerer Prozesstemperatur und geringerem Drehmoment. Die optimierten Prozessparameter führen zu einer besseren Stabilität sowohl des Arzneistoffs als auch des Polymers während der Schmelzextrusion.

In der folgenden Tabelle 4.1 sind Substanzen aufgeführt, die allgemein als Weichmacher eingesetzt werden und von der FDA als Hilfsstoffe von Arzneimitteln zugelassen sind (Crowley et al., 2007).

Tabelle 4.1: Allgemein eingesetzte Weichmacher in Arzneiformen

Typ	Beispiele
Citronensäureester	Triethylcitrat, Tributylcitrat, Acetyltriethylcitrat, Acetyltributylcitrat
Fettsäureester	Butylstearat, Glycerolmonostearat, Stearylalkohol
Sebacinsäureester	Dibutylsebacat
Phthalsäureester	Diethylphthalat, Dibutylphthalat, Dioctylphosphat
Glykolderivate	Polyethylenglykol, Propylenglykol,
Andere	Triacetin, Mineralöl, Rizinusöl, Vitamin E TPGS (D- $\alpha$ -Tocopherylpolyethylenglycolsuccinat)

Neben diesen traditionellen Weichmachern agieren auch einige Arzneistoffe als nicht-traditionelle Weichmacher, indem sie die Tg des Polymers, in dem sie eingebettet sind, senken. So konnten Repka et al. (1999) zeigen, dass sowohl Chlorphenaminmaleat als auch Hydrocortison exzellente Weichmacher für Hydroxypropylcellulose darstellen und Aitken et al. (1996), dass Lidocain-HCl die Tg von Eudragit® E senkt. Der Einfluss des Arzneistoffs auf das Polymer sollte somit immer berücksichtigt und untersucht werden.

Die Auswahl eines geeigneten Weichmachers hängt von verschiedenen Faktoren wie einer guten Effizienz und einer Polymer-Weichmacher-Kompatibilität ab. Um die Weichmachereffizienz und die Mischbarkeit des Weichmachers mit dem Polymer zu bestimmen, wurden die Glasübergangstemperaturen von Mischungen des Polymers Polylaktid-co-glykolid 50:50 (PLGA) mit verschiedenen Weichmachern mit Hilfe der DSC bestimmt. Wenn bei der Mischung nur eine Glasübergangstemperatur zwischen denen der einzelnen Komponenten auftritt, kann dies als Zeichen für eine Mischbarkeit gewertet werden. Die Effizienz

eines Weichmachers lässt sich über die Senkung der Glasübergangstemperatur in Abhängigkeit von der Weichmacher-Konzentration darstellen (Shtarkman, 1983; Zhu et al., 2002).

Um beurteilen zu können, ob Gentamicinsulfat bezüglich PLGA als nicht-traditioneller Weichmacher agiert, wurde der Einfluss des Arzneistoffs auf die Glasübergangstemperatur untersucht. Gentamicin wird nach der Fermentation durch Sprühtrocknung in eine Pulverform überführt und liegt daher amorph vor (siehe Kapitel 4.2.1). Die Glasübergangstemperatur des Gentamicinsulfats liegt bei  $101,4^{\circ}\text{C}$  und ab einer Temperatur von ca.  $245^{\circ}\text{C}$  beginnt eine Zersetzung des Antibiotikums (Abbildung 4.1).

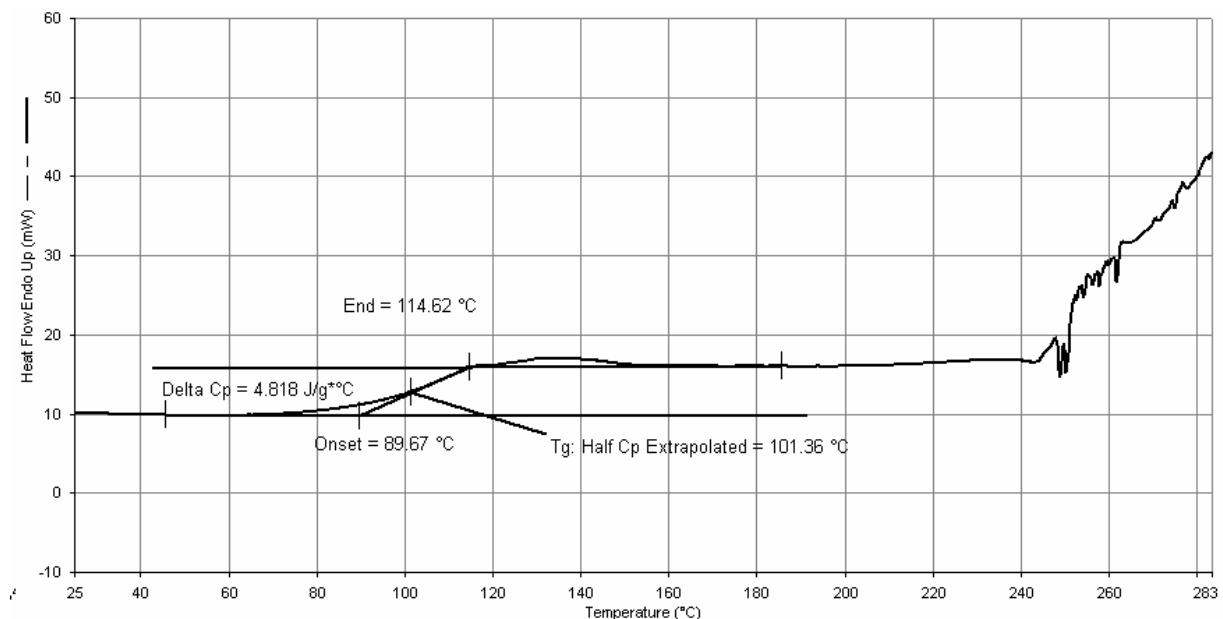


Abbildung 4.1: DSC-Kurve von Gentamicinsulfat

Der Einfluss des Gentamicinsulfats auf die Glasübergangstemperatur des PLGAs ist in der Abbildung 4.2 dargestellt. Die Messung der Glasübergangstemperaturen mit 0, 5 und 10% Wirkstoff wurden zu Beginn dieser Arbeit mit PLGA 5050 DLFR1 durchgeführt. Dazu wurden Pulvermischungen des Polymers mit dem Antibiotikum hergestellt, auf



einem Ölbad bei etwa 120°C aufgeschmolzen und homogenisiert. Die weiteren Messungen der Glasübergangstemperaturen mit höheren Gentamicinsulfat-Konzentrationen wurden mit Proben von Extrudaten durchgeführt, die im Laufe dieser Arbeit hergestellt wurden. Diese Pulvermischungen, hier allerdings mit dem PLGA Resomer RG 503 H, wurden bei einer Temperatur von 110°C extrudiert, der niedrigsten Temperatur, bei der eine Extrusion ohne Weichmacher-Zusatz möglich war.

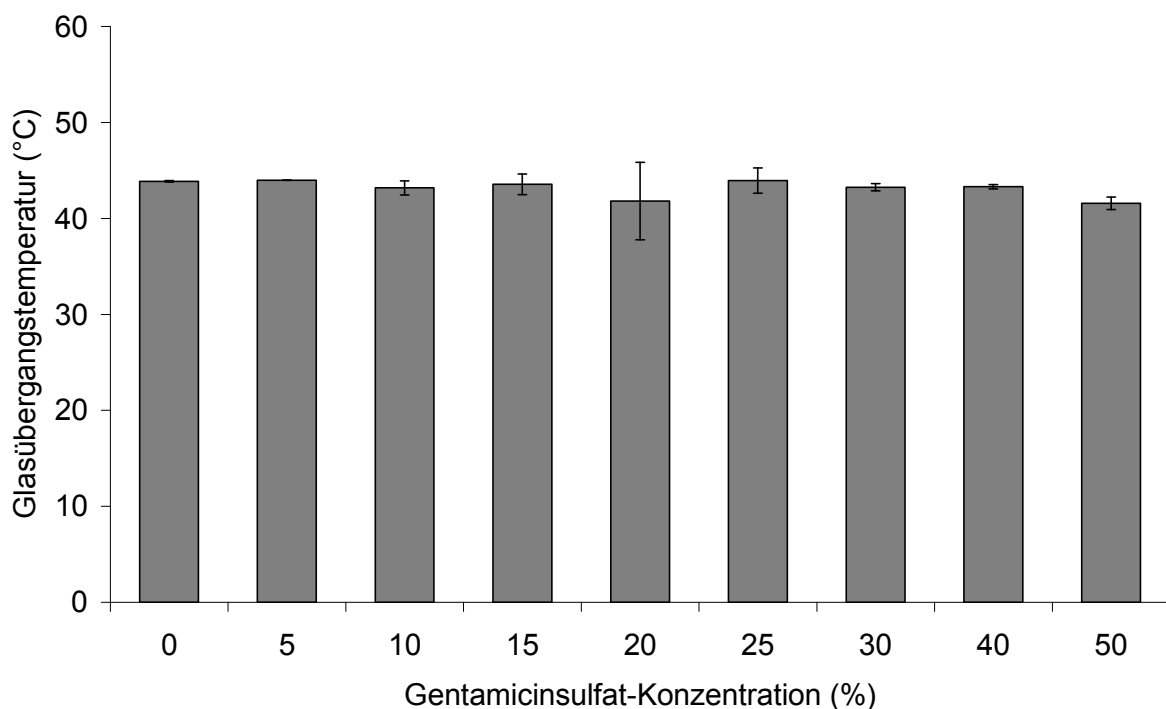


Abbildung 4.2: Glasübergangstemperaturen von PLGA mit steigender Gentamicinsulfat-Konzentration (0-50%)

Es lässt sich deutlich der Grafik entnehmen, dass das Gentamicinsulfat keinen Weichmachereffekt auf das Polymer PLGA, unabhängig von der Qualität, ausübt, da sich die Tg des PLGAs mit steigender Arzneistoff-Konzentration nicht verändert. Obwohl alle Proben bei höheren Temperaturen als der Tg des Gentamicinsulfats hergestellt wurden und somit das Gentamicinsulfat wahrscheinlich zumindest vorübergehend erweicht im Polymer vorgelegen haben muss, zeigt sich kein

Weichmacher-Einfluss auf das PLGA. Es ist somit keine Mischbarkeit des Gentamicinsulfats mit PLGA gegeben.

Da das Gentamicinsulfat keinen Tg-erniedrigenden Effekt aufwies, wurden Weichmacher von unterschiedlicher chemischer Struktur und unterschiedlicher Hydrophilie auf ihre Mischbarkeit und Effizienz in Kombination mit PLGA getestet. Es wurden hierfür Weichmacher ausgewählt, die bereits als Hilfsstoffe in pharmazeutischen Zubereitungen zugelassen sind und dort als Weichmacher eingesetzt werden (Tabelle 4.2).

Tabelle 4.2: Weichmacher, die auf Mischbarkeit und Weichmachereffizienz mit PLGA getestet wurden

Hydrophile Weichmacher	Lipophile Weichmacher
Glycerol	Glyceroltriacetat
Sorbitol	Triethylcitrat
Polyethylenglykol 400	Tributylcitrat
Polyethylenglykol 4000	Dibutylsebacat

Die Weichmacher wurden in den Konzentrationen 1, 2, 5 und 10% mit dem PLGA 5050 DLFR1 vorgemischt, auf einem Ölbad (ca. 120°C) aufgeschmolzen, homogenisiert und anschließend analysiert. In Abbildung 4.3 sind die Glasübergangspunkte der Mischungen mit hydrophilen Weichmachern dargestellt. Da die Glasübergangstemperatur des Polymers nicht durch Zusatz von Glycerol und Sorbitol gesenkt wird, wird darauf geschlossen, dass keine Mischbarkeit mit PLGA vorliegt. Anders verhält es sich mit den Weichmachern PEG 400 und 4000. Beide verändern die Tg des PLGAs und weisen daher eine Mischbarkeit mit dem Polymer auf. Sie senken die Tg linear, wobei PEG 400 mit 2,6°C

pro Prozent Weichmacher im Gegensatz zu 2,2°C pro Prozent PEG 4000 eine leicht höhere Weichmacher-Effizienz aufweist (Tabelle 4.3). Eine stärkere Senkung der Tg von PLA durch PEG 400 im Vergleich zu höher molekularen PEGs wurde auch von Baiardo et al. (2003) beschrieben.

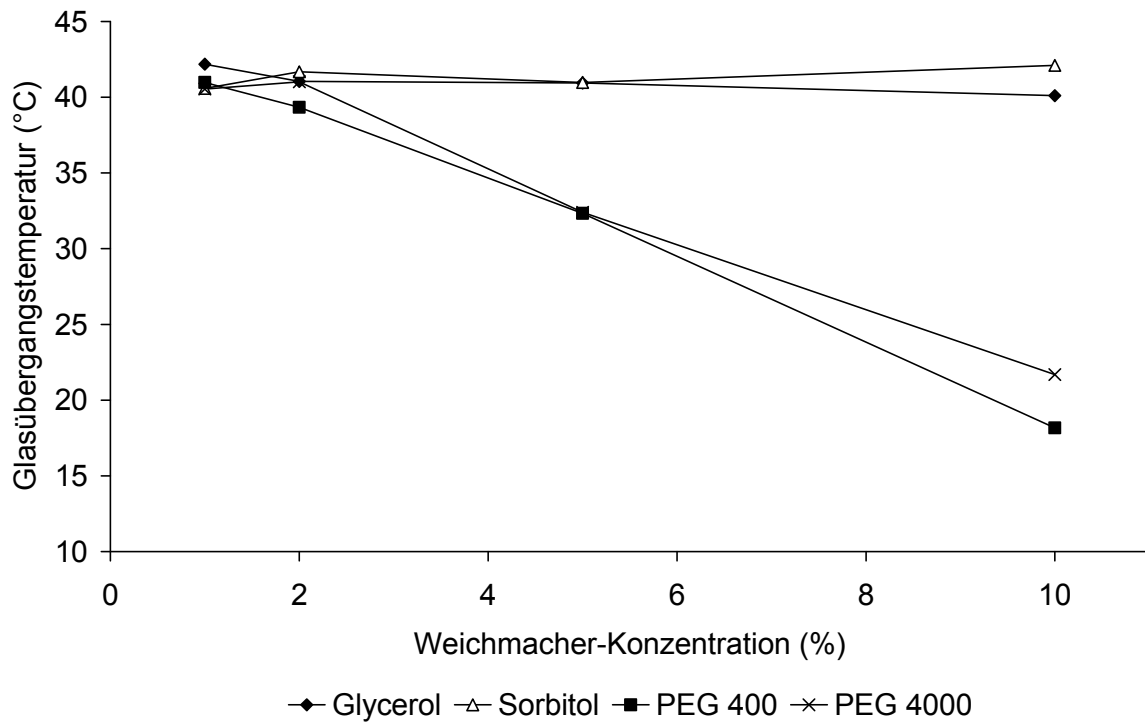


Abbildung 4.3: Glasübergangstemperaturen von PLGA in Gemischen mit hydrophilen Weichmachern mit steigenden Konzentrationen

Die vier lipophilen Weichmacher zeigen alle eine Erniedrigung der Tg und somit eine Mischbarkeit mit PLGA in den getesteten Konzentrationen, wobei allerdings Dibutylsebacat als einzige Ausnahme nur eine Senkung der Tg bis zu einen Weichmacheranteil von 5% aufweist (Abbildung 4.4). Tributylcitrat, Triethylcitrat und Glyceroltriacetat zeigen eine ähnliche Effizienz bei der Senkung der Tg, bei der diese um ca. 2,3 – 2,5°C pro Prozent Weichmacher erniedrigt wird (Tabelle 4.3). Insgesamt wird die Tg von PLGA von ca. 44°C des reinen Polymers auf ungefähr 20°C bei 10% Weichmacher gesenkt. Es zeigt sich folglich mit

Ausnahme von Dibutylsebacat eine gute Weichmachereffizienz und Kompatibilität der lipophilen Weichmacher mit PLGA.

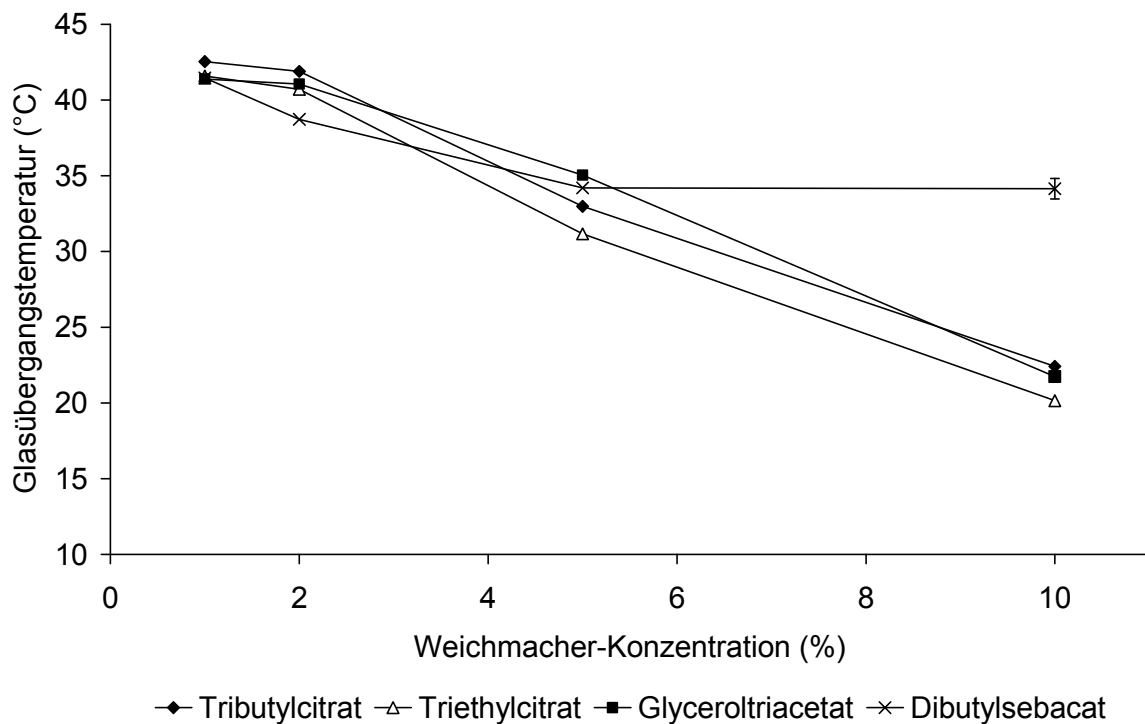


Abbildung 4.4: Glasübergangstemperaturen von PLGA in Gemischen mit lipophilen Weichmachern mit steigenden Konzentrationen

Die starke Senkung der Glasübergangstemperatur bei den hohen Weichmacher-Konzentrationen kann jedoch auch zu Problemen hinsichtlich der Lagerungsstabilität führen. Eine Kühlschranklagerung ist zwar für PLGA-Produkte obligatorisch, dennoch sollte die Glasübergangstemperatur des Endproduktes nicht zu niedrig sein, um Instabilitäten während der Lagerung zu vermeiden.

Anhand der Ergebnisse der DSC-Messungen wurde nun eine Vorauswahl an Weichmachern getroffen, um mit diesen Extrudate zu produzieren und auf ihr Freisetzungverhalten zu untersuchen. Dazu wurden die Weichmacher Polyethylenglykol 400 (PEG 400), Tributylcitrat (TBC) und Triethylcitrat (TEC) ausgewählt. Als Grundlage für die Auswahl diente zum einen die Weichmachereffizienz. Zum anderen sollten die Weichmacher bezüglich ihrer Hydrophilie/Lipophilie möglichst

unterschiedlich sein, um eventuelle Einflüsse durch die Hydrophilie des Weichmachers bei der Freisetzung besser beobachten zu können.

Tabelle 4.3: Effizienzen der Weichmacher zur Senkung der Tg von PLGA

Weichmacher	Senkung der Tg pro 1% Weichmacher (°C)	Bestimmtheitsmaß
Glycerol	- 0,19	0,7924
Sorbitol	0,12	0,4894
PEG 400	- 2,56	0,9952
PEG 4000	- 2,22	0,9843
Triethylcitrat	- 2,47	0,9913
Tributylcitrat	- 2,32	0,9914
Glyceroltriacetat	- 2,25	0,9827
Dibutylsebacat (0-5%)	- 1,74	0,9808

## 4.2 WEICHMACHEREINFLUSS AUF WIRKSTOFF-EXTRUDATE

Nachdem eine Vorauswahl an Weichmachern getroffen worden war, wurden die ersten Extrudate hergestellt. Anhand dieser Extrudate sollte zum einen eine Charakterisierung des vorliegenden Systems erfolgen. Zum anderen wurden die ersten Freisetzungsforschungen durchgeführt, um allgemein das Freisetzungsprofil aber auch eventuelle Effekte der Weichmacher auf die Freisetzung beobachten zu können. Um Einflüsse der Weichmacher bei der Arzneistoffquantifizierung ausschließen zu können, wurden zusätzlich Extrudate ohne Arzneistoff produziert. Diese wurden der gleichen Freisetzungsprozedur wie den arzneistoffhaltigen Extrudaten unterzogen und anschließend analysiert. Die Formulierungen wurden mit PLGA 5050 DLFR1 hergestellt und sind in Tabelle 4.4 aufgeführt. Zur Extrusion der Formulierungen ohne

Weichmacher wurden die Temperaturzonen des Einschneckenextruders auf 110°C, 110°C und 105°C eingestellt. Die Extrusion der restlichen Formulierungen erfolgte bei 100°C, 100°C und 95°C. Der Zusatz der Weichmacher hat somit eine Senkung der Extrusionstemperatur um 10°C ermöglicht.

Tabelle 4.4: Zusammensetzung der Formulierungen

Gentamicin-sulfat (%)	PEG 400 (%)	Tributylcitrat (%)	Triethylcitrat (%)
-	-	-	-
10	-	-	-
-	5	-	-
10	5	-	-
-	-	5	-
10	-	5	-
-	-	-	5
10	-	-	5

#### 4.2.1 CHARAKTERISIERUNG DER EXTRUDATE

Bei der Vorauswahl der Weichmacher wurden diese über einen einfachen Prozess mit der Matrix vermennt, indem sie in einem Becherglas in einem Ölbad aufgeschmolzen und anschließend manuell mit dem PLGA vermischt wurden. Die Homogenität der so entstandenen Mischungen ist jedoch eventuell nicht ausreichend, was sich auf die gemessenen Glasübergangstemperaturen auswirken kann. Um zu überprüfen, ob dieses Verfahren eine gute Vorhersage der Glasübergangstemperatur des Extrudats und somit der Extrusionstemperatur ermöglicht, wurden die Glasübergangstemperaturen der Extrudate mit denen der Proben aus den Vorversuchen verglichen (Abbildung 4.5).

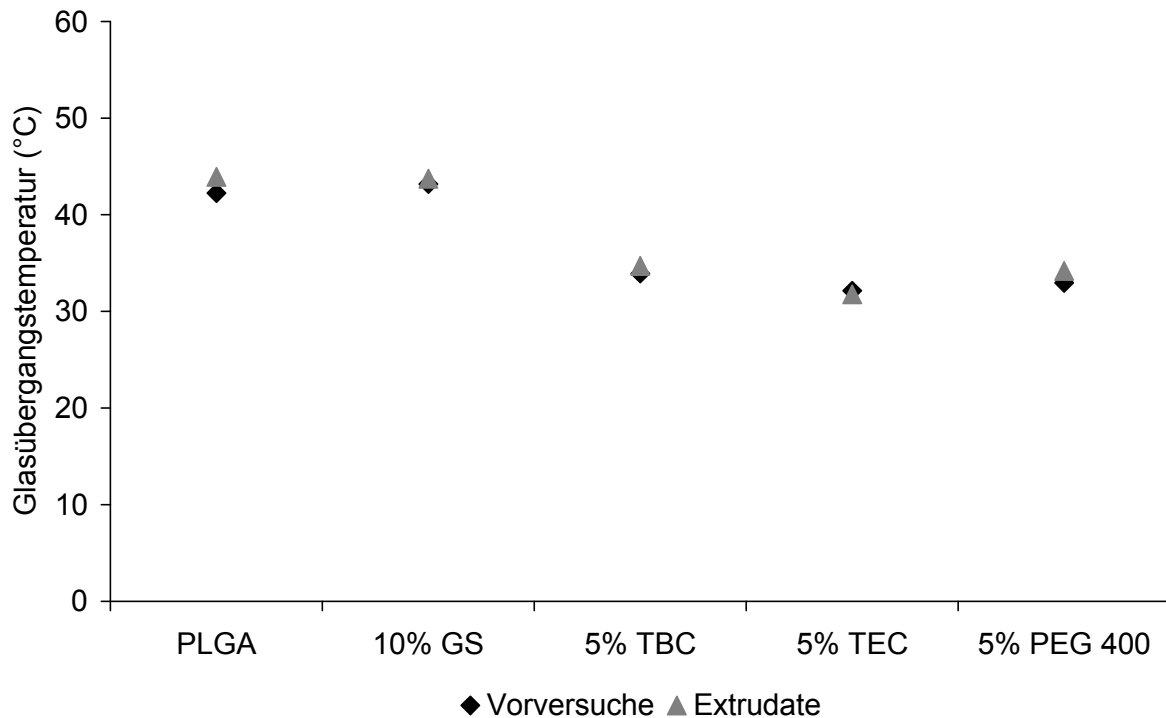


Abbildung 4.5: Vergleich der Glasübergangstemperaturen der Proben der Vorversuche und der Extrudate

Die Glasübergangstemperaturen der Extrudate und der Proben der Vorversuche weisen eine gute Übereinstimmung auf. Sie weichen maximal um 2°C voneinander ab. Es konnte damit gezeigt werden, dass mit der einfachen Becherglas-Methode eine gute Einarbeitung des Weichmachers in das Polymer und eine Vorhersage der Erniedrigung der Extrusionstemperatur möglich ist, da diese direkt von der Glasübergangstemperatur des Polymers abhängt.

Da insbesondere das PLGA sehr teuer ist, hat dieses Verfahren den entscheidenden Vorteil, dass nur sehr geringe Mengen der Bestandteile erforderlich sind. So wurden für die Becherglasmethode nur insgesamt 2 g pro Formulierung benötigt, während für die Extrusion mit dem Einschneckenextruder 40 – 50 g notwendig sind.

Nach der Schmelzextrusion der Arzneistoff-Polymer-Pulvermischung kann der Arzneistoff in drei verschiedenen Formen in einer amorphen Polymermatrix eingebettet vorliegen:

- Kristallin
- Amorph (zwei Phasen)
- Molekular dispergiert (gelöst)

Wenn der Arzneistoff kristallin in dem Polymer vorliegt, spricht man von einer Glassuspension (Tabelle 4.5). Dabei werden die Wirkstoffkristalle während des Extrusionsprozesses homogen in der Matrix verteilt und liegen somit thermodynamisch stabil vor. Ein solches System ermöglicht eine präzise Einstellung des Freisetzungsprofils aus der Arzneiform (Breitenbach, 2010). Eine amorphe Präzipitation liegt vor, wenn ein amorpher Arzneistoff in einem ebenfalls amorphen polymeren Träger eingebettet ist und dabei zwei Phasen entstehen. Bei der dritten Variante liegt der Arzneistoff molekular dispergiert in der Polymermatrix vor. Der Arzneistoff muss dazu in der Regel nicht geschmolzen werden, da er sich in dem erweichten Polymer löst. Neben diesen drei Systemen mit einem amorphen Träger, die durch Schmelzextrusion hergestellt werden können, sind in der Literatur auch disperse Systeme mit kristallinem Träger und amorphem oder kristallinem Arzneistoff beschrieben (Tabelle 4.5).

Die molekular disperse Verteilung eines Arzneistoffs in einem amorphen Träger stellt eine Möglichkeit dar, eine erhöhte Lösegeschwindigkeit von schwerlöslichen Wirkstoffen (BCS-Klasse II und IV) und somit eine verbesserte Bioverfügbarkeit zu erreichen (Serajuddin, 1999). Von den neu entwickelten Arzneistoffen weist ein immer größer werdender Anteil eine schlechte Wasserlöslichkeit auf, so dass diese durch klassische Arzneiformen zum Teil kaum bioverfügbar gemacht werden können. Die amorphe Einbettung des Arzneistoffs stellt somit neben beispielsweise



Lipidformulierungen oder Nanopartikeln einen vergleichsweise neuen, viel versprechenden Formulierungsansatz dar (Allhenn und Lamprecht, 2010). Problematisch bei dem Vorliegen eines gelösten Wirkstoffs kann dabei die Stabilität hinsichtlich möglicher Rekristallisation sein. Dies spielt insbesondere dann eine Rolle, wenn der Wirkstoff in dem Polymer kinetisch stabilisiert vorliegt. Die Tendenz des Arzneistoffs zur Rekristallisation hängt dabei von dessen Mobilität in der Matrix ab, die bei sinkender Glasübergangstemperatur des Polymers zunimmt (Hancock et al., 1995).

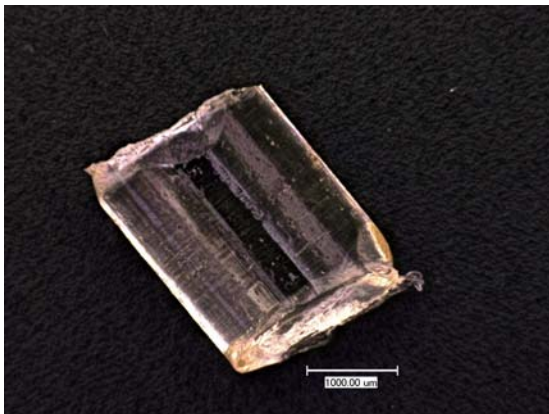
Wenn der Arzneistoff nicht übersättigt im Polymer gelöst ist, liegt ein thermodynamisch stabiles System vor, das sich durch eine außerordentlich gute Stabilität auszeichnet (Breitenbach, 2010).

Ein Beispiel für eine erfolgreiche Markteinführung eines Arzneimittels, bei dem die Arzneistoffe molekular dispergiert vorliegen, ist die Kaletra<sup>®</sup>-Tablette (Abbott Laboratories, Abbott Park, USA). Die beiden schwerlöslichen Wirkstoffe Lopinavir und Ritonavir zur Behandlung einer HIV-Infektion werden durch Schmelzextrusion in Copovidon gelöst. Die Arzneiform weist einige Produktvorteile, wie beispielsweise ein verbessertes Freisetzungsprofil und Unabhängigkeit der Einnahme von Mahlzeiten auf (Klein et al., 2007).

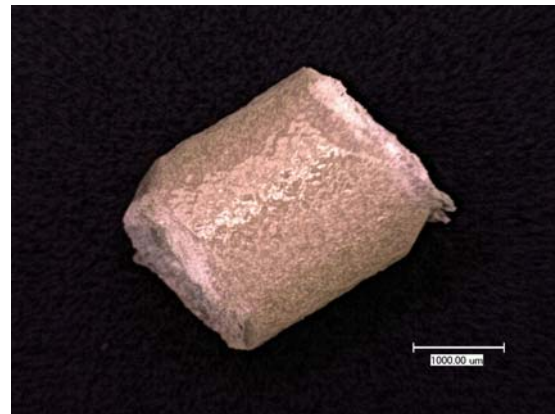
Tabelle 4.5: Einteilung von festen Dispersionen nach Breitenbach et al. (2003) und Chiou et al. (1971)

	Glaslösung	Feste Lösung	Eutektikum	Glas-suspension	Amorphe Präzipitation		Komplexe Mischung
					Kristalliner Träger	Amorpher Träger	
Phasen	1	1	2	2	2	2	1
Arzneistoff	molekular dispergiert	molekular dispergiert	kristallin	kristallin	amorph	amorph	amorph o. kristallin
Träger	amorph	kristallin	kristallin	amorph	kristallin	amorph	amorph o. kristallin

Zur Klassifizierung des dispersen Systems in den Extrudaten wurden diese mit Hilfe von bildgebenden Verfahren und Röntgendiffraktometrie genauer untersucht. Die hergestellten Extrudate weisen nach der Extrusion je nach Formulierung ein unterschiedliches Erscheinungsbild auf. So sind die Extrudate ohne Arzneistoffzusatz, d.h. entweder reines PLGA oder kombiniert mit 5% Weichmacher, durchsichtig und von leicht gelblicher Färbung (Abbildung 4.6). Die Extrudate mit 10% Gentamicinsulfatanteil sind dagegen opak und eher weiß-gelblich.



a) Extrudat mit 5% PEG 400

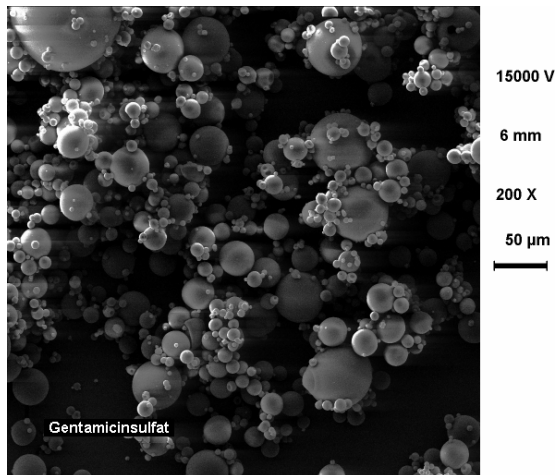


b) Extrudat mit 10% Gentamicinsulfat

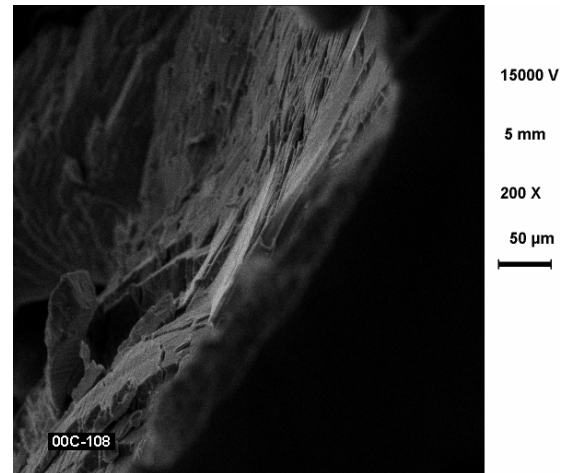
Abbildung 4.6: Extrudate a) ohne und b) mit Arzneistoff; Skala 1 mm

Da die Extrusion der Formulierungen mit Gentamicinsulfat nicht zu durchsichtigen Extrudaten führt, ist davon auszugehen, dass das Gentamicinsulfat nicht gelöst im PLGA vorliegt, sondern zwei Phasen nebeneinander auftreten. Diese Nicht-Mischbarkeit des Gentamicinsulfats mit PLGA wurde bereits in den DSC-Messungen gezeigt und wird auch durch die rasterelektronischen Aufnahmen bestätigt (Abbildung 4.7). Auf dem REM-Bild c) ist die Schnittfläche eines Extrudates mit inkorporiertem Gentamicinsulfat und zum Vergleich in Bild b) die Schnittfläche eines Extrudates ohne Gentamicinsulfat abgebildet. Deutlich sind die kleinen Gentamicinsulfat-Partikel in der Polymermatrix eingebettet erkennbar. An der Oberfläche der Extrudate sind die

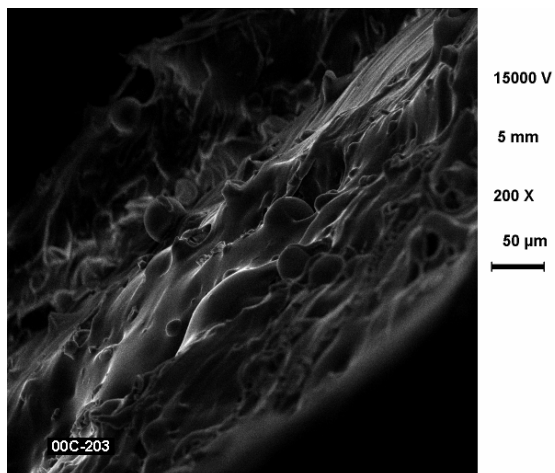
Arzneistoff-Partikel dagegen von einer Polymerschicht überzogen und liegen nicht frei (Bild d). Während des Extrusionsprozesses bildet sich am Zylindermantel und an der Grenzfläche zur Düse eine Gleitschicht des Polymers, die die Gentamicinsulfat-Partikel überzieht.



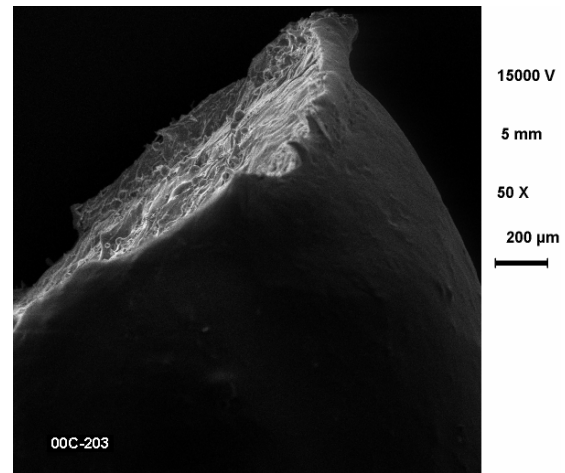
a) Gentamicinsulfat  
(200-fache Vergrößerung)



b) Schnittfläche eines Extrudatstückes  
ohne Gentamicinsulfat  
(200-fache Vergrößerung)



c) Schnittfläche eines Extrudatstückes  
mit Gentamicinsulfat  
(200-fache Vergrößerung)

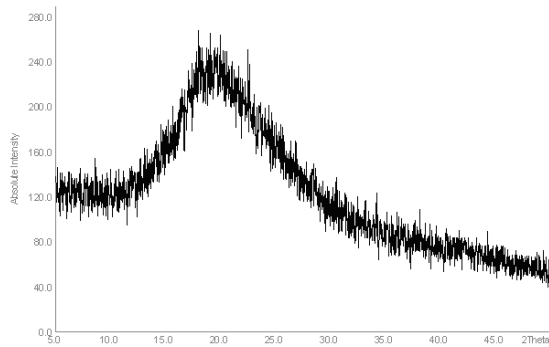


d) Schnitt- und Oberfläche eines  
Extrudatstückes mit Gentamicinsulfat  
(50-fache Vergrößerung)

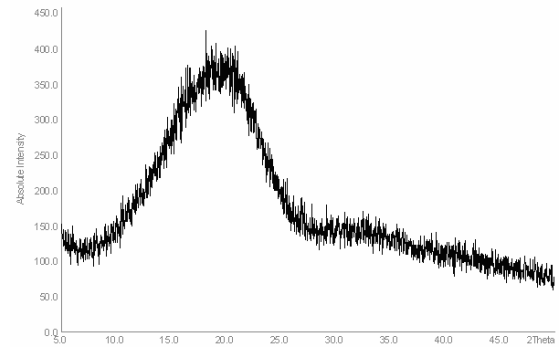
Abbildung 4.7: REM-Aufnahmen von Extrudatstücken

Nachdem nun eine molekular disperse Verteilung des Arzneistoffs ausgeschlossen werden konnte, wurde mit Hilfe der Röntgen-

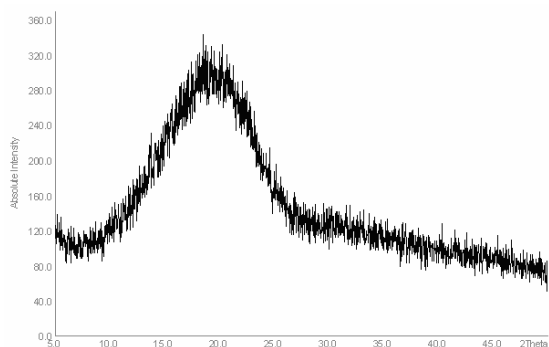
diffraktometrie untersucht, ob das Gentamicinsulfat in amorph oder in kristalliner (bzw. teilkristalliner) Form vorliegt. Dazu wurden der Arzneistoff, das reine PLGA und die Extrudate auf kristalline Strukturen untersucht (Abbildung 4.8).



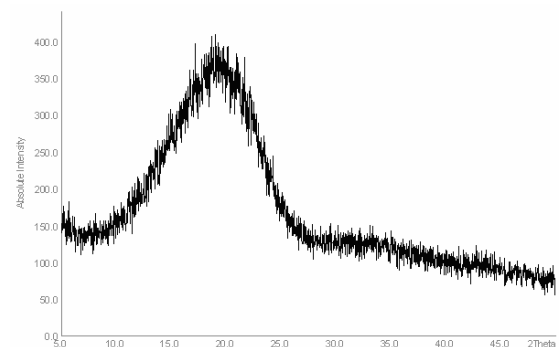
a) Gentamicinsulfat



b) PLGA



c) Extrudat mit 10% Gentamicinsulfat in PLGA



d) Extrudat mit 10% Gentamicinsulfat und 5% Tributylcitrat in PLGA

Abbildung 4.8: Röntgendiffraktogramme der Ausgangssubstanzen und beispielhaft von zwei unterschiedlichen extrudierten Formulierungen

Der Arzneistoff Gentamicin wird aus dem Fermentationsansatz durch Sprühtrocknung in eine Pulverform überführt und liegt aufgrund dessen amorph vor. Dies konnte bereits in der DSC-Kurve beobachtet werden (siehe Kapitel 4.1) und wird durch ein charakteristisches Halo ohne Röntgenreflexe im Röntgendiffraktogramm erneut bestätigt. Auch das PLGA zeigt wie in der Literatur beschrieben keine kristallinen Strukturen. Demnach sind die Copolymere aus D,L-Laktid und Glykolid bis zu einem Glykolidanteil von ca. 70% amorph, da die Monomere unregelmäßig in

der Polymerkette aufeinander folgen (Middleton und Tipton, 2000). Das Röntgendiffraktogramm der extrudierten Mischung von Gentamicinsulfat und PLGA zeigt keine Peaks, sondern nur das für amorphe Substanzen kennzeichnende Halo. Das Gentamicinsulfat liegt damit auch nach Erwärmen auf knapp 10°C oberhalb der eigenen Glasübergangstemperatur amorph im Polymer vor und kristallisiert beim Erkalten des Extrudates nicht aus. Durch den Zusatz der Weichmacher PEG 400, Tributylcitrat oder Triethylcitrat wurde ebenfalls keine Kristallisation des Arzneistoffs während der Schmelzextrusion hervorgerufen. Somit weisen die Röntgendiffraktogramme dieser extrudierten Formulierungen auch keine Röntgenreflexe auf. In Abbildung 4.8 ist beispielhaft das Röntgendiffraktogramm der extrudierten Formulierung mit dem Weichmacher Tributylcitrat dargestellt.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass das Gentamicinsulfat amorph als Partikel in der Polymermatrix eingebettet vorliegt. Bei diesem dispersen System handelt es sich demnach um eine amorphe innere Arzneistoffphase mit einem amorphen Träger (Tabelle 4.5). Da bereits das Gentamicinsulfat-Ausgangsmaterial stabil in amorpher Form vorliegt und keiner besonderen Lagerung hinsichtlich Temperatur oder Luftfeuchtigkeit zur Verhinderung einer Kristallisation bedarf und auch unter Stressbedingungen (Extrusion oberhalb der Tg) keine Kristallisation auftritt, kann von einer stabilen Formulierung ausgegangen werden.

### **4.2.2 IN VITRO FREISETZUNG**

Zur Beurteilung des in vitro Freisetzungsverhaltens der Extrudate wurden sowohl die arzneistoffhaltigen als auch die arzneistofffreien Formulierungen über 46 Tage in FreisetzungsmEDIUM inkubiert. Die Proben der arzneistofffreien Extrudate dienten dabei als Kontrolle, ob

Zersetzungsprodukte des PLGAs oder die Weichmacher bei der Arzneistoffquantifizierung durch die HPLC stören. Es konnten allerdings bei diesen Proben über den gesamten Zeitraum keine Signale in der HPLC detektiert werden. Die Freisetzungsverläufe der gentamicinsulfat-haltigen Extrudate sind in Abbildung 4.9 dargestellt.

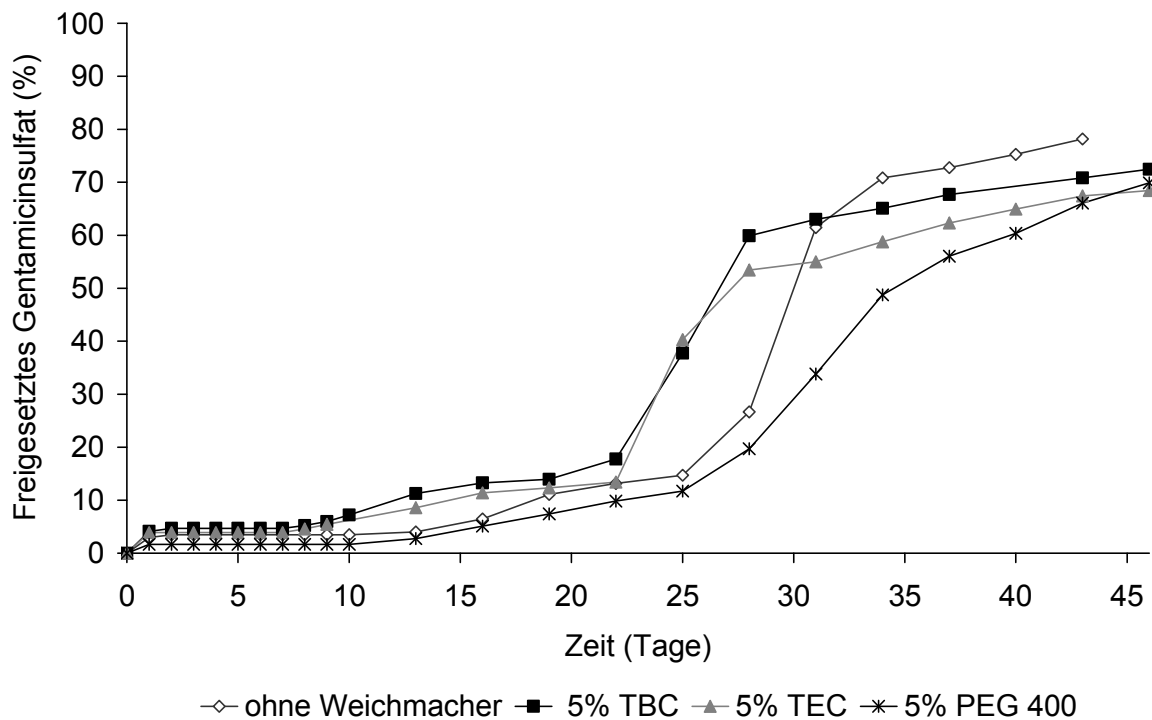


Abbildung 4.9: Freisetzungprofile der Formulierungen mit 10% Gentamicinsulfat

Zunächst fällt auf, dass alle Formulierungen ein sigmoides Freisetzungprofil aufweisen. Diese multiphasische Freisetzung ist typisch für monolithische Arzneiformen, die auf den Polymeren der Monomere Laktid und/oder Glykolid basieren. Die Freisetzung lässt sich dabei in drei Phasen einteilen (Zhang et al., 1994):

- Initiale (Burst-) Freisetzung der Partikel an der Oberfläche und durch Diffusion aus Poren
- Diffusion des Arzneistoffs durch das Polymer
- Freisetzung durch Erosion des Polymers

Diese Phasen finden sich auch sehr gut bei den Freisetzungsverläufen dieser Extrudate wieder. Bei der Burst-Freisetzung werden etwa 2-4%

des Wirkstoffs abgegeben, was wahrscheinlich der Menge an Gentamicinsulfat entspricht, die als Partikel an den Extrudat-Oberflächen freiliegen. Danach folgt eine relativ lange lag-Phase (Verzögerungsphase), bei der kein Arzneistoff freigesetzt wird. Erst nach ca. 8-10 Tagen findet wieder eine langsame Freisetzung durch Diffusion durch die Polymermatrix statt. Nach dieser zweiten Phase folgt die Freisetzung durch Erosion, die bei den Formulierungen mit Tributylcitrat und Triethylcitrat ca. 3-6 Tage früher beginnt als bei den anderen zwei Chargen. Diese Phase ist gekennzeichnet durch eine beschleunigte Freisetzung, die durch die Bulk-Degradation des PLGAs bedingt wird (Gopferich, 1996). Dabei diffundiert Wasser in die Extrudate, so dass im gesamten System ein Polymerabbau stattfindet. Jedoch können die größeren Polymerstücke zunächst nicht aus der Arzneiform heraus diffundieren, was aufgrund der Carboxylendgruppen der Bruchstücke eine Ansäuerung im Inneren verursacht. Die Senkung des pH-Wertes führt wiederum zu einer Autokatalyse, wodurch die Degradation im Inneren schneller fortschreitet. Ist eine kritische Schwelle überschritten und die Polymerbruchstücke können der Matrix entweichen, führt dies zur Erosion und so auch zu einem Anstieg der Arzneistoffliberation.

Die Formulierungen mit den Weichmachern Tributylcitrat und Triethylcitrat unterscheiden sich in ihrem Freisetzungsverlauf nicht. Die Charge mit Tributylcitrat setzt ungefähr 4% mehr Arzneistoff frei. Deutlichere Unterschiede sind zu den anderen zwei Formulierungen (ohne Weichmacher und mit 5% PEG 400) erkennbar. Diese setzten schon in der zweiten Freisetzungsphase weniger Wirkstoff frei und auch die Freisetzung durch Erosion setzt später nach 25 Tagen ein. In der dritten Freisetzungsphase unterscheiden sich die beiden Formulierungen in ihrer Intensität. Die Formulierung ohne Weichmacher setzt nach 28 Tagen näherungsweise 30% des insgesamt enthaltenen Gentamicin-

sulfats frei, während bei der Formulierung mit 5% PEG 400 der Wirkstoff etwas langsamer und gleichmäßiger freigesetzt wird.

Alle Formulierungen weisen einen sigmoiden Freisetzungsverlauf mit einer langen lag-Phase auf, die aufgrund der fehlenden Arzneistoff-liberation reduziert bzw. entfernt werden muss. Die Profile unterscheiden sich hauptsächlich im zeitlich versetzten Beginn der dritten Freisetzungsphase, wobei sie bei den Formulierungen mit den lipophileren Weichmachern (Tributylcitrat und Triethylcitrat) etwas früher einsetzt. Gründe für die unterschiedlichen Freisetzungsverläufe werden in den folgenden Kapiteln diskutiert.

#### **4.3 MODIFIZIERUNG DES FREISETZUNGSPROFILS**

Für die Behandlung von Osteomyelitis ist es erforderlich, dass schon gleich nach dem Débridement und dem Einsetzen der Implantate Antibiotikum freigesetzt wird und somit die Bakterien im eventuell verbliebenen infizierten Gewebe abgetötet werden. Aus diesem Grund war zunächst das oberste Ziel, die lange Verzögerungsphase zu verkürzen, so dass eine optimale Bekämpfung des Infektionsherdes erfolgen kann.

Um dies zu erreichen, wurden verschiedene Ansätze verfolgt. Zunächst wurde die Gentamicinsulfat-Konzentration angehoben, um die Porosität der Extrudate zu erhöhen. Gentamicinsulfat ist sehr gut wasserlöslich, so dass sich der am Rand befindliche Arzneistoff sofort herauslöst. Die dadurch entstehenden Poren lassen wiederum Wasser eindringen, und das Polymer wird schneller hydrolytisch abgebaut.

So konnten beispielsweise Zhang et al. (1994) bei schmelzextrudierten Zylindern basierend auf Polylaktid eine höhere Gentamicinsulfat-Freisetzungsrate bei zunehmender Wirkstoff-Konzentration beobachten. Auch der Zusatz eines Weichmachers kann das Freisetzungsprofil des



Wirkstoffs beeinflussen. So zeigten Andrews et al. (2008), dass bei schmelzextrudierten Zylindern aus Eudragit® L100-55 mit steigender Triethylcitrat-Konzentration der Arzneistoff schneller freigesetzt wird. Ähnliches wiesen auch Zhu et al. (2006) bei Schmelzextrudaten auf der Basis von Eudragit® RS 30D und dem Weichmacher Triethylcitrat bei den hydrophilen Arzneistoffen Dilitazem-HCl und Chlorphenaminmaleat nach. Mit zunehmender Weichmacher-Konzentration stiegen die Freisetzungsraten der Wirkstoffe. Bei dem hydrophoben Arzneistoff Indomethacin zeigte der Zusatz des Weichmachers jedoch keinen Einfluss. Pietro et al. (2006) untersuchten den Einfluss von Triethylcitrat auf das Degradationsverhalten von PLGA-Membranen. Die Inkorporation von 7% Weichmacher beschleunigte den Polymerabbau. Da in den Membranen allerdings kein Arzneistoff enthalten war, lässt sich nur annehmen, dass dieser durch diesen Effekt schneller freigesetzt worden wäre. Die Arbeitsgruppe um Naraharisetti et al. (2005) versuchte durch Zusatz von Polyethylenglykolen mit zwei verschiedenen Molekulargewichten, die Verzögerungsphase von PLGA-Presslingen aus Mikropartikeln beladen mit Gentamicin zu reduzieren. Durch Zusatz des Weichmachers wurde gleichwohl nur die initial freigesetzte Wirkstoffmenge erhöht, auf das Freisetzungsprofil hatte das PEG keinen Effekt. Ob ein Weichmacher einen Einfluss auf das Freisetzungsprofil hat, hängt somit sowohl von den Eigenschaften des Wirkstoffs als auch von dem des Polymers und des Weichmachers ab.

In den Vorversuchen (Kapitel 4.2.2) konnte bereits während der zweiten Freisetzungsphase eine leicht höhere Wirkstofffreisetzung und ein früheres Einsetzen der Erosionsphase durch den Zusatz von Tributylcitrat und Triethylcitrat beobachtet werden. Dies ließ die Vermutung zu, dass ein Weichmacher-Zusatz zu einer Verkürzung der lag-Phase führt. In den folgenden Versuchsreihen wurde nun unter anderem der Einfluss

höherer Weichmacher-Konzentrationen getestet. Da sich in den Vorversuchen zwischen den Weichmachern Tributylcitrat und Triethylcitrat keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Erniedrigung der Glasübergangstemperatur und des Freisetzungsverhaltens gezeigt hatten, wurde eine weitere Auswahl getroffen. Die folgenden Untersuchungen wurden nur noch mit den Weichmachern Tributylcitrat und PEG 400 durchgeführt.

Zuletzt wurde noch das verwendete PLGA gegen eine hydrophilere Qualität getauscht, um eine schnellere Diffusion des Freisetzungsmediums in die Extrudate zu ermöglichen.

#### **4.3.1 EINFLUSS DER PLGA-QUALITÄT AUF DAS FREISETZUNGSPROFIL**

Zur Verkürzung der langen lag-Phase wurde das relativ hydrophobe 50,50 D,L-PLGA durch ein hydrophileres PLGA ersetzt. Das Resomer<sup>®</sup> RG 503 H besitzt anstelle des hydrophoben Laurylestere am Ende der Polymerketten eine Carboxylgruppe, wodurch das Freisetzungsmedium leichter in die Extrudate eindringen kann und somit eine verstärkte Arzneistoffdiffusion ermöglicht. Dementsprechend werden die lag-Phasen stark verkürzt (Abbildung 4.10). Bei den Formulierungen ohne Weichmacher und mit 5% PEG 400 werden die Verzögerungsphasen von ungefähr 13 auf 7 Tage reduziert und bei dem Ansatz mit 5% Tributylcitrat von 7 auf 4 Tage. Das restliche Freisetzungsprofil wird dagegen durch die hydrophilere Polymermatrix bis auf die Linksverschiebung durch die kürzere lag-Phase nur geringfügig beeinflusst. Die Formulierungen auf der Basis von Resomer<sup>®</sup> RG 503 H setzten zwar insgesamt ungefähr 20% mehr Arzneistoff frei, aber der Verlauf der Kurven ist vergleichbar. So wird auch hier aus der Formulierung mit 5% Tributylcitrat während der Freisetzungsphase durch Diffusion mehr Arzneistoff freigesetzt als bei den anderen beiden

Formulierungen und die Erosionsphase setzt ebenfalls früher ein. Lediglich der Ansatz ohne Weichmacher zeigt in der dritten Freisetzungphase einen etwas geringer ausgeprägten Anstieg in der Freisetzung.

Eine mögliche Ursache für die insgesamt geringer freigesetzte Menge Arzneistoff aus den Formulierungen mit PLGA 5050 DLFR1 ist darin zu sehen, dass die Freisetzung des Gentamicinsulfats aus den Extrudaten bei Beendigung der Freisetzungsstudie nach 46 Tagen noch nicht komplett abgeschlossen war.

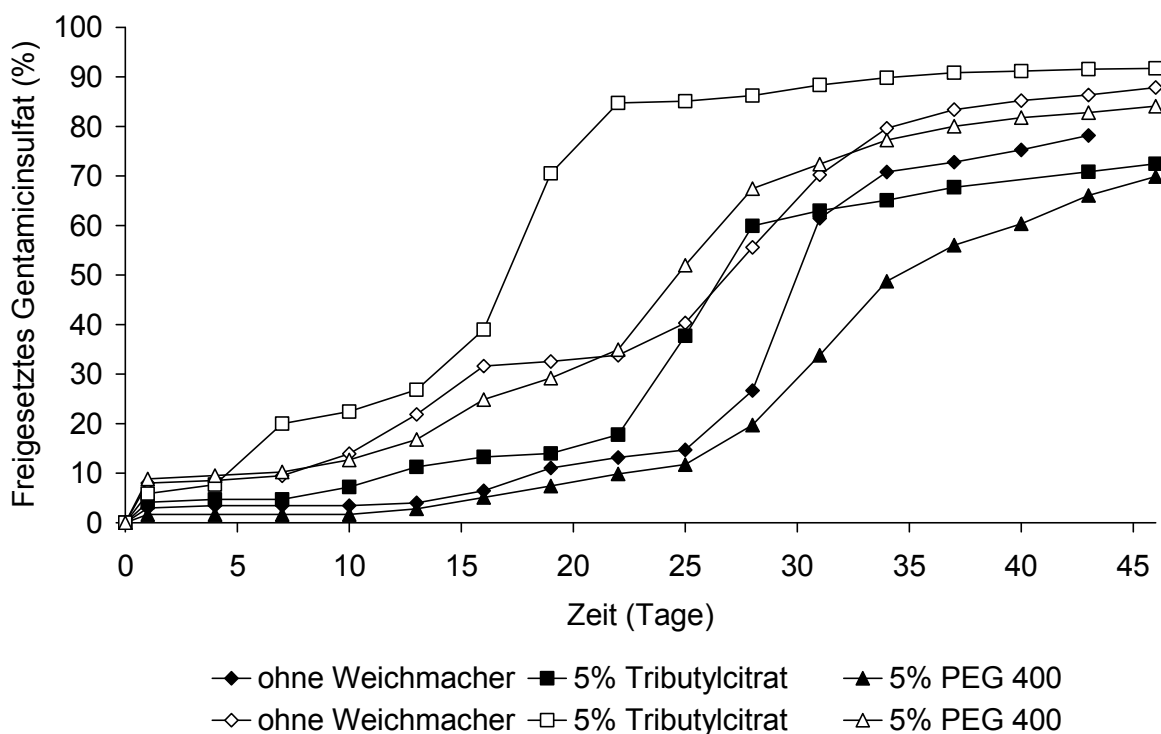


Abbildung 4.10: Einfluss der PLGA-Qualität auf das Freisetzungsprofil; Extrudate enthalten 10% Gentamicinsulfat; Kurven mit nicht ausgefüllten Symbolen wurden mit Resomer® RG 503 H hergestellt

#### 4.3.2 EXTRUDATE MIT DEM WEICHMACHER TRIBUTYLCITRAT

In der folgenden Versuchsreihe wurde der Einfluss unterschiedlicher Konzentrationen von Gentamicinsulfat und Tributylcitrat auf das Freisetzungsprofil untersucht. Die Zusammensetzungen der Formu-

lierungen sind zur Übersicht in Tabelle 4.6 zusammengefasst. Die Extrudate wurden mit dem Einschneckenextruder hergestellt.

Tabelle 4.6: Zusammensetzung der Formulierungen, Angaben in %

Gentamicinsulfat	Tributylcitrat	Resomer® RG 503 H
10	0	90
10	5	85
10	10	80
10	20	70
15	0	85
15	5	80
15	10	75
15	20	65
20	0	80
20	5	75
20	10	70
20	20	60

#### 4.3.2.1 GLASÜBERGANGS- UND EXTRUSIONSTEMPERATUREN

Der Zusatz von Tributylcitrat senkt die Glasübergangstemperatur von PLGA linear bis zu einer Konzentration von 10% von 44°C auf etwa 24°C (siehe auch Kapitel 4.1). In dieser Versuchsreihe wurde zusätzlich eine Formulierung mit 20% Weichmacher untersucht (Tabelle 4.6). Die Glasübergangstemperaturen der Formulierungen sind in Abbildung 4.11 dargestellt. Zunächst wird erneut deutlich, dass das Gentamicinsulfat keinen Einfluss auf die Tg des PLGAs hat. Das Tributylcitrat zeigt bei Resomer® RG 503 H den gleichen Effekt wie bei dem in den Vorversuchen (Kapitel 4.1) verwendeten PLGA 5050 DLFR1. Auch hier ist die gleiche Erniedrigung der Tg bis zu einer Konzentration von 10% auf etwa 24°C gegeben. Eine weitere Erhöhung des Weichmacheranteils auf 20% führt allerdings zu keiner zusätzlichen Senkung der Tg.

Vermutlich sind bereits mit 10% Tributylcitrat die Interaktionspunkte des Polymers mit Weichmachermolekülen abgesättigt, so dass eine weitere Erhöhung der Konzentration keinen Effekt auf die Tg hat. Außerdem liegt Tributylcitrat wahrscheinlich bei einem Anteil von 20% nicht mehr molekulardispers im Polymer vor, sondern bildet neben dem Gentamicinsulfat und dem PLGA eine dritte Phase aus.

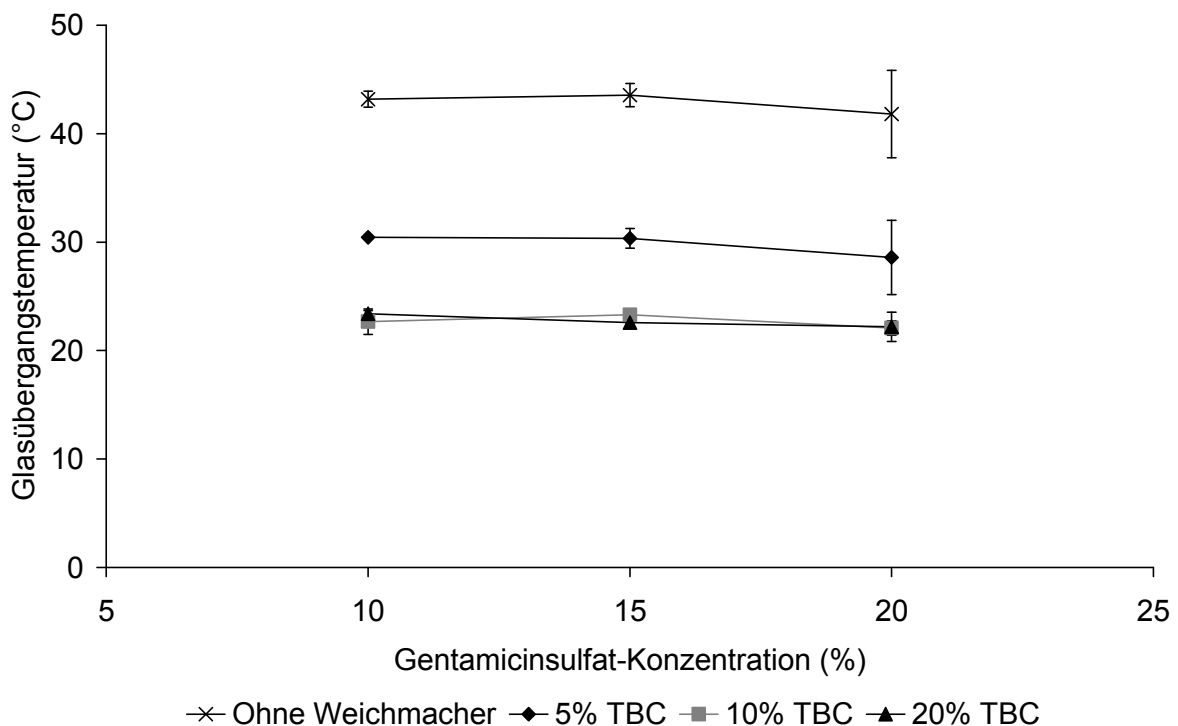


Abbildung 4.11: Glasübergangstemperaturen der Formulierungen mit steigender Gentamicinsulfat-Konzentration

In Abbildung 4.12 sind die Glasübergangstemperaturen der Formulierungen und die maximale Extrusionstemperatur in Abhängigkeit von der Weichmacher-Konzentration dargestellt. Die maximale Extrusionstemperatur war jeweils bei den Formulierungen mit der gleichen Weichmacher-Konzentration identisch und entspricht der Temperatur der wärmsten Temperaturzone. Dabei konnte die Extrusionstemperatur der Mischungen in einem ähnlichen Verhältnis wie die Glasübergangstemperaturen des PLGAs gesenkt werden. Die

Formulierungen ohne Weichmacher wurden bei einer Maximaltemperatur von 110°C extrudiert, während diese bei einem Weichmacheranteil von 10% und 20% bis auf 95°C gesenkt werden konnte.

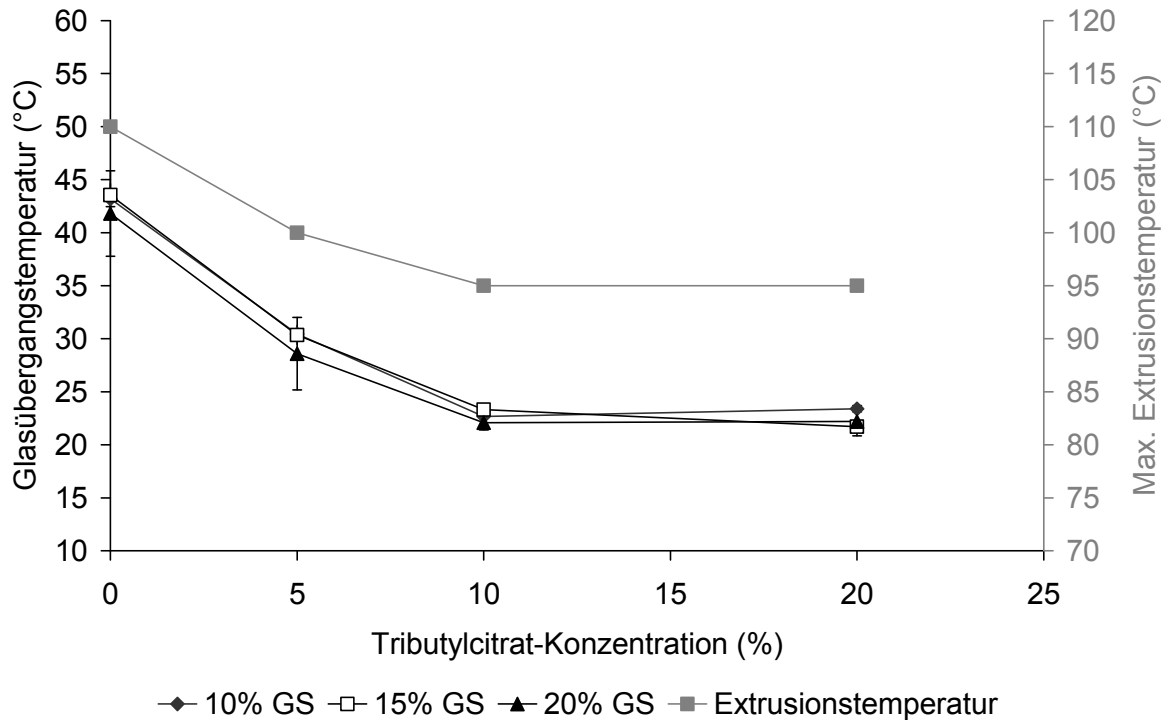


Abbildung 4.12: Glasübergangs- und Extrusionstemperaturen mit steigender Weichmacher-Konzentration

#### 4.3.2.2 FREISETZUNG AUS DEN TRIBUTYLCITRAT-FORMULIERUNGEN

Es wurde bei den Freisetzungstudien der Formulierungen mit dem Weichmacher Tributylcitrat der Einfluss der Arzneistoff- und der Weichmacher-Konzentration untersucht. Abbildung 4.13 mit den Freisetzungsverläufen der Formulierungen mit 10% Gentamicinsulfat ist vordergründig zu entnehmen, dass sich der Verlauf ohne Weichmacher deutlich von denen mit Tributylcitrat unterscheidet. Der Wirkstoff wird über einen längeren Zeitraum von etwa 40 Tagen im Vergleich zu circa 20 Tagen bei den weichmacherhaltigen Extrudaten freigesetzt. Die Kurve lässt den bereits in Kapitel 4.2.2 beschriebenen typischen Verlauf mit der Burstfreisetzung und den zwei folgenden Phasen erkennen, in

der zuerst die Diffusion und dann die Erosion dominiert. Der initialen Freisetzung, bei der circa 8% Gentamicinsulfat freigesetzt werden, folgt die zweite Phase, bei der die Diffusion die vorrangige Rolle spielt. Gentamicinsulfat ist sehr gut wasserlöslich, so dass durch das Herauslösen der Arzneistoffpartikel Poren entstehen, die eine Quellung der Extrudate fördern und beschleunigen. Dementsprechend begünstigt dies gleichermaßen die Polymerdegradation. Der Effekt wird mit steigendem Gentamicinsulfat-Anteil verstärkt (Abbildung 4.14 und Abbildung 4.15). Während dieser Phase wird Gentamicinsulfat durch Diffusion wie aus einer nicht-erodierenden Matrix freigesetzt. Durch die Zunahme des Diffusionsweges kommt es zu einer Verlangsamung der Freisetzungsgeschwindigkeit nach ca. 16 Tagen und somit zum Auftreten einer zweiten lag-Phase. Die dritte Phase weist aufgrund der Erosion wieder eine höhere Freisetzungsgeschwindigkeit auf.

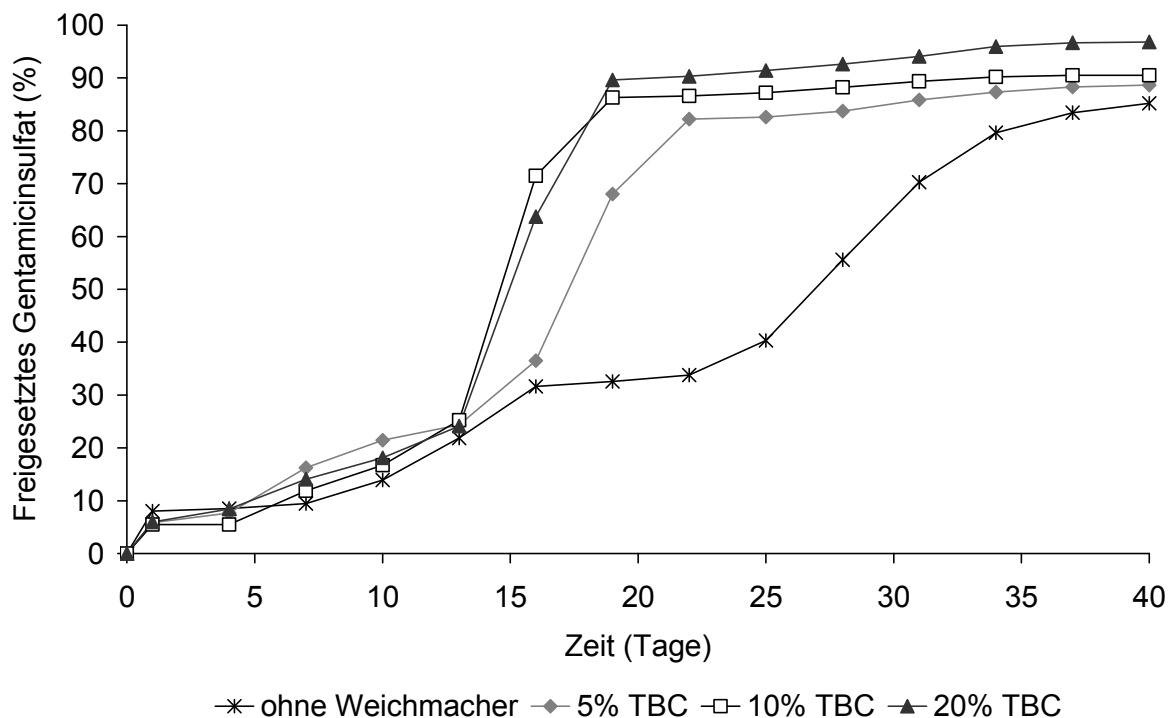


Abbildung 4.13: Freisetzungverläufe der Formulierungen mit 10% Gentamicinsulfat und steigender Tributylcitrat-Konzentration

Die Dauer der zweiten Phase wird nicht nur durch eine höhere Gentamicinsulfat-Konzentration verkürzt, sondern auch durch Zusatz des Weichmachers Tributylcitrat. So lässt sich bei den Formulierungen mit dem Weichmacher nur bei der geringsten Konzentration (5%) kombiniert mit der niedrigsten Gentamicinsulfat-Konzentration (10%) noch eine leichte zweite lag-Phase nach etwa zehn Tagen erkennen. Bei höheren Konzentrationen sowohl des Tributylcitrats als auch des Arzneistoffes verschwindet sie gänzlich.

Man kann weiterhin in Abbildung 4.13 erkennen, dass die Freisetzungsgeschwindigkeit durch Zugabe des Weichmachers bis zu einer Konzentration von 10% zunimmt. Die Erhöhung des Tributylcitrat-Anteils auf 20% hat keinen weiteren Einfluss auf das Profil; die Kurven mit 10% und 20% Weichmacher unterscheiden sich nicht signifikant. Begründet werden können diese Verläufe damit, dass Tributylcitrat sich zwischen die Polymerketten legt, diese separiert und die intermolekulare Kräfte senkt. Dadurch kann Wasser leichter in die Extrudate eindringen. Die höhere Mobilität hervorgerufen durch die Senkung der Glasübergangstemperatur und die damit erniedrigte Starrheit der Netzstruktur der Polymermatrix erleichtert die Diffusion sowohl des Wassers als auch des Arzneistoffs (Andrews et al., 2008). Da allerdings die Erhöhung des Weichmacheranteils von 10% auf 20% die Tg von PLGA nicht weiter senkt (siehe Kapitel 4.3.2.1), wird auch die Freisetzungsgeschwindigkeit nicht beeinflusst.



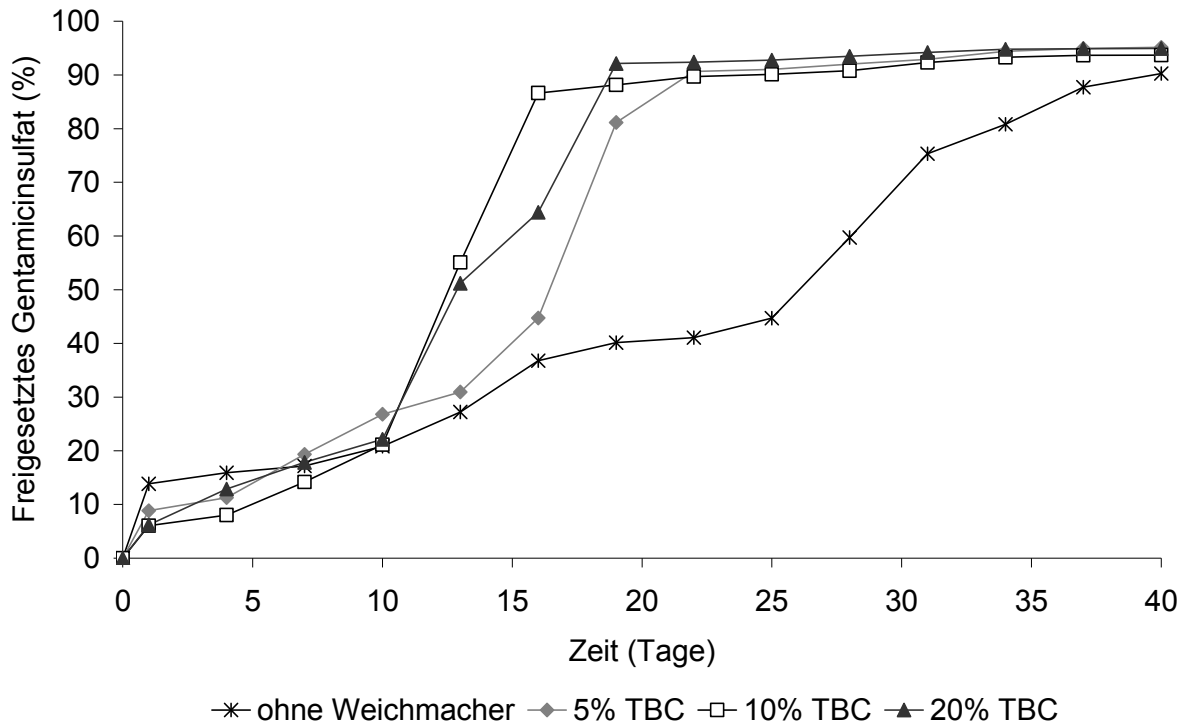


Abbildung 4.14: Freisetzungverläufe der Formulierungen mit 15% Gentamicinsulfat und steigender Tributylcitrat-Konzentration

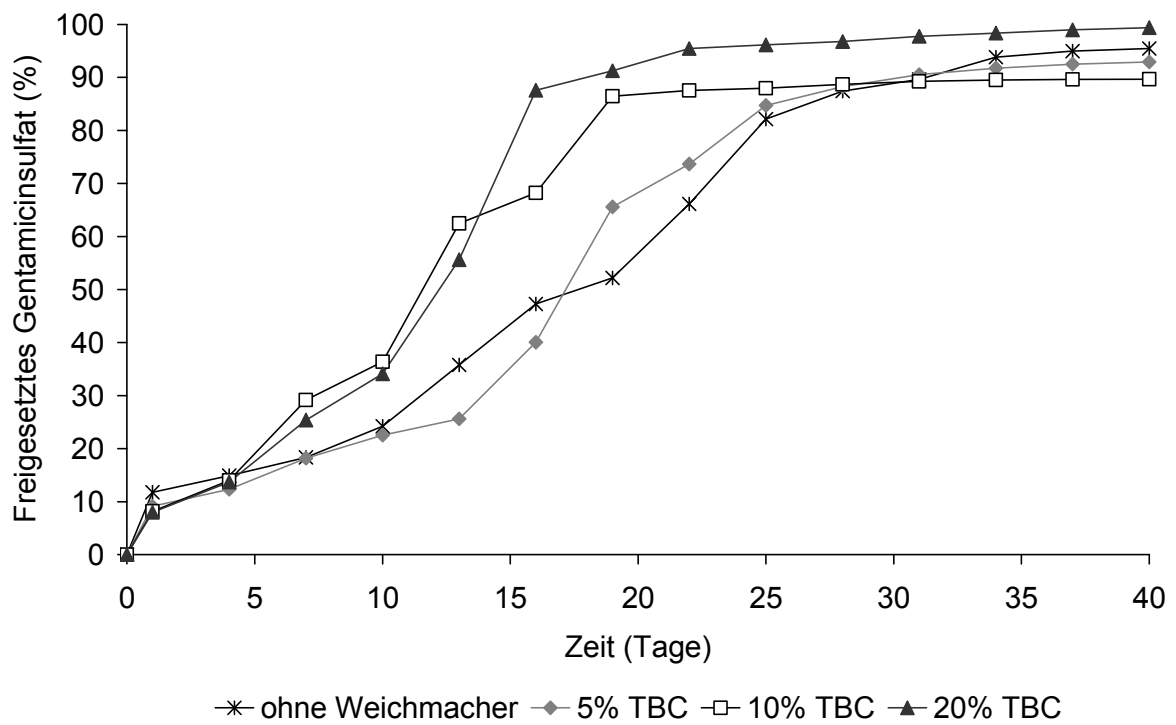


Abbildung 4.15: Freisetzungverläufe der Formulierungen mit 20% Gentamicinsulfat und steigender Tributylcitrat-Konzentration

Bei den Formulierungen mit 20% Gentamicinsulfat, dargestellt in Abbildung 4.15, kann darüber hinaus beobachtet werden, dass sich die Formulierung mit 5% Weichmacher in ihrem Freigabeverlauf kaum von der ohne Weichmacher unterscheidet. Vermutlich wird die Wirkung des Tributylcitrats durch die Porenbildung von Gentamicinsulfat überlagert. Erst bei den höheren Konzentrationen von 10% und 20% kommt die Wirkung des Weichmachers wieder zum Tragen. Betrachtet man des Weiteren in dieser Graphik den Freisetzungverlauf der Formulierung mit 10% Tributylcitrat über die ersten 19 Tage, lässt sich näherungsweise eine Freisetzung nullter Ordnung mit einem Bestimmtheitsmaß von 0,9815 feststellen.

Es hat sich somit gezeigt, dass sich sowohl durch die Gentamicinsulfat- als auch durch die Tributylcitrat-Konzentration das Freisetzungsprofil der PLGA-Extrudate beeinflussen lässt. Dabei erhöht Gentamicinsulfat durch herausgelöste Partikel vorrangig die Porosität, während der Weichmacher die Flexibilität in der Polymermatrix steigert und folglich die Diffusion innerhalb des Extrudates erleichtert. Außerdem war mit der Zusammensetzung 20% Gentamicinsulfat und 10% Tributylcitrat eine gleichmäßige Arzneistoffliberation aus den Extrudaten möglich. Die Freisetzung fand allerdings nur über einen Zeitraum von 19 Tagen statt, während für die Behandlung der Osteomyelitis ein etwas längerer Zeitraum von 3 bis 6 Wochen wünschenswert wäre (Ambrose et al., 2003).

#### **4.3.3 EXTRUDATE MIT DEM WEICHMACHER PEG 400**

Wie in Kapitel 4.1 beschrieben, hat auch der hydrophile Weichmacher PEG 400 eine gute Weichmachereffizienz bezüglich PLGA. In der folgenden Versuchsreihe wurde nun der Einfluss der PEG 400-Konzentration auf das Freisetzungsverhalten der Extrudate untersucht.

Die eingesetzten Konzentrationen von Gentamicinsulfat und PEG 400 mit den resultierenden PLGA-Anteilen sind in Tabelle 4.7 aufgeführt.

Tabelle 4.7: Zusammensetzung der Formulierungen; Angaben in %

Gentamicinsulfat	PEG 400	PLGA
10	0	90
10	5	85
10	10	80
10	20	70
15	0	85
15	5	80
15	10	75
15	20	65
20	0	80
20	5	75
20	10	70
20	20	60
30	0	70
30	5	65
30	10	60
30	20	50
40	0	60
40	5	55
40	10	50
40	20	40

## 4.3.3.1 GLASÜBERGANGS- UND EXTRUSIONSTEMPERATUREN

Durch den Zusatz von PEG 400 zu den Pulvermischungen wird die Glasübergangstemperatur des PLGAs deutlich gesenkt (Abbildung 4.16 und Abbildung 4.17).

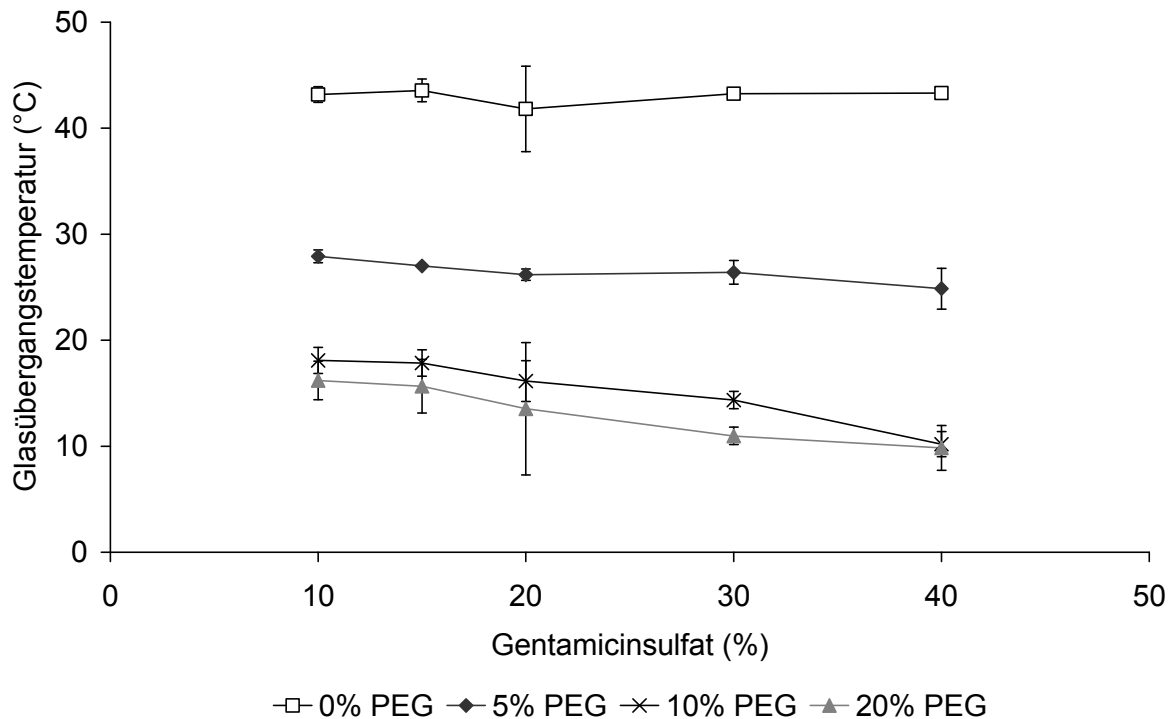


Abbildung 4.16: Glasübergangstemperaturen der Formulierungen mit steigender Gentamicinsulfat-Konzentration

Dabei weist PEG 400 eine höhere Weichmachereffizienz als Tributylcitrat auf. Während die Glasübergangstemperaturen der Formulierungen mit 10% und 20% Tributylcitrat auf knapp über 20°C gesenkt wurden, weisen die Formulierungen mit 10% und 20% PEG 400 deutlich eine Tg unter 20°C auf. Es kann außerdem beobachtet werden, dass die Erhöhung der Konzentration von PEG 400 von 10% auf 20% eine weitere leichte Senkung der Tg hervorruft, während dies bei den Formulierungen mit Tributylcitrat nicht der Fall war. Die Senkung der Tg ist allerdings nur bis zu 10% linear, die weitere Erhöhung des Weichmacheranteils bewirkt nur eine Senkung um 2-3°C. Es scheint somit, dass nicht die gesamten 20% PEG 400 mit PLGA mischbar sind,

sondern nur ein Prozentsatz zwischen 10% und 20%. Betrachtet man die Glasübergangstemperaturen der Formulierungen ohne Weichmacher, zeigt sich erneut, dass das Gentamicinsulfat keinen Einfluss auf die Tg besitzt. Bei den Glasübergangstemperaturen der Formulierungen mit PEG 400 fällt jedoch auf, dass mit Zunahme der Arzneistoffkonzentration auch eine Senkung der Tg auftritt. Im Falle der Formulierungen mit 10% und 20% PEG 400 beträgt die Senkung insgesamt 8°C beziehungsweise 6°C. Als Begründung kann die geringe verbleibende Menge an PLGA bei den hohen Konzentrationen an PEG 400 und Gentamicinsulfat herangezogen werden. Zum einen können die Polymerketten deshalb weniger intermolekulare Bindungen ausbilden und zum anderen sinkt mit steigender Gentamicinsulfat-Konzentration der PLGA-Anteil, da die einzelnen Komponenten in der Formulierung immer zusammen 100% ergeben. Aufgrund dessen liegt im Verhältnis eine höhere PEG 400-Konzentration vor, was zu einer stärkeren Erniedrigung der Tg führt.

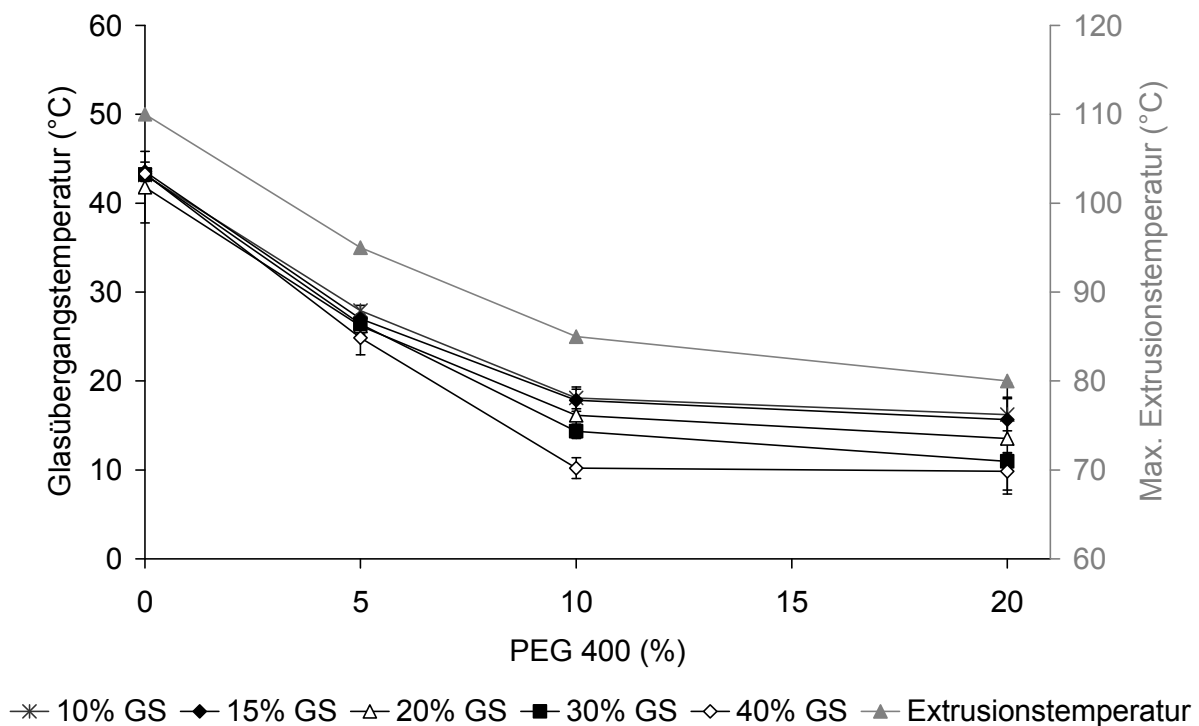


Abbildung 4.17: Glasübergangs- und Extrusionstemperaturen mit steigender PEG 400-Konzentration

Entsprechend der Senkung der Tg des PLGAs war die Extrusion bei niedrigeren Temperaturen möglich. So konnte diese von 110°C bei Formulierungen ohne Weichmacher auf 80°C bei 20% PEG 400 gesenkt werden.

#### 4.3.3.2 FREISETZUNG AUS DEN PEG 400-FORMULIERUNGEN

Zur Bewertung der Freisetzungseigenschaften der Extrudate mit dem hydrophilen Weichmacher PEG 400 bietet es sich an, zunächst die Form der Freisetzungprofile nach der Burst-Freisetzung zu betrachten. Die Profile lassen sich dazu als sigmoid, linear oder als exponentielle Annäherung beschreiben. Die Formulierungen mit einem Arzneistoff-Gehalt von 10% weisen ebenso einen sigmoiden Verlauf auf, wie die Zusammensetzung mit 15% und 20% Gentamicinsulfat in Kombination mit 0%, 5% und 10% PEG 400 (Abbildung 4.18 bis Abbildung 4.20).

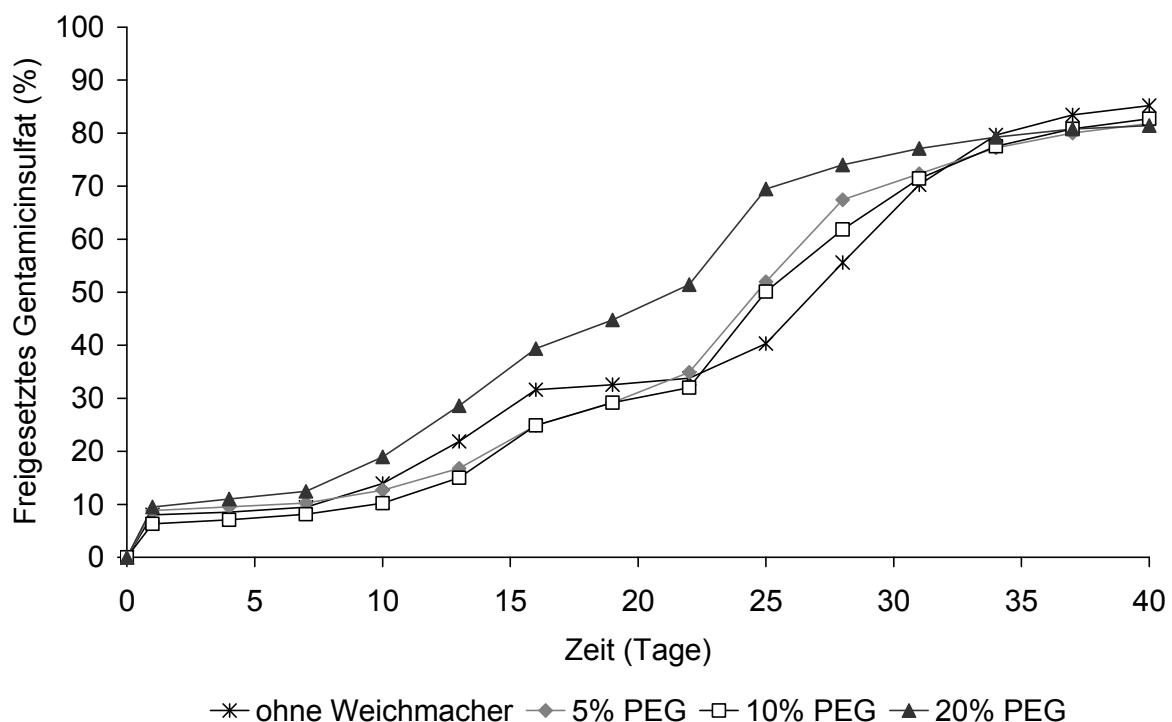


Abbildung 4.18: Freisetzungverläufe der Formulierungen mit 10% Gentamicinsulfat und steigender PEG 400-Konzentration

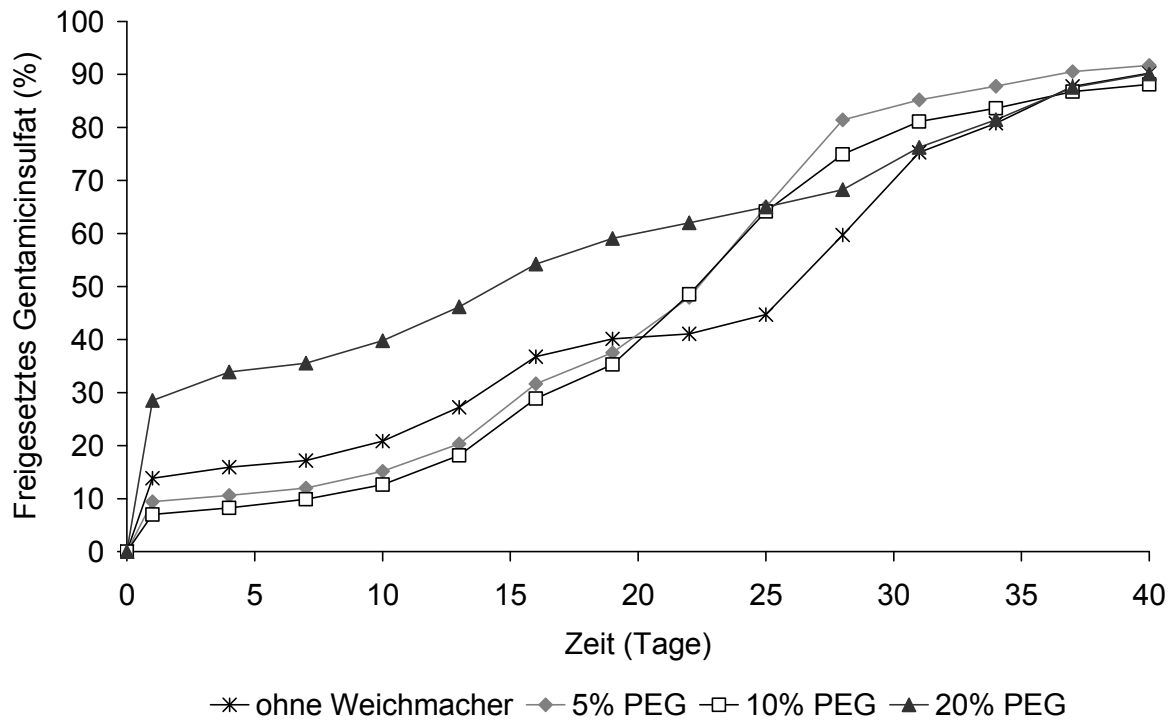


Abbildung 4.19: Freisetzungverläufe der Formulierungen mit 15% Gentamicinsulfat und steigender PEG 400-Konzentration

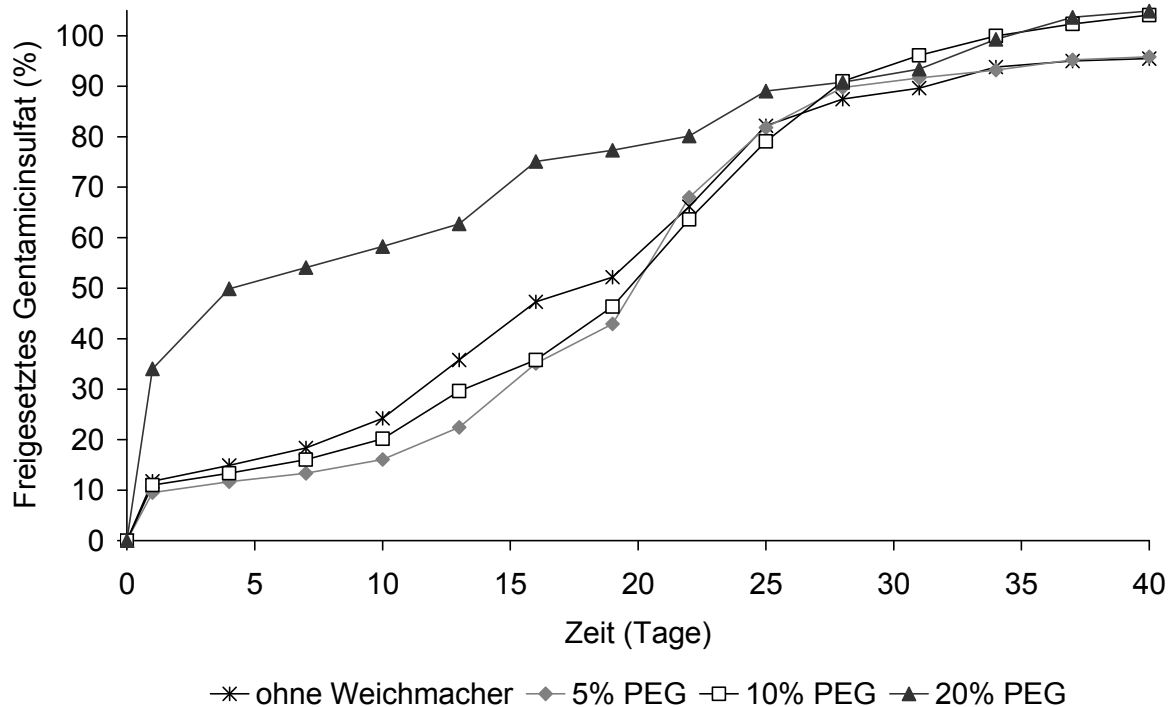


Abbildung 4.20: Freisetzungverläufe der Formulierungen mit 20% Gentamicinsulfat und steigender PEG 400-Konzentration

Die sigmoiden Verläufe der Formulierungen mit 5% und 10% Weichmacher differieren nur wenig, während die Erosionsphase der Extrudate ohne Weichmacher und mit 10% und 15% Gentamicinsulfat etwas später beginnt. Bei einer Wirkstoffkonzentration von 20% ist der porenbildende Effekt des Gentamicinsulfats stärker ausgeprägt, so dass die Verläufe nicht signifikant voneinander abweichen. Von diesen sehr ähnlichen Verläufen abweichend verhalten sich die Profile mit 20% PEG 400. Während die Zusammensetzung mit 10% Gentamicinsulfat noch einen sigmoiden Verlauf aufweist, zeigen die Extrudate mit 15% und 20% Arzneistoff einen linearen Verlauf nach der Burst-Freisetzung. Die gleichmäßigen, verzögerten Freisetzungen des Gentamicinsulfats über 5-6 Wochen zeigen ein Bestimmtheitsmaß von 0,9929 mit 15% bzw. 0,9715 mit 20% Arzneistoff. Die Freisetzungen aus diesen zwei Formulierungen zeigen das angestrebte Freisetzungsprofil, allerdings beinhalten sie eine hohe Weichmacherkonzentration. Diese bewirkt, dass die Extrudate auch im erkalteten Zustand klebrig sind und bei der Lagerung aneinander haften. Aufgrund dessen wurden Extrudate mit höherem Arzneistoffgehalt (30%-50%) produziert, um auch bei niedrigerer PEG 400-Konzentration ein favorisiertes Freisetzungsprofil zu erlangen.

In Abbildung 4.21 sind die Freisetzungsverläufe der Formulierungen mit 30% Gentamicinsulfat dargestellt. Vordergründig ist der Graphik zu entnehmen, dass die Formen der Profile einer exponentiellen Annäherung entsprechen und sich somit deutlich von den Freisetzungsverläufen der niedrigeren Arzneistoffkonzentrationen unterscheiden. Bei näherer Betrachtung fällt auf, dass das Profil der Formulierung ohne Weichmacher nicht dem erwarteten Verlauf, eine langsamere Freisetzung als aus den Extrudaten mit Weichmacher, entspricht. So werden bei der Burst-Freisetzung 35% des Arzneistoffs



freigesetzt, ca. 20% mehr als bei der Freisetzung der 5% PEG 400-Formulierung. Zusätzlich werden insgesamt nur 60% des theoretisch enthaltenen Wirkstoffs ins FreisetzungsmEDIUM abgegeben. Da diese Freisetzungsvorversuche allerdings nur Einfachbestimmungen waren (siehe Kapitel 3.2.1.3), wird vermutet, dass es sich um einen „Ausreißer“ handelt.

Die Formulierungen mit Weichmacher weisen mit steigender Konzentration eine höhere Freisetzungsgeschwindigkeit auf. Bei einem PEG 400-Gehalt von 20% wird weitestgehend der gesamte Arzneistoff mit der Burst-Freisetzung in den Phosphatpuffer abgegeben. Diese Formulierung enthält aufgrund des hohen Arzneistoff- und Weichmachergehalts nur 50% PLGA offensichtlich eine zu geringe Menge, um ein retardierendes Matrixsystem auszubilden.

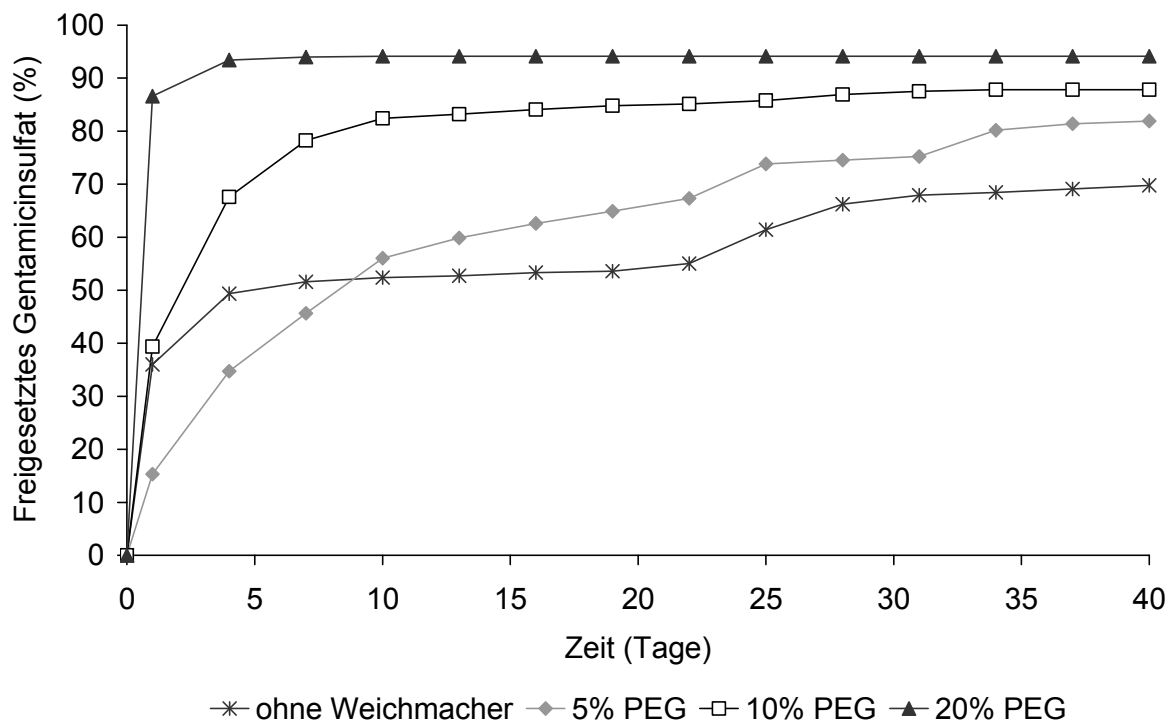


Abbildung 4.21: Freisetzungsvorläufe der Formulierungen mit 30% Gentamicinsulfat und steigender PEG 400-Konzentration

Bei einer Arzneistoffkonzentration von 40% kann man ebenfalls keine retardierte Freisetzung beobachten, sondern eine schnelle, relativ spontane Freisetzung, bei der innerhalb von 4 Tagen der gesamte Wirkstoff freigesetzt wird (Abbildung 4.22). Entsprechendes konnte auch bei einer Wirkstoffkonzentration von 50% festgestellt werden (Graphik nicht dargestellt). Die hohen Arzneistoffkonzentrationen bewirken, dass durch das leichtlösliche Gentamicinsulfat eine hohe Porosität der Extrudate entsteht, sobald sie sich im Freisetzungsmilieu befinden. Darüber hinaus kann das PLGA durch den geringen Gehalt keine feste durchgehende Matrix ausbilden. Aufgrund dieser beiden Effekte kann selbst aus dem Inneren der Extrudate das Gentamicinsulfat sehr schnell herausgelöst werden, so dass der Wirkstoff innerhalb weniger Tage komplett freigesetzt wird.

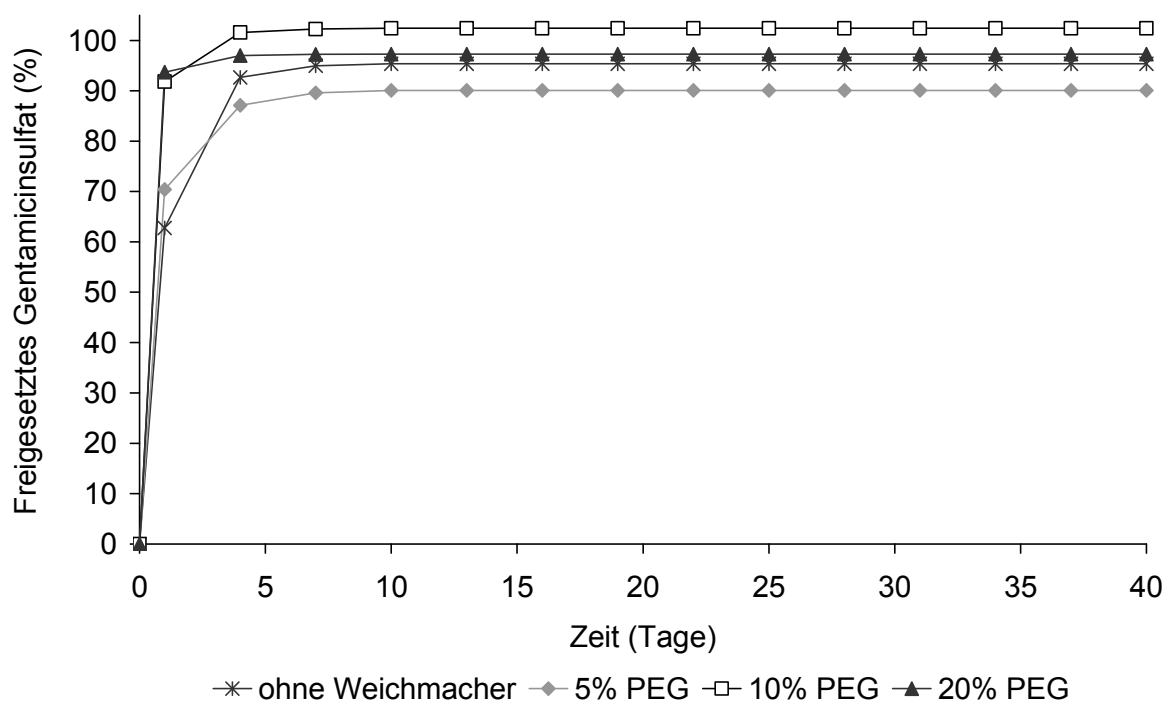


Abbildung 4.22: Freisetzungverläufe der Formulierungen mit 40% Gentamicinsulfat und steigender PEG 400-Konzentration

Um den Einfluss der Gentamicinsulfat-Konzentration zusammenfassend darzustellen, sind in Abbildung 4.23 beispielhaft die Freisetzungprofile der Formulierungen mit 5% PEG 400 aufgeführt. Mit steigendem Arzneistoffgehalt nimmt die Freisetzungsgeschwindigkeit zu, wobei sie bis zu einer Konzentration von 20% einen sigmoides Profil und ab 30% eine exponentielle Annäherung aufzeigen. Die lag-Phase nach der Burst-Freisetzung wird bis 20% Gentamicinsulfat durch den leichtlöslichen Arzneistoff und die damit entstehenden Poren reduziert. Ab 30% Wirkstoff tritt keine Verzögerungsphase mehr auf.

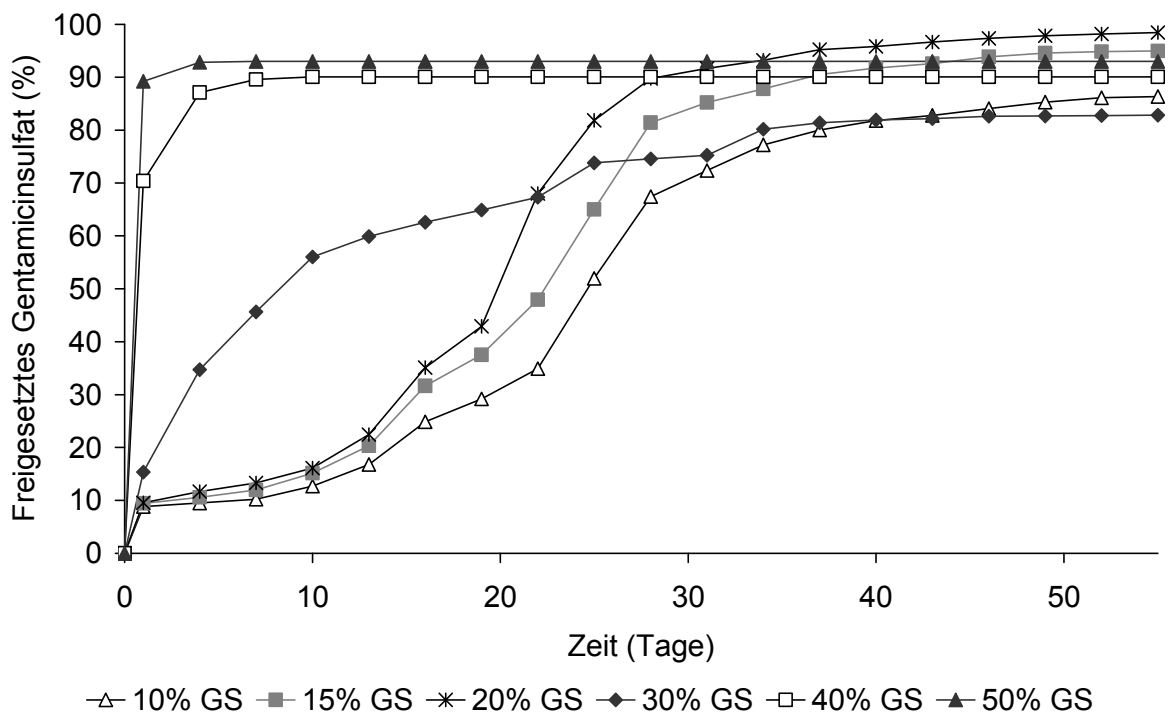


Abbildung 4.23: Freisetzungsverläufe der Formulierungen mit 5% PEG 400 und steigender Gentamicinsulfat-Konzentration

Betrachtet man die Freisetzungprofile aller Formulierungen, zeigt sich, dass insbesondere bei den niedrigen Arzneistoffkonzentrationen der Weichmacher nur einen geringen Effekt auf das Freisetzungsprofil aufweist. Um eine präzisere Aussage über den Einfluss der Komponenten der Formulierungen auf den Freisetzungsverlauf machen zu können, wurden die Daten statistisch ausgewertet. Dazu wurden die

prozentual freigesetzten Mengen an Gentamicinsulfat nach drei verschiedenen Zeitpunkten der Freisetzung gegen die Konzentrationen der einzelnen Komponenten aufgetragen. Die Bestimmtheitsmaße der Ausgleichsgeraden geben Auskunft über die Korrelation des Freisetzungsprofils mit den Konzentrationen der Bestandteile (Abbildung 4.24 bis Abbildung 4.26). Anhand dieser Graphiken wird bestätigt, was aufgrund der Freisetzungsprofile bereits vermutet wurde. Das PEG 400 beeinflusst nicht die Freisetzung des Gentamicinsulfats aus den Extrudaten. Die Bestimmtheitsmaße der Ausgleichsgeraden sowohl nach der Burst-Freisetzung als auch nach 7 und 19 Tagen liegen unter 0,1. Dies kann so gedeutet werden, dass kein linearer Zusammenhang zwischen der Weichmacherkonzentration und der freigesetzten Menge an Gentamicinsulfat besteht. Dagegen korrelieren die Konzentrationen von Gentamicinsulfat und dem Matrixbildner PLGA sehr gut mit der Freisetzung. Dabei zeigt sich, dass der Gentamicinsulfat-Gehalt einen leicht stärkeren Einfluss als die Konzentration des PLGAs besitzt, da die Bestimmtheitsmaße des Arzneistoffs besonders zu den Zeitpunkten Tag 7 und 19 mit 0,87 etwas höher liegen als von PLGA mit 0,78.

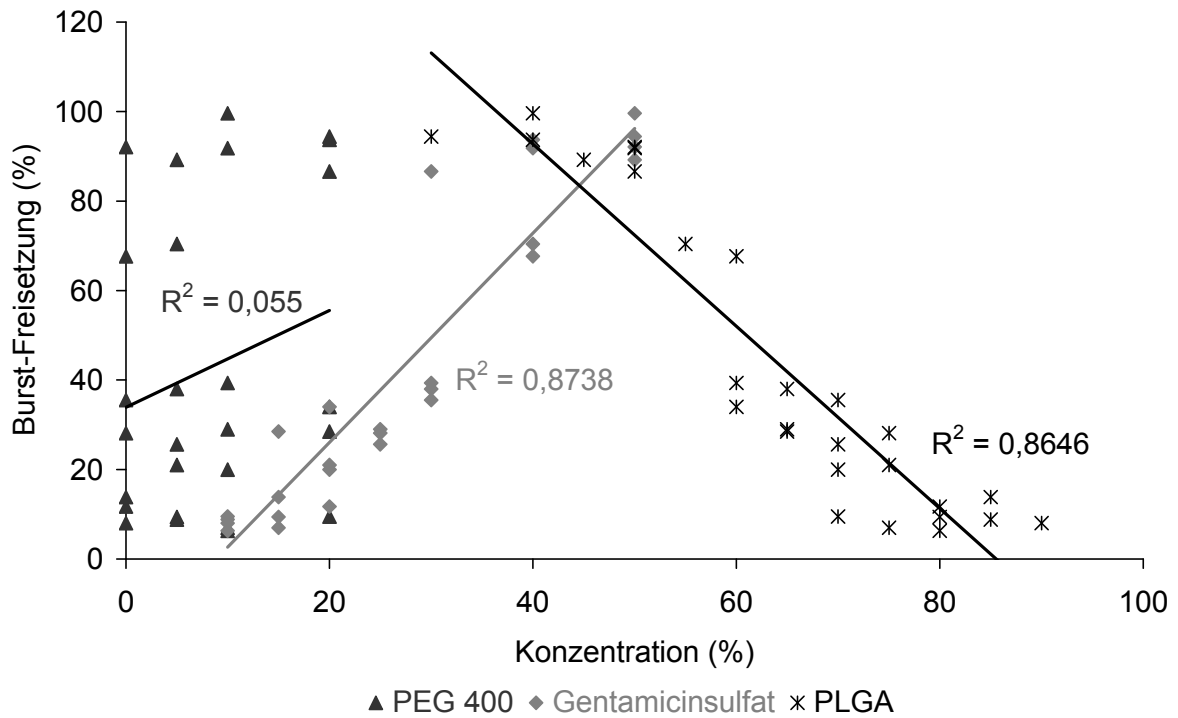


Abbildung 4.24: Statistische Auswertung der Burst-Freisetzung (Tag 1)

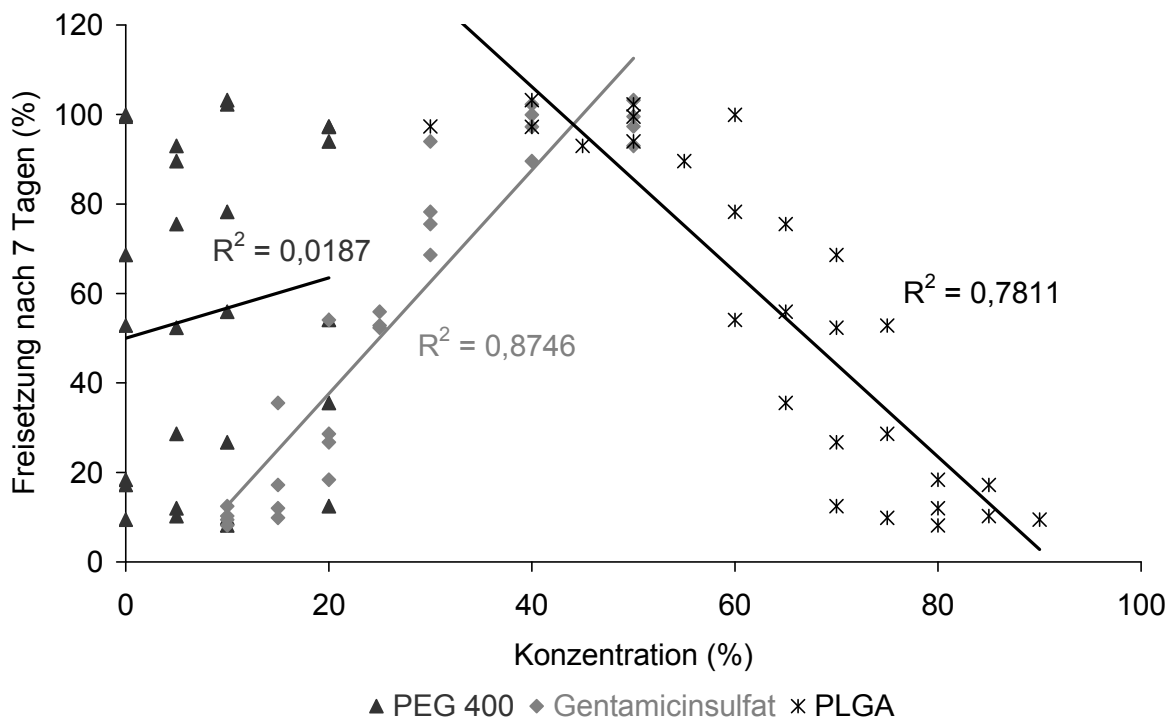


Abbildung 4.25: Statistische Auswertung der Freisetzung nach 7 Tagen

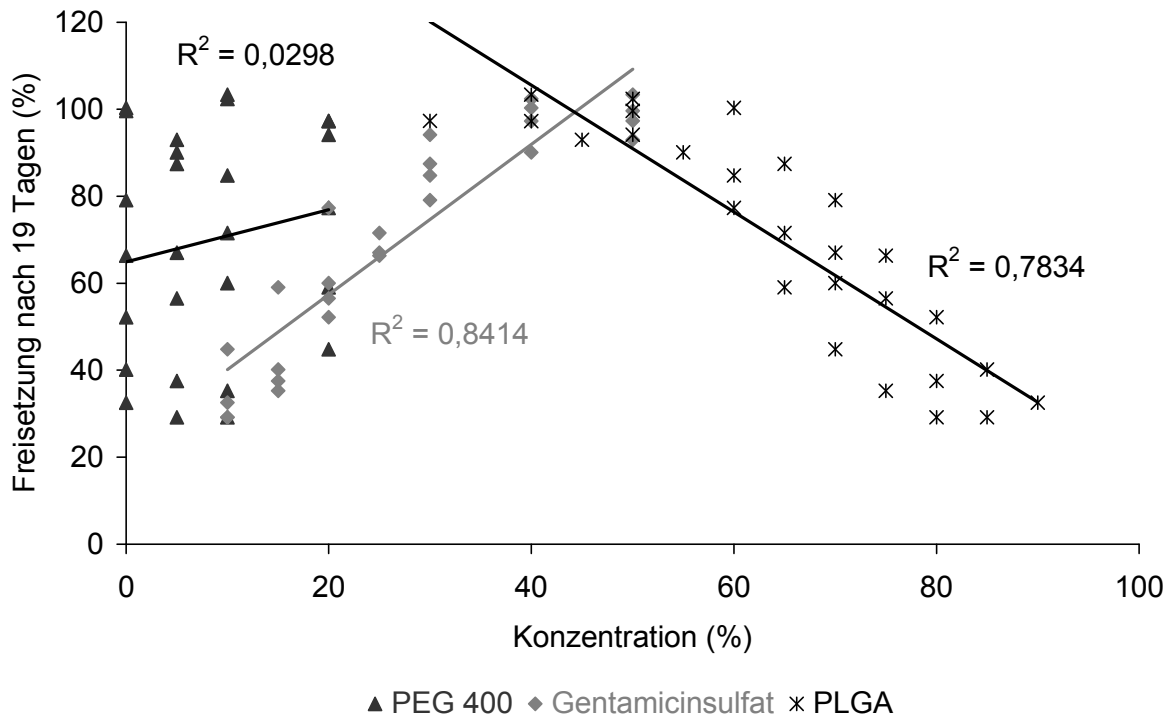


Abbildung 4.26: Statistische Auswertung der Freisetzung nach 19 Tagen

Die einzelnen Komponenten in der Formulierung ergeben zusammen immer 100%, weshalb sie sich gegenseitig beeinflussen. So wird beispielsweise durch eine Erhöhung der PEG 400-Konzentration gleichzeitig eine Erniedrigung des PLGA-Gehalts hervorgerufen. Diese Zusammenhänge werden daher durch die einfachen Korrelationen der Komponenten mit der freigesetzten Menge Arzneistoff nicht vollständig berücksichtigt. Sie werden deutlicher sichtbar durch eine statistische Auswertung der Ergebnisse als Mischungsversuchsplan mit der Software DesignExpert® (Version 7.1.6). Die Varianzanalyse für das Mischungsmodell ergibt einen p-Wert von  $<0,0001$  (signifikant). Ein Wert von 28,435 für „Adequate Precision“ lässt auf ein günstiges Signal-Rausch-Verhältnis schließen. Ein „Adjusted R-Squared“ von 0,9133 zeigt, dass das gewählte Modell die Daten gut beschreibt und ein „Predicted R-Squared“ von 0,8886 weist auf eine gute Vorhersagekraft hin. Beispielhaft ist die Auswertung der Freisetzung nach 19 Tagen in Abbildung 4.27 dargestellt. Die Freisetzungsprofile wurden dazu

normiert, indem die gesamt freigesetzte Arzneistoffmenge einer Freisetzung als 100% definiert und die Arzneistoffmengen nach 19 Tagen darauf prozentual bezogen wurden.

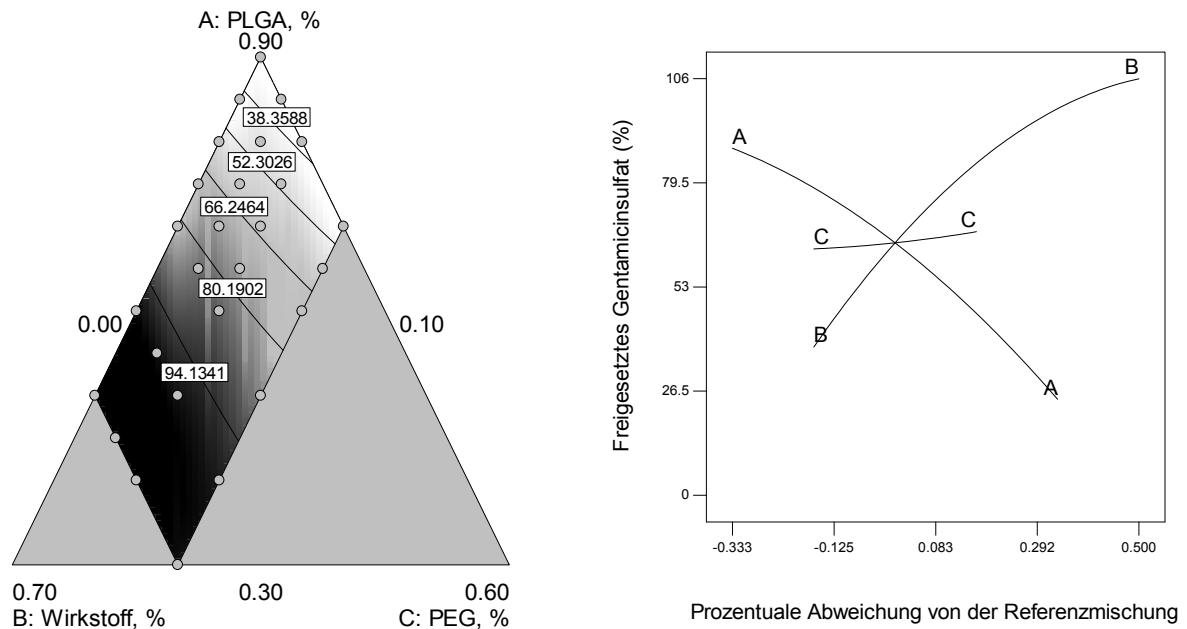


Abbildung 4.27: Statistische Auswertung der Freisetzung nach 19 Tagen mit DesignExpert®; linke Graphik: Simplex-Design-Diagramm; rechte Graphik: Trace nach Piepel (A = PLGA, B = GS, C = PEG), prozentuale Angaben als Dezimalzahlen

Zur Übersicht sind die Einzelwerte in dem Simplex-Design-Diagramm aufgeführt. Deutlicher werden die Einflüsse in der Trace-Darstellung nach Piepel, in welcher graphisch die Einflüsse auf die Freisetzung bei prozentualer Abweichung von einer Referenzmischung (hier: 20% Gentamicinsulfat, 10% PEG 400 und 70% PLGA) dargestellt werden. Durch die Graphik wird erneut deutlich, dass der Anteil des Gentamicinsulfats eine positive und der Anteil des PLGAs eine negative Korrelation mit der freigesetzten Arzneistoffmenge aufweist. Außerdem kann man eine leichte, positive Korrelation des PEG 400-Gehalts mit der Freisetzungsgeschwindigkeit beobachten. Dies bedeutet, dass beispielsweise mit einer höheren Weichmacher-Konzentration als in der

Referenzmischung etwas mehr Wirkstoff freigesetzt wurde. Dieser Effekt ist allerdings darauf zurückzuführen, dass durch Zunahme des PEG 400-Anteils die Konzentration des PLGAs sinkt. Bei einer niedrigeren PLGA-Konzentration wird eine weniger feste Matrix ausgebildet, so dass wiederum mehr Arzneistoff freigesetzt werden kann.

Als Ursache für den nicht vorhandenen Einfluss von PEG 400 auf das Freisetzungsprofil ist die gute Löslichkeit des Weichmachers zu betrachten. Sobald die Extrudate in das Freisetzungsmittel gegeben werden, fangen diese an zu quellen und das PEG 400 kann aus der Polymermatrix heraus diffundieren. Die Glasübergangstemperatur des Polymers steigt aufgrund dessen an und die Mobilität und Flexibilität der Matrix sinkt. Vergleichbares konnten Kranz et al. (2000) bei PLGA-Filmen versetzt mit 10% Triethylcitrat beobachten. Der Weichmacher wurde ins wässrige Medium ausgewaschen und die Glasübergangstemperatur glich sich der Tg der Filme ohne Weichmacher an. Dementsprechend nahm auch sehr schnell die durch den Weichmacher erhöhte Dehnbarkeit (Flexibilität) der Filme ab, bis sie sich nicht mehr von den Filmen ohne Weichmacher unterschieden. Der ebenfalls getestete lipophilere Weichmacher Acetyltributylcitrat dagegen verblieb in den Filmen und reduzierte somit über den gesamten beobachteten Zeitraum von vier Wochen die Glasübergangstemperatur.

Die Erhöhung der Glasübergangstemperatur der Extrudate nach dem schnellen Auswaschen des PEG 400 wirkt sich auf die Freisetzungsgeschwindigkeit des Wirkstoffs aus. Die Mobilität und Flexibilität der Polymerketten ist oberhalb der Glasübergangstemperatur im gummielastischen Zustand stark erhöht, was zu einem größeren Diffusionskoeffizienten in den Extrudaten führt. Durch die Zugabe von PEG 400 wird die Tg schon durch Zugabe von nur 5% Weichmacher auf unter 37°C gesenkt. Damit sollten die Extrudate mit Weichmacher einen



höheren Diffusionskoeffizienten als die Extrudate ohne Weichmacher aufweisen und somit schneller den Wirkstoff freisetzen können. Durch das schnelle Auswaschen des Weichmachers geht dieser Effekt jedoch verloren. Der Arzneistoff wird entsprechend langsam freigesetzt. Da zu Beginn der Freisetzung noch der größte Anteil des Weichmachers enthalten ist, kann bei der Burst-Freisetzung auch eine leicht bessere Korrelation der Freisetzung mit der Konzentration als bei späteren Zeitpunkten beobachtet werden (Abbildung 4.24 bis Abbildung 4.26).

Dieses Ergebnis, das PEG 400 keinen signifikanten Einfluss auf das Freisetzungsprofil hat, steht mit Beobachtungen von Narahariseti et al. (2005) im Einklang. Die Arbeitsgruppe stellte Mikrosphären aus PLGA beladen mit Gentamicinsulfat her und formte diese zu Presslingen. Durch Zugabe von PEG (MW 1450, 3350 und 8000) sollte die lange Verzögerungsphase eliminiert werden, unter der Annahme, dass das PEG aus den Presslingen diffundiert und somit Poren hinterlässt, aus denen das Gentamicinsulfat ohne lag-Phase freigesetzt werden kann. Bei den Freisetzungsuntersuchungen wurde allerdings das Profil nicht durch das PEG beeinflusst, sondern lediglich die Burst-Freisetzung leicht erhöht und ein etwas früheres Einsetzen der Erosionsphase beobachtet. Zu einem anderen Resultat kamen Wang et al. (2002), die gleichermaßen Mikrosphären aus PLGA zu Presslingen formten. Durch Inkorporation von 10% PEG 3350 konnte die Freisetzungsgeschwindigkeit des Arzneistoffs Etanidazol enorm verbessert und die sigmoide Ausprägung des Profils reduziert werden. Eine mögliche Erklärung für diesen positiven Einfluss über das höhere Molekulargewicht ist nicht gegeben, da eine analoge Formulierung mit PEG 8000 kein verändertes Freisetzungsprofil aufwies.

Die Literatur weist somit teilweise widersprüchliche Angaben über den Einfluss von PEG auf das Freisetzungsverhalten eines Arzneistoffs aus

einer PLGA-Matrix auf. Allerdings wurde zumeist nur ein Einflussfaktor untersucht und variiert, was vermutlich zu den unterschiedlichen Einschätzungen und Bewertungen der Ergebnisse führte.

Zusammenfassend lässt sich somit feststellen, dass das Gentamicinsulfat aufgrund der hohen Löslichkeit und der damit entstehende Porosität den stärksten Einfluss auf das Freisetzungsprofil aufweist. Daneben kann durch Senkung des PLGA-Anteils ebenfalls eine höhere Freisetzungsgeschwindigkeit beobachtet werden. Die Polymerketten werden durch die weiteren Bestandteile auseinander gedrängt und können weniger feste intermolekulare Bindungen aufbauen. Der Weichmacher PEG 400 dagegen beeinflusst das Freisetzungsprofil nur geringfügig, da dieser innerhalb kürzester Zeit aus den Extrudaten ausgewaschen wird. Allerdings kann durch die Zugabe des Weichmachers die Extrusionstemperatur signifikant erniedrigt und somit die thermische Belastung sowohl des Arzneistoff als auch des PLGAs reduziert werden.

#### **4.3.4 VERGLEICH DER EXTRUDATE MIT PEG 400 UND TBC**

Vergleicht man die Extrudate mit den zwei verschiedenen Weichmachern Tributylcitrat und PEG 400, lassen sich einige Unterschiede erkennen. Bezüglich der Senkung der Glasübergangstemperatur weist der hydrophilere Weichmacher PEG 400 eine etwas höhere Weichmachereffizienz auf. Im linearen Bereich zwischen 0 und 10% reduziert 1% PEG 400 die Tg um 2,6°C während Tributylcitrat diese um 2,3°C senkt. Entsprechend konnte die Extrusionstemperatur beispielsweise bei der Herstellung der Extrudate mit 10% Weichmacher bei PEG 400 um 10°C stärker reduziert werden (auf 85°C).

Betrachtet man die Freisetzungsprofile, lässt sich eine deutlich schnellere Freisetzung aus den Extrudaten mit Tributylcitrat beobachten.

Der Arzneistoff wird aus diesen innerhalb von zwei bis drei Wochen freigesetzt, während das Gentamicinsulfat aus den PEG-Extrudaten über vier bis sechs Wochen freigesetzt wird. Ursache für diese unterschiedlichen Zeiträume ist das Verhalten des Weichmachers. Das Tributylcitrat verbleibt während der Freisetzung in den Extrudaten und reduziert damit über die gesamte Zeit die Glasübergangstemperatur. Damit liegt das PLGA im gummielastischen Zustand vor; die Mobilität der Polymerketten und daraus folgend der Diffusionskoeffizient sind erhöht. Der Arzneistoff wird somit schneller freigesetzt. Zusätzlich erfolgt durch den Weichmacher ein früheres Einsetzen der Erosionsphase, da das Polymer oberhalb der Glasübergangstemperatur aufgrund der höheren Kettenmobilität und die damit höhere Reaktivität des Polymers in Form von Kettenspaltungen schneller abgebaut wird (Kranz et al., 2000).

Die Freisetzung aus den Extrudaten mit PEG 400 findet dagegen langsamer statt, da der hydrophile Weichmacher schnell aus der Polymermatrix ausgewaschen wird. Das Freisetzungsprofil wird damit nicht durch das PEG beeinflusst, sondern kann über die Gentamicinsulfat- und PLGA-Konzentrationen verändert werden. Aufgrund des längeren Zeitraums, über den der Arzneistoff aus den PEG-Extrudaten freigesetzt wird, wurden diese Formulierungen für eine weitere Optimierung und Charakterisierung ausgewählt. Um das Profil weiter zu optimieren, das bedeutet einen Freisetzungsverlauf zwischen dem sigmoiden der 20%-Formulierungen und der exponentiellen Annäherung der 30%-Formulierungen zu erzielen, wurde zusätzlich ein Arzneistoff-Anteil von 25% getestet.

#### **4.4 CHARAKTERISIERUNG DER GENTAMICINSULFAT-EXTRUDATE**

In den bisherigen Untersuchungen wurden die Extrudate hinsichtlich möglicher Hilfsstoffe (Weichmacher) und den Konzentrationen der

---

Komponenten über einen großen Bereich betrachtet, um eine rationale Vorauswahl treffen zu können. Dabei wurden die Extrudate hauptsächlich auf das Schlüsselkriterium, den Freisetzungverlauf, untersucht. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde eine Weichmacherwahl getroffen und mögliche Konzentrationsbereiche der Komponenten festgestellt. Eine umfassende Bewertung einer Arzneiform ist jedoch nicht allein basierend auf ihren Freisetzungseigenschaften möglich. Um eine abschließende Beurteilung für eine optimale Formulierung der Gentamicinsulfat-Implantate vornehmen zu können, wurden die Extrudate hinsichtlich ihrer Eigenschaften beispielsweise bei der Herstellung oder Freisetzung genauer charakterisiert. Dabei wurden die Extrudate mit dem Zweischnuckenextruder Minilab II hergestellt und von jeder Formulierung wurden drei Chargen produziert. Die Extrusionstemperaturen entsprachen dabei denen der wärmsten Zone - der maximalen Extrusionstemperatur - bei der Extrusion im Einschnuckenextruder (siehe Kapitel 4.3.3.1).

Tabelle 4.8: Zusammensetzung der Formulierungen, Angaben in %

Gentamicinsulfat	PEG 400	PLGA
20	0	80
20	5	75
20	10	70
25	0	75
25	5	70
25	10	65
30	0	70
30	5	65
30	10	60

Die Formulierungsauswahl wurde um die Arzneistoffkonzentration von 25% ergänzt, da erwartet wurde, dass der Freisetzungsverlauf sich zwischen den sigmoiden und der exponentiellen Annäherung der 20% bzw. 30% Formulierungen befinden würde (Tabelle 4.8). Dieser Verlauf würde dann vermutlich einem erwünschten Freisetzungsprofil zur Behandlung der chronischen Osteomyelitis entsprechen. Des Weiteren wurde auf Formulierungen in Kombination mit 20% PEG 400 verzichtet, da diese aufgrund der Klebrigkeit der Extrudate und Instabilität hinsichtlich der Form als ungeeignet erachtet wurden.

### **4.4.1 RHEOLOGISCHE BETRACHTUNGEN DER POLYMERSCHMELZEN**

Während des Extrusionsprozesses wird das Polymer zum einen durch die Scherung - hervorgerufen durch die rotierenden Schnecken, und zum anderen durch die thermische Belastung aufgrund der Prozess-temperatur stark beansprucht. Dies kann zu physikalischer Kettenspaltung, chemischer Depolymerisation oder thermischer Degradation des Polymers führen (McGinity et al., 2007).

Die Schmelzviskosität einer Formulierung steht dabei im direkten Zusammenhang mit der thermischen Prozessierbarkeit. Bei einer hohen Schmelzviskosität wirken enorme Kräfte in der Maschine, um das Produkt zu fördern und zu extrudieren. Dies kann zu einer schlechten Produktqualität oder sogar zur Schädigung der Apparatur führen. Die rheologischen Eigenschaften eines Polymers während der Schmelzextrusion hängen dabei von folgenden Faktoren ab:

- Molekulargewicht und Struktur des Polymers
- Prozesstemperatur
- Druck
- Scherrate
- Hilfsstoffe

Mit steigender Prozesstemperatur und steigender Scherrate lässt sich die Schmelzviskosität eines Polymers relativ einfach senken, allerdings führen insbesondere diese beiden Faktoren zu einer starken Beanspruchung des Polymers. Der Einfluss des Druckes auf die Schmelzviskosität macht sich erst bei sehr hohen Werten bemerkbar und stellt somit bei pharmazeutischen Produkten keine Option dar. Aufgrund dessen werden im Allgemeinen Hilfsstoffe wie Weichmacher oder Schmiermittel den Formulierungen zur Schmelzextrusion zugesetzt, um die Prozessierbarkeit zu verbessern.

Um den Einfluss von PEG 400 auf die rheologischen Eigenschaften des Polymers zu untersuchen, wurden die Schmelzviskositäten der Formulierungen vermessen und verglichen. Mit Hilfe der Software Design-Expert<sup>®</sup> (Version 7.1.6) wurde ein Versuchsplan erstellt. Da aufgrund der langen Temperaturbelastung (zur Messung der Viskosität muss die Mischung im Kreislauf fließen) mit hoher Scherbeanspruchung und der damit zu erwartenden Beeinträchtigung des Polymers (Polymerabbau) und des Arzneistoffs die Chargen nicht für weitere Untersuchungen verwendet werden konnten, wurden ausschließlich die „Extrem“-Formulierungen analysiert. Es wurden dazu die bezüglich der Viskosität erwarteten Formulierungsextreme sowie eine Formulierung aus der Mitte ausgewählt. Der Zentralpunkt wurde wiederholt, um eine Aussage über die Reproduzierbarkeit der Resultate machen zu können. Es wurden dabei die Formulierungen mit 20, 25 und 30% Gentamicinsulfat-Gehalt in Kombination mit 0, 5 und 10% Weichmacher-Konzentration berücksichtigt. Die ausgewählten Extremformulierungen sowie der Zentralpunkt sind in Tabelle 4.9 angegeben.

Tabelle 4.9: Auswahl der Formulierungen zur rheologischen Untersuchung, Angaben in %

Formulierung	Gentamicinsulfat	PEG 400	PLGA
1	20	0	80
2	20	10	70
3 (Zentralpunkt)	25	5	70
4	30	0	70
5	30	10	60

Die rheologischen Versuche wurden bei 110°C und mit Drehzahlen von 10 bis 200 s<sup>-1</sup> in logarithmischen Schritten durchgeführt (Abbildung 4.28). Die Auswertung der Fließkurve wurden mit Hilfe der Ostwald-de-Waele-Gleichung durchgeführt, indem die Viskositäten der Formulierungen bei einem Geschwindigkeitsgefälle von 100 s<sup>-1</sup> berechnet wurden (siehe Kapitel 3.2.2.4).

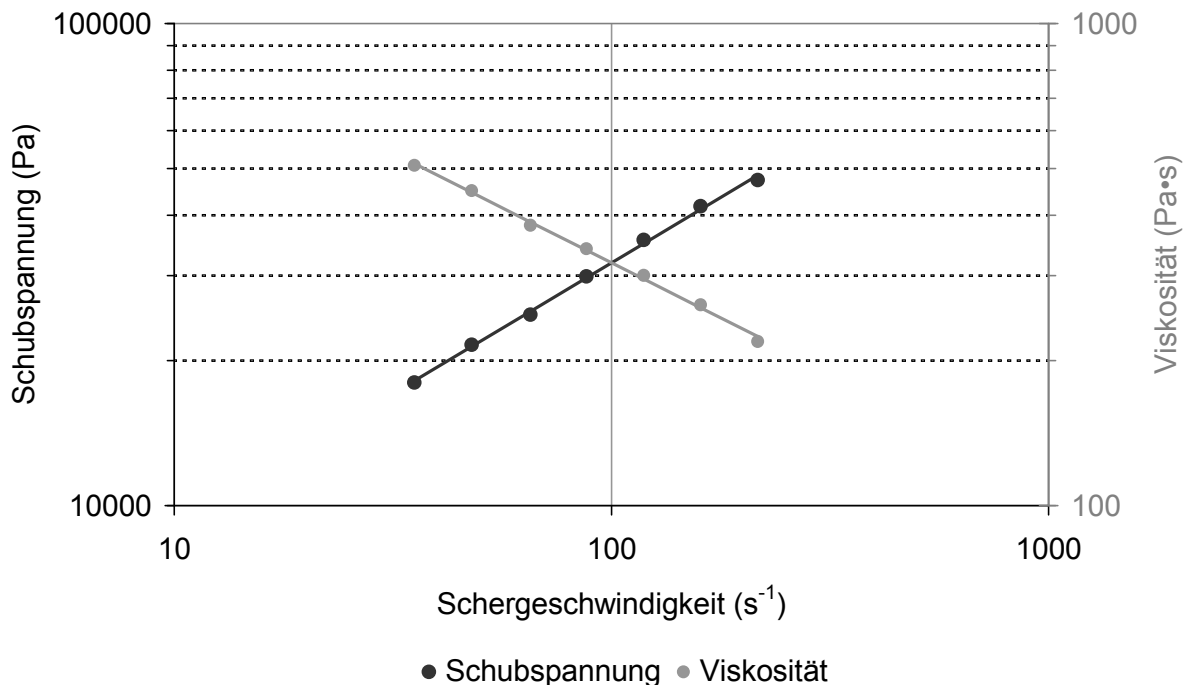


Abbildung 4.28: Beispiel einer Auswertung einer rheologischen Messung mit Fließ- und Viskositätskurve mit der Auswahl im linearen Segment der log-log-Darstellung, Formulierung 3

Die erhaltenen Viskositätswerte wurden mit Hilfe von Design-Expert statistisch ausgewertet. Die Ergebnisse der Viskositätsversuche der „Extrem“-Formulierungen sind in der 3D-Graphik in Abbildung 4.29 dargestellt. Die Varianzanalyse für das lineare Mischungsmodell ergibt einen p-Wert von 0,0003 (signifikant), wobei der Lack of Fit p-Wert mit 0,2152 nicht signifikant ist. Das Signal-Rausch-Verhältnis sollte größer als 4 sein und weist somit mit 47,9 ein sehr gutes Verhältnis auf. Ein "Adjusted R-Squared" von 0,9933 zeigt, dass das gewählte Modell die Daten ausgezeichnet beschreibt und ein "Predicted R-Squared" von 0,9658 weist auf eine gute Vorhersagekraft hin.

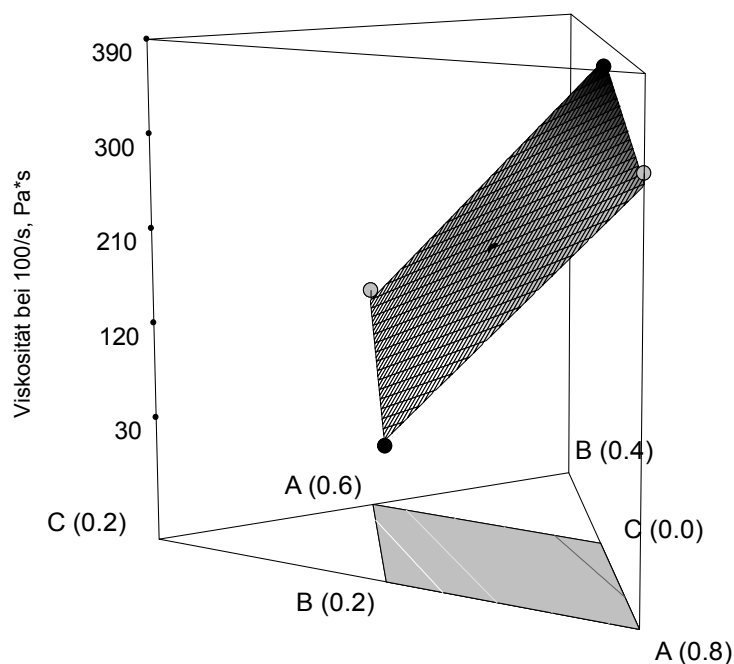


Abbildung 4.29: Viskositäten der Formulierungen bei einer Schergeschwindigkeit von  $100 \text{ s}^{-1}$  und einer Temperatur von  $110^\circ\text{C}$ ; A = PLGA, %; B = Gentamicinsulfat, %; C = PEG 400, %

Die Responsefläche zeigt eine enorme Steigung, wodurch der starke Einfluss des PEG 400 erkennbar wird. Da die Zentralpunkte nicht außerhalb der Responsefläche liegen, kann von einem linearen Zusammenhang ausgegangen werden. Mit zunehmender Weichmacher-



konzentration fällt die Viskosität bis auf 37,1 Pa•s bei der Formulierung mit 20% Gentamicinsulfat und 10% PEG ab. PEG 400 senkt als äußerer Weichmacher die Viskosität der Schmelze durch Reduktion der intermolekularen oder van der Waals Kräfte, so dass die Polymerketten leichter aneinander entlang gleiten können. Durch die Zugabe des Weichmachers sinkt neben der Viskosität der Schmelze die Glasübergangstemperatur, so dass aufgrund dieser beiden Faktoren durch Zugabe des Weichmachers eine gute Prozessierbarkeit bei niedrigeren Extrusionstemperaturen gegeben ist.

Die Gentamicinsulfat-Konzentration hat dagegen nur einen geringen, aber ebenfalls signifikanten Einfluss. Durch einen höheren Arzneistoff-Anteil steigt die Viskosität der Polymerschmelze etwas an, wie zum Beispiel die Formulierung mit 30% Arzneistoff (0% PEG), die mit 366,5 Pa•s eine höhere Viskosität aufweist als die Formulierung mit 20% Gentamicinsulfat (0% PEG) mit 314,5 Pa•s. Da das Gentamicinsulfat während des Extrusionsprozesses als feste Partikel vorliegt, wird ähnlich wie bei einer Paste durch den hohen Anteil die Viskosität aufgrund der Reibung der Partikel untereinander erhöht. Die Einflüsse der Komponenten auf die Viskosität der Polymerschmelze lassen sich auch in der Responseflächengleichung wiederfinden:

$$\eta \text{ (Pa}\cdot\text{s)} = 146,4 \cdot \text{PLGA} + 901,7 \cdot \text{GS} - 2385,8 \cdot \text{PEG}$$

PLGA hat mit 146,4 im Vergleich zu den anderen Komponenten den geringsten Einfluss, erhöht aber wie Gentamicinsulfat mit einem positiven Einfluss von 901,7 die Viskosität der Schmelze. Wie erwartet, hat der Weichmacher PEG 400 mit einem Koeffizienten von -2385,8 den größten und gleichzeitig den einzigen negativen Einfluss auf die Viskosität. Durch den Weichmacher-Zusatz wird somit effektiv die

Schmelzviskosität erniedrigt, daraus folgernd eine Extrusion bei niedrigeren Temperaturen möglich und die Prozessierbarkeit enorm verbessert.

#### **4.4.2 REPRODUZIERBARKEIT UND GLEICHFÖRMIGKEIT DES GEHALTS**

Im Folgenden wurde untersucht, ob eine Gleichförmigkeit des Gehalts der einzelnen Extrudate vorliegt und ob eine Reproduzierbarkeit des Verfahrens gegeben ist. Dazu wurden Gehaltsbestimmungen von fünf Extrudaten der drei Chargen (a, b und c) jeder Formulierung durchgeführt und miteinander verglichen.

Die Gleichförmigkeit des Gehalts wird hauptsächlich durch zwei Faktoren beeinflusst: zum einen die Homogenität der Pulvermischung und zum anderen die Durchmischung im Extruder. Der verwendete Zweischnellenextruder ist für sehr kleine Ansätze konzipiert und weist ein dementsprechend kleines Volumen auf, weshalb die Verweildauer der Materialien im Extruder sehr kurz ist. Eine optimale Homogenität der Ausgangssubstanzen während Extrusionsprozesses kann durch mehrmaliges Durchlaufen des Rückflusskanals erreicht werden. Darauf wurde allerdings wegen der hohen Temperaturbelastung des Arzneistoffs und des Polymers verzichtet, so dass eine ausreichend homogene Pulvermischung als Ausgangsmaterial erforderlich war.

Zur Herstellung der Mischungen wurden das Gentamicinsulfat und das PLGA 15 Minuten in einem Turbulamischer homogenisiert (vergleiche Kapitel 3.2.1.3). Eine ähnliche Partikelgrößenverteilung der Ausgangssubstanzen ist dabei wünschenswert, um eine Entmischung der Bestandteile bei der anschließenden manuellen Einarbeitung des flüssigen Weichmachers und den dadurch entstehenden Erschütterungen zu vermeiden. Die Partikelgrößenverteilungen der beiden Pulver sind in Abbildung 4.30 dargestellt. Die Kennzahlen der

Größenverteilungen zeigen vergleichbare Werte; ideal zur Erreichung einer homogenen Pulvermischung (Tabelle 4.10).

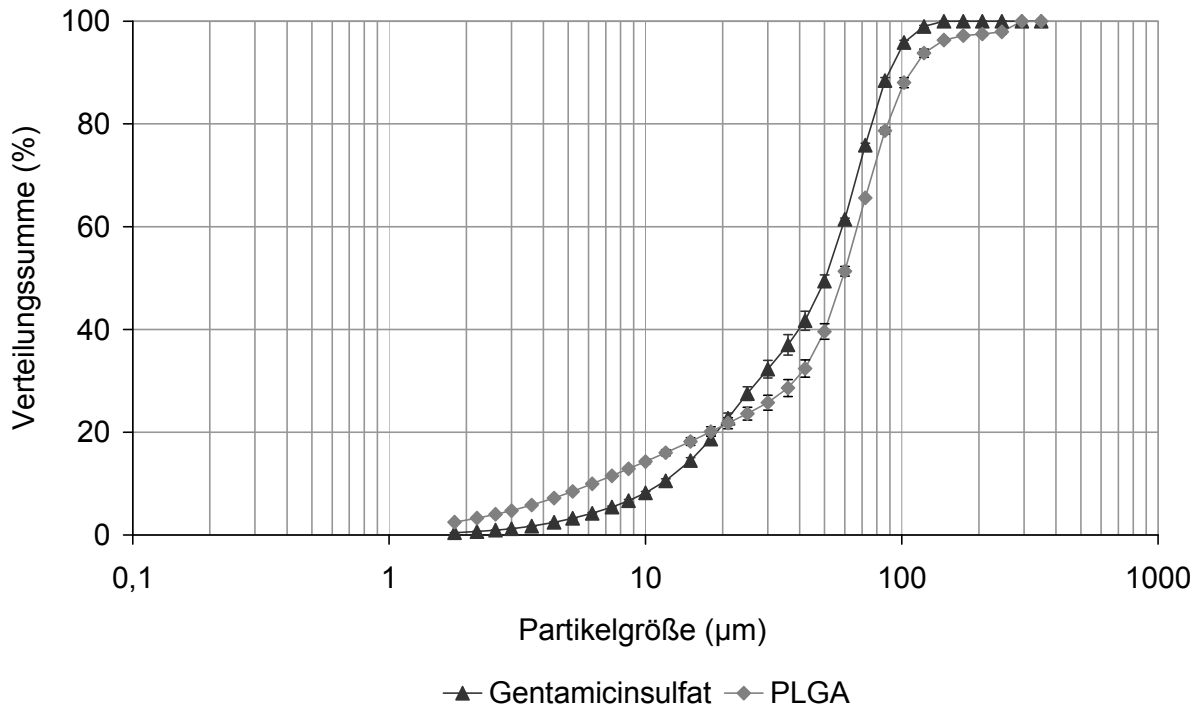


Abbildung 4.30: Verteilungssummenkurven der Partikelgrößen von Gentamicinsulfat und PLGA

Tabelle 4.10: Kennzahlen der Partikelgrößenverteilungen von Gentamicinsulfat und PLGA

Pulver	$X_{10}$ (µm)	$X_{50}$ (µm)	$X_{90}$ (µm)
Gentamicinsulfat	11,55	50,39	89,34
PLGA	6,25	58,85	108,79

Die in Abbildung 4.31 dargestellten Ergebnisse der Gehaltsbestimmungen zeigen, dass die angestrebten Konzentrationen von Gentamicinsulfat in den Extrudaten gut erfüllt wurden. Es wurde zusätzlich für jede Charge eine Prüfung auf Gleichförmigkeit des Gehalts nach dem Ph. Eur. 6.0, Kapitel 2.9.40 durchgeführt. Es sei darauf

hingewiesen, dass bei der Prüfung laut Arzneibuch 10 Einheiten analysiert werden, hier allerdings nur fünf Einheiten untersucht wurden. Unter Berücksichtigung dieser Modifizierung kann eine Beurteilung der Gleichförmigkeit des Gehaltes anhand der Daten erfolgen. Die Einzelgehalte der Extrudate aller Chargen liegen zwischen 91,57% und 110,90%. Die berechneten Akzeptanzwerte der einzelnen Chargen sind kleiner 5 und würden somit die Anforderungen des Arzneibuchs erfüllen, das einen Grenzwert von 15 festlegt.

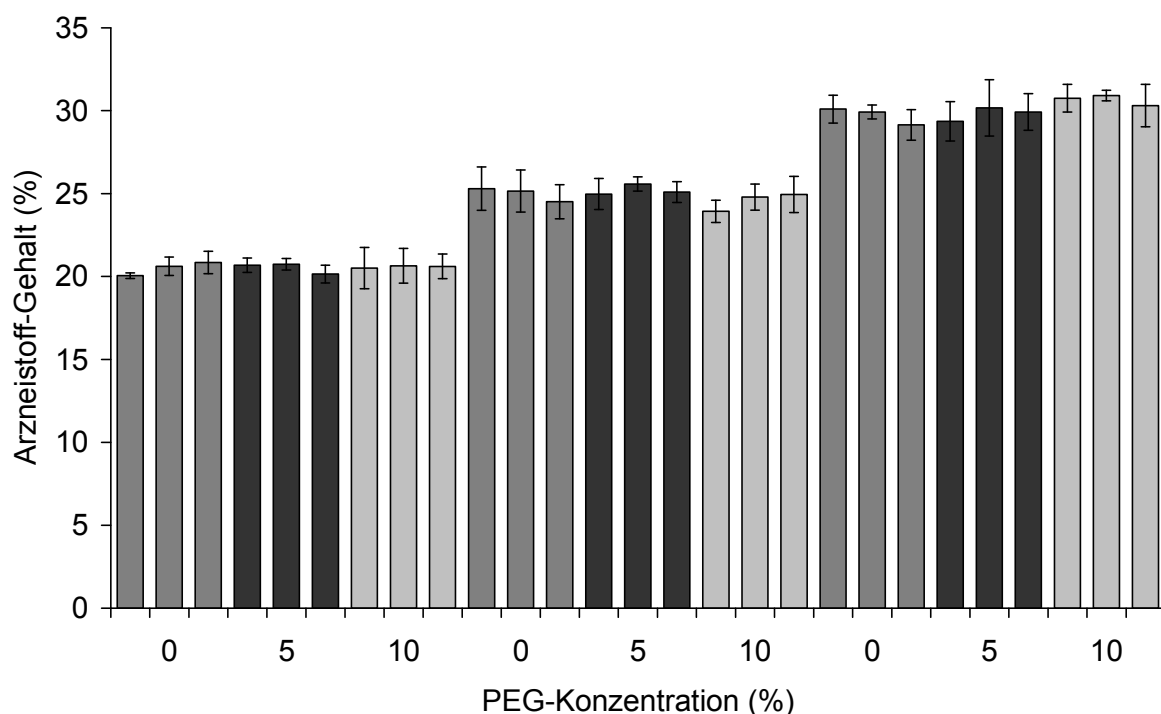


Abbildung 4.31: Mittelwerte der Gehaltsbestimmungen (n = 5) jeder Charge; drei Chargen pro Formulierung

Um die Reproduzierbarkeit des Herstellungsverfahrens der Extrudate beurteilen zu können, wurden die einzelnen Chargen a, b und c jeder Formulierung mit Hilfe der Software DesignExpert® auf signifikante Unterschiede hin verglichen. Die berechneten p-Werte sind in Tabelle 4.11 aufgeführt. Ein p-Wert > 0,1 weist darauf hin, dass sich die Chargen nicht signifikant unterscheiden, während bei Werten < 0,05 ein

signifikanter Unterschied zwischen den Chargen besteht. Werte zwischen 0,05 und 0,1 (grauer Kasten) lassen keine genaue Aussage zu. Die berechneten p-Werte liegen bis auf zwei Ausnahmen oberhalb von 0,1, womit sich die Chargen nicht signifikant voneinander unterscheiden. Zwei p-Werte liegen zwischen 0,05 und 1 und erlauben somit keine Bewertung. Allerdings weist bei beiden Fällen jeweils eine Charge eine sehr geringe Standardabweichung (< 0,5%) auf, worauf die niedrigen p-Werte zurückzuführen sind.

Tabelle 4.11: p-Werte der Chargen einer Formulierung im Vergleich

Formulierung	Charge a-b	Charge a-c	Charge b-c
20% GS, 0% PEG	0,1482	0,0518	0,5508
20% GS, 5% PEG	0,8688	0,1237	0,0931
20% GS, 10% PEG	0,8603	0,8914	0,9686
25% GS, 0% PEG	0,7560	0,1075	0,1806
25% GS, 5% PEG	0,4261	0,5759	0,8077
25% GS, 10% PEG	0,8024	0,5106	0,3688
30% GS, 0% PEG	0,8679	0,3846	0,4779
30% GS, 5% PEG	0,2502	0,8125	0,3532
30% GS, 10% PEG	0,1984	0,1264	0,7834

Die Herstellung der Pulvermischung mit Hilfe des Turbulamischers kombiniert mit der Durchmischung während der Extrusion führte zu homogenen Extrudaten mit gewünschten Arzneistoff-Konzentrationen. Es konnte damit gezeigt werden, dass sowohl die Gleichförmigkeit des Gehalts als auch eine gute Reproduzierbarkeit des Herstellungsverfahrens gegeben sind.

#### 4.4.3 FREISETZUNG

In den Vorversuchen und den Versuchen zur Modifizierung des Freisetzungsprofils wurde jede Formulierung aufgrund des hohen

Materialverbrauchs bei der Schmelzextrusion mit dem Einschneckenextruder nur einmal hergestellt (siehe Kapitel 3.2.1.3). Zur Bestätigung der zuvor beschriebenen Freisetzungverläufe und somit zur Überprüfung der Übertragbarkeit von der Herstellung mit dem Einschnecken- auf den Zweischneckenextruder wurden in der folgenden Untersuchung die Freisetzung aus den jeweils drei Chargen der Formulierungen mit 20% und 30% Arzneistoffgehalt durchgeführt. Zusätzlich wurden die Formulierungen mit 25% Gentamicinsulfat auf ihr Freisetzungsprofil hin untersucht (siehe Kapitel 4.4).

Die sigmoiden Profile der 20% Gentamicinsulfat-Formulierungen mit einer Freisetzung des Arzneistoffs über etwa 5 Wochen bestätigen die in den vorherigen Versuchen beschriebenen Verläufe (Abbildung 4.32).

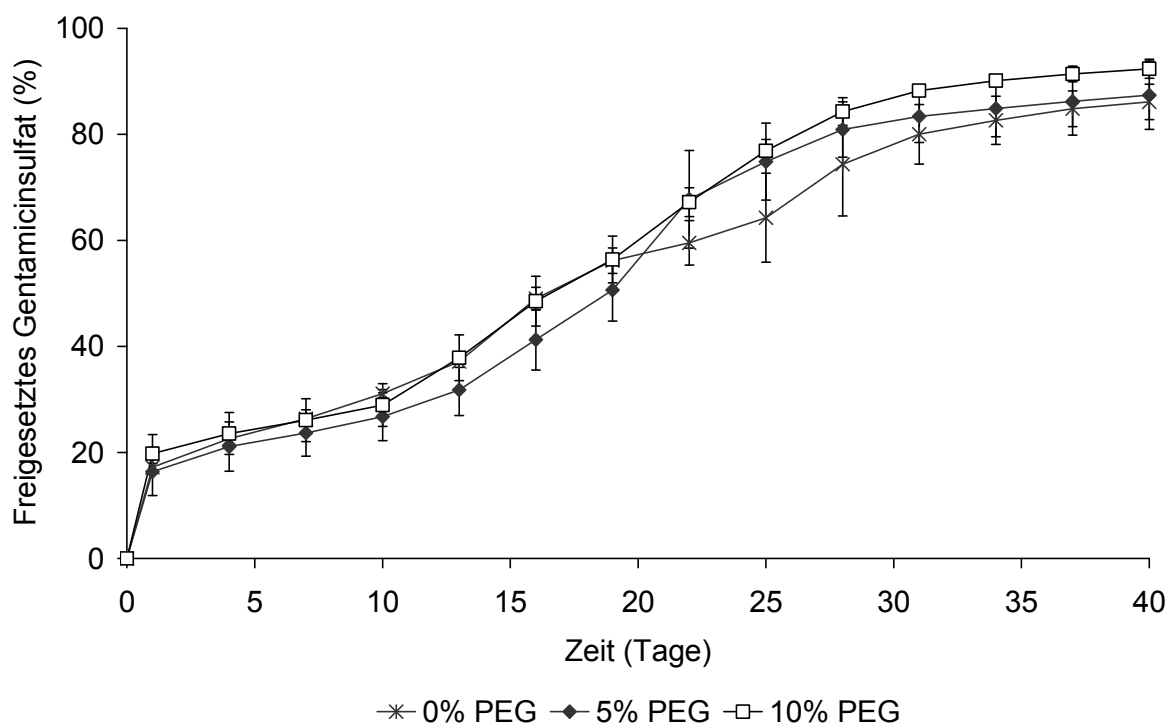


Abbildung 4.32: Freisetzungverläufe der Formulierungen mit 20% Gentamicinsulfat und steigender PEG-Konzentration

Die Formulierungen mit 25% Arzneistoff weisen den erwarteten Kurvenverlauf zwischen den sigmoiden Verlauf und der exponentiellen

Annäherungen der 20% beziehungsweise 30%-Ansätze auf (Abbildung 4.33).

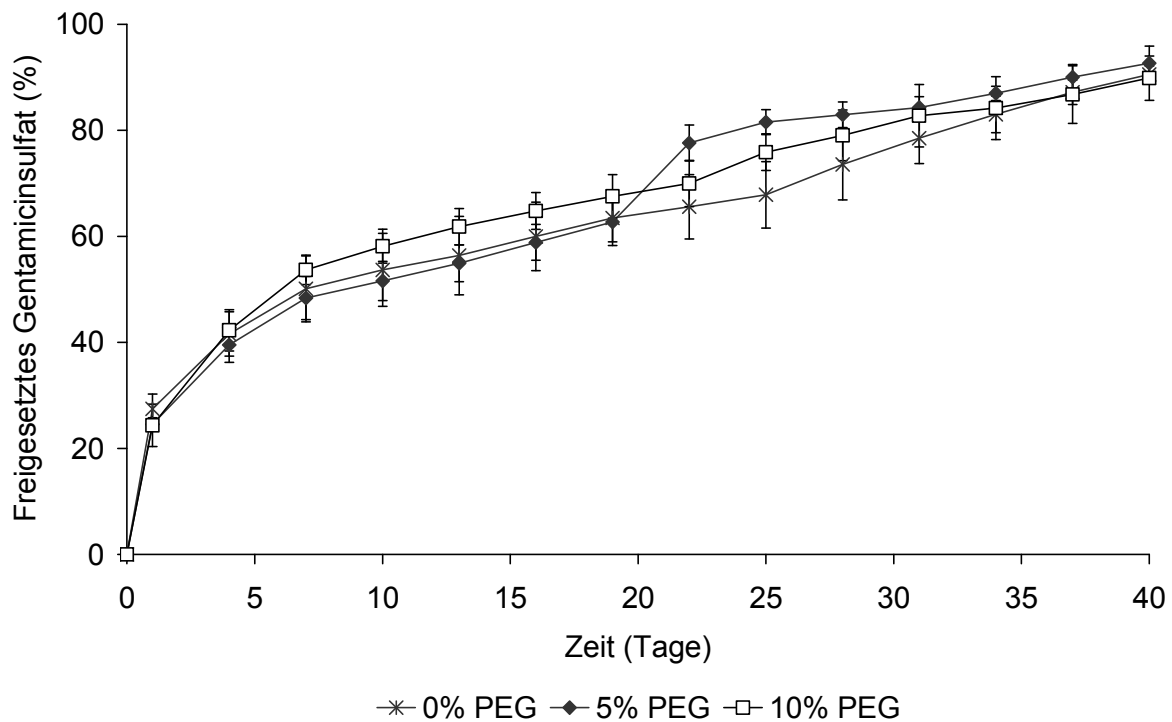


Abbildung 4.33: Freisetzungverläufe der Formulierungen mit 25% Gentamicinsulfat und steigender PEG-Konzentration

Die Profile dieser Zusammensetzungen zeigen hierbei eine lineare Freisetzung des Antibiotikums über vier Wochen mit einem initialen Bursteffekt, optimal für die lokale Therapie der chronischen Osteomyelitis (Zhang et al., 1994; Ambrose et al., 2003). So wird über die ersten sieben Tage ungefähr 50% des Sollgehalts freigesetzt und dann anschließend der verbliebene Arzneistoff gleichmäßig über vier Wochen. Über diesen Zeitraum weisen die Formulierungen mit 0 und 10% PEG 400 eine Kinetik 0. Ordnung mit einem Bestimmtheitsmaß von  $R^2 > 0,99$  auf. Die Formulierung mit 5% Weichmacher zeigt einen Anstieg in der Arzneistofffreisetzung nach 20 Tagen, übereinstimmend mit dem zeitlichen Beginn der Erosion der Extrudate (siehe Kapitel 4.4.5). Die äußere Hülle der Extrudate bleibt während der Freisetzung länger stabil, da im Inneren aufgrund des autokatalytischen Effekts das

Polymer schneller abgebaut wird. Wenn nach einer gewissen Zeit die Polymerbruchstücke so weit abgebaut sind, dass sie hindurchdiffundieren können oder die Poren der äußeren Hülle eine Größe erreicht haben, dass diese passieren können, beginnt die Erosion. Es kann allerdings auch der Fall eintreten, dass die äußeren Hüllen der Extrudate kollabieren, so dass eine größere Menge Arzneistoff freigesetzt wird. Vermutlich ist dies bei der Formulierung mit 25% Arzneistoff und 5% PEG 400 aufgetreten.

Entsprechend den Formulierungen mit 20% und weniger Arzneistoffanteil kann auch bei den 25% Gentamicinsulfat-Formulierungen kein Einfluss des PEG 400 auf das Freisetzungverhalten beobachtet werden.

Die Formulierungen mit 30% Arzneistoff zeigen in der Freisetzung, wie bereits beschrieben, einen mehr exponentiellen Verlauf, wobei mit höherem Weichmacher-Anteil die Freisetzung schneller erfolgt. Die Ursache für die scheinbare Beeinflussung des Profils durch das PEG 400 liegt darin begründet, dass durch Erhöhung des Weichmacheranteils die PLGA-Konzentration gesenkt wird. Bei 30% Gentamicinsulfat ist eine Grenzkonzentration des PLGAs erreicht, wo eine weitere Erniedrigung durch den Weichmacheranteil zu einer geringeren Retardierung und somit zu einer schnelleren Freisetzungsgeschwindigkeit führt. Obwohl die Charge mit 30% Gentamicinsulfat kombiniert mit 0% und 5% Weichmacher die gleiche PLGA-Konzentrationen aufweisen wie die Chargen mit 25% Arzneistoff und 5% und 10% Weichmacher, zeigen sie eine weniger retardierte Freisetzung. Dies kann durch den höheren Arzneistoffgehalt erklärt werden, der mehr Poren entstehen lässt und somit eine schnellere Freisetzung fördert.

Die Freisetzungsverläufe der 20%- und 30%-Arzneistoff-Formulierungen bestätigen somit die in den Einfachbestimmungen beobachteten Profile.



Auch ist eine Übertragbarkeit der Herstellung mit dem Einschnecken- auf den Zweisneckenextruder gegeben. Die Freisetzungen aus den 25% Arzneistoff-Extrudaten weisen außerdem ein optimales Profil mit einer Burstfreisetzung und einer gleichmäßigen Freisetzung über etwa vier Wochen auf.

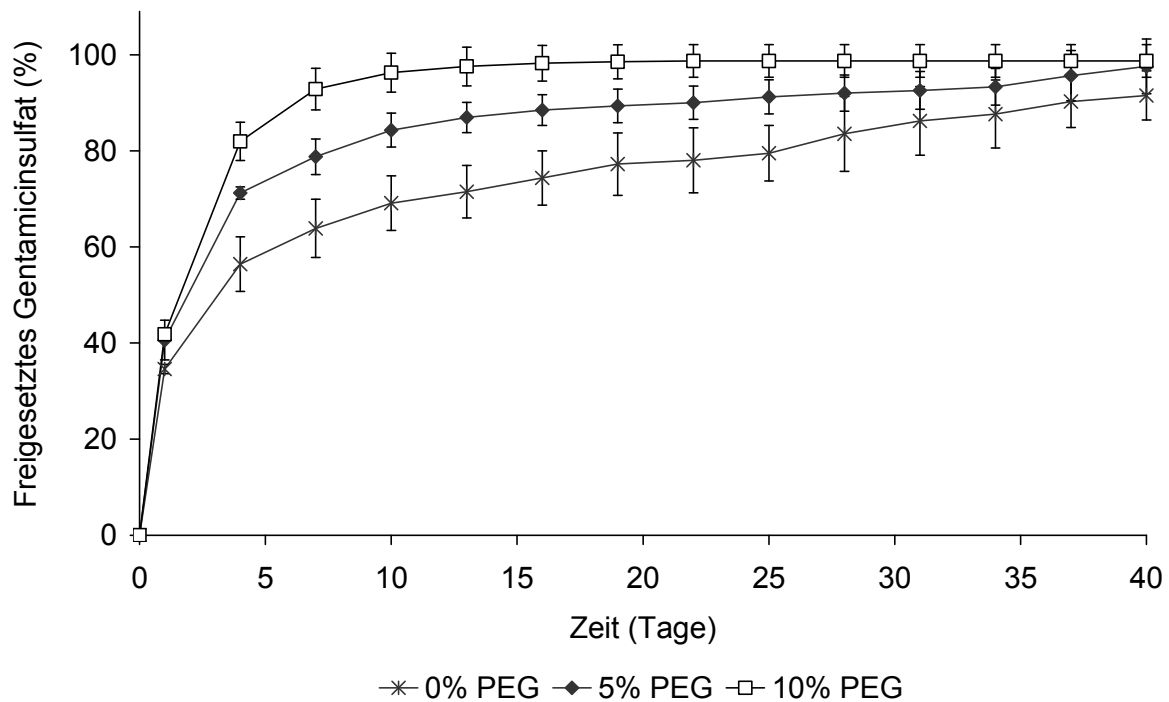


Abbildung 4.34: Freisetzungsverläufe der Formulierungen mit 30% Gentamicinsulfat und steigender PEG-Konzentration

#### 4.4.4 VERGLEICH MIT SEPTOPAL®

Ein radikales Débridement mit einer lokalen Antibiotika-Behandlung durch PMMA-Kugelketten beladen mit Gentamicinsulfat (zum Beispiel Septopal®) kombiniert mit einer systemischen Antibiotika-Therapie stellt die Behandlung der Wahl bei der chronischen Osteomyelitis dar (Faber et al., 2004). Aufgrund dessen wurde diejenige Formulierung mit dem optimalen Freisetzungsprofil (25% GS, 10% PEG) mit Septopal® verglichen (Abbildung 4.35).

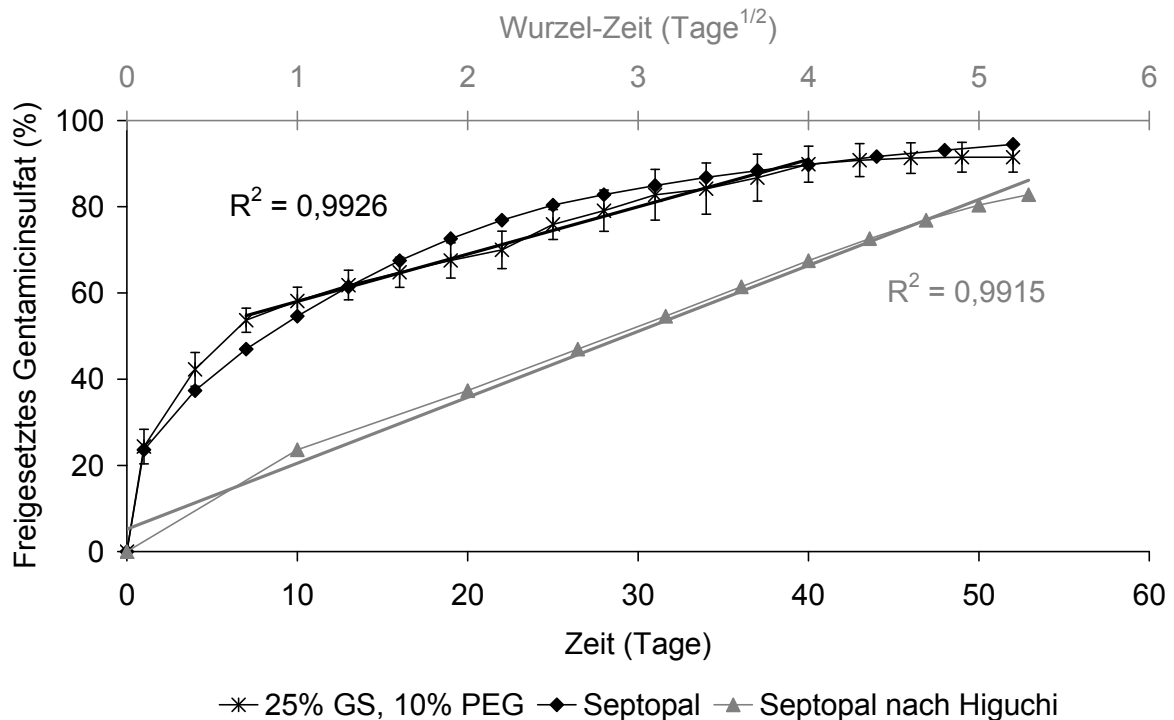


Abbildung 4.35: Freisetzungsverlauf von Septopal® im Vergleich zur Formulierung 25% Gentamicinsulfat und 10% PEG 400; Freisetzung von Septopal® gegen Wurzel Zeit nach Higuchi

Die diffusionskontrollierte Antibiotika-Freisetzung aus der nicht-bioabbaubaren PMMA-Matrix des Septopals® lässt sich dabei mit dem Quadratwurzelgesetz nach Higuchi (Bestimmtheitsmaß  $R^2 = 0,99$ ) beschreiben. Demnach ist die freigesetzte Wirkstoffmenge der Wurzel aus der Zeit proportional, da die Freisetzungsgeschwindigkeit aufgrund des länger werdenden Diffusionsweges im zeitlichen Verlauf abnimmt.

Die entwickelten Extrudate basierend auf dem bioabbaubaren Polymer PLGA und einer Arzneistoffkonzentration von 25% zeigen einen ähnlichen Verlauf, allerdings mit einer etwas höheren Freisetzung über die ersten sieben Tage und einer Freisetzung nullter Ordnung über die folgenden vier Wochen (Bestimmtheitsmaß  $R^2 = 0,99$ ).

Die absolut freigesetzten Gentamicinsulfat-Mengen des Septopals® und der Formulierungen mit 25% Gentamicinsulfat sind ebenfalls vergleichbar (Abbildung 4.36). Allerdings wird aus den PLGA-Extrudaten

über die erste Woche und über die dritte bis sechste Woche etwas mehr Gentamicinsulfat freigesetzt. Dabei sind drei Extrudate mit 25% Gentamicinsulfat einer Septopal<sup>®</sup>-Kugel (enthält 7,5 mg GS) pharmazeutisch äquivalent. Dessen ungeachtet liegen sowohl die freigesetzten Wirkstoffmengen des Septopals<sup>®</sup> als auch der 25%-Formulierungen weit oberhalb der minimalen Hemmkonzentration von Gentamicinsulfat gegenüber *S. aureus* (Kresken et al., 2006), dem Hauptkeim der chronischen Osteomyelitis (vergleiche Kapitel 2.1.4). Die Extrudate mit 25% Gentamicinsulfat sind somit vom Freisetzungprofil und von der freigesetzten absoluten Menge mit Septopal<sup>®</sup> vergleichbar ohne den Nachteil des nicht-biobaubaren Matrixsystems und der damit verbundenen zweiten Operation zur Entfernung aufzuweisen.

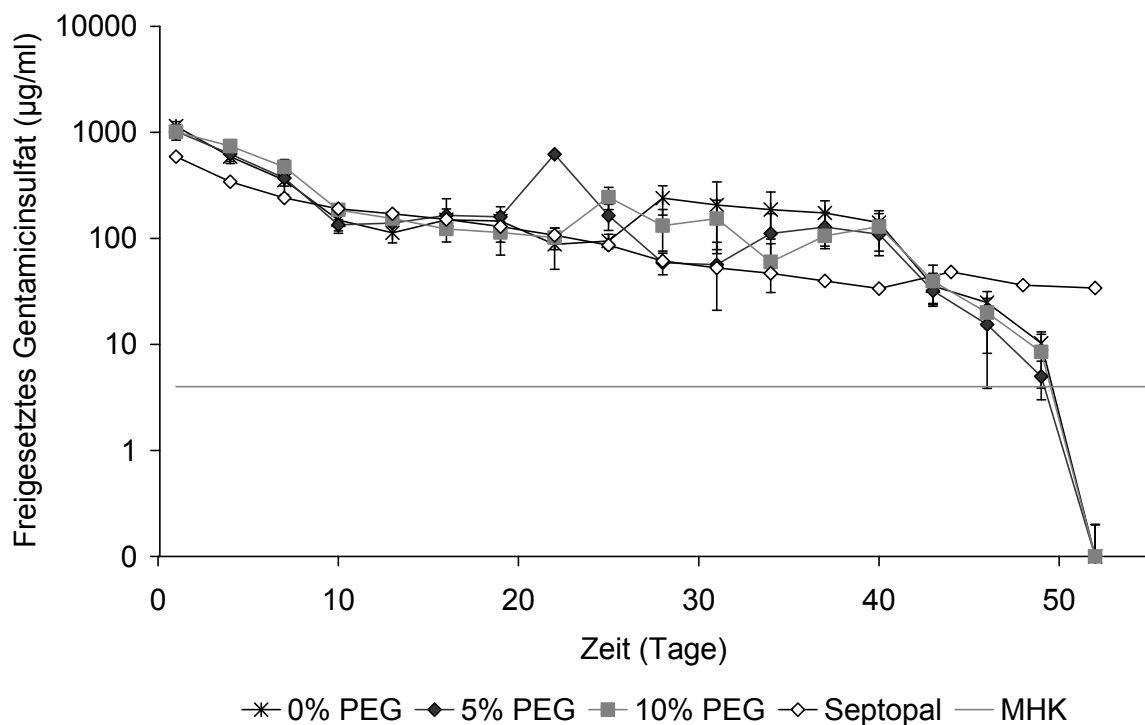


Abbildung 4.36: Absolut freigesetztes Gentamicinsulfat der 25%-Formulierungen und Septopal<sup>®</sup> im Vergleich zur MHK von *S. aureus* (4 µg/ml)

#### 4.4.5 DEGRADATION DER EXTRUDATE

Bioabbaubare Polymere zeigen entweder eine Oberflächen- oder eine Bulkerosion der Matrix, wobei die Art des Erosionsmechanismus von folgenden Eigenschaften abhängt (von Burkersroda et al., 2002):

- Geschwindigkeit der Wasserdiffusion in die Matrix
- Degradationsgeschwindigkeit
- Dimension der Matrix

Wenn die Diffusion des Wassers in die Polymermatrix schneller als der Polymerabbau erfolgt, unterliegt das Polymer einer Bulkerosion, da der Abbau nicht nur auf die Oberfläche begrenzt ist. Dagegen weisen Polymere mit einem schnellen Abbau und einer langsamen Wasserdiffusion in die Matrix eine Oberflächenerosion auf. Die Dimension der Matrix kann insofern eine große Rolle spielen, als dass jedes bioabbaubare Polymer ab einer gewissen Größe der Matrix eine Oberflächenerosion aufweist (Siepmann und Siepmann, 2010). PLGA-basierte Matrices unterliegen im Allgemeinen einer Bulkerosion, bei der das Polymer theoretisch gleichmäßig über die gesamte Matrix abgebaut wird. Allerdings weisen größere PLGA-basierte Arzneistoffträgersysteme, wie zum Beispiel Implantate, eine Besonderheit auf. So entstehen beim Abbau des Polymers kürzerkettige Säuren, die aufgrund ihrer Größe zunächst nicht aus dem Inneren der Matrix heraus diffundieren können und somit den pH-Wert senken. Ein saurer pH-Wert katalysiert die Esterhydrolyse des Polymers, so dass im Inneren ein beschleunigter Polymerabbau auftritt. Da die an der Oberfläche entstehenden sauren Gruppen zum einen ins Medium diffundieren können und zum anderen durch eindringendes Medium neutralisiert werden, erfolgt der Abbau an der Oberfläche langsamer. Der Polymerkörper behält zunächst seine Gestalt. Die Erosion der Matrix weist daher eine lag-Phase auf, denn erst wenn ein kritischer Punkt der

Degradation erreicht ist und Polymerbruchstücke durch ein Netzwerk von Poren herausdiffundieren können, beginnt die Erosion.

Um den Einfluss der Komponenten Gentamicinsulfat und PEG 400 auf das Degradationsverhalten der Polymere charakterisieren zu können, wurden die Quellung und der Masseverlust der Extrudate sowie die Veränderung des pH-Wertes des Freisetzungsmediums untersucht.

Wenn die Extrudate einem Freisetzungsmedium ausgesetzt werden, verändern sich diese visuell sichtbar während des Prüfzeitraums. Die Implantate schwellen an, wobei der Grad der Massezunahme von der Zusammensetzung der Extrudate abhängt (Abbildung 4.37). Es lässt sich vermuten, dass durch eine stärkere Quellung der Extrudate, also eine schnellere Diffusion des Wassers in die Matrix, ein beschleunigter Polymerabbau stattfindet.

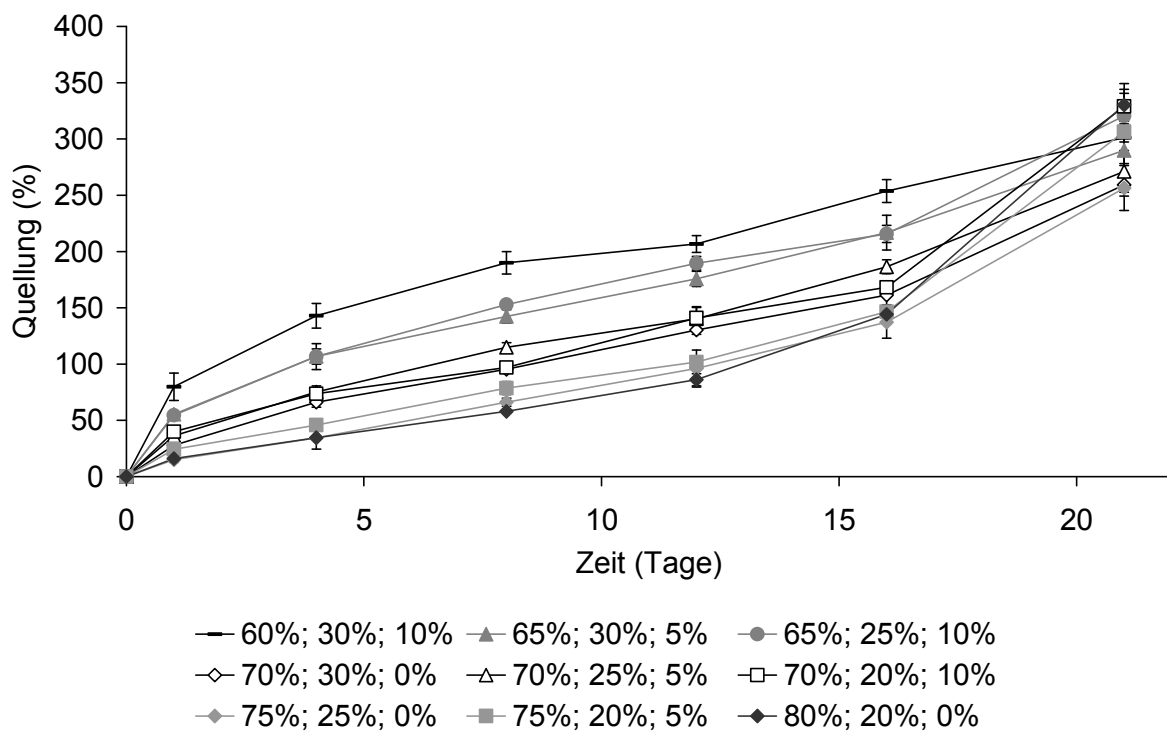


Abbildung 4.37: Quellung der Extrudate (Konzentrationsangaben: PLGA; Gentamicinsulfat; PEG 400)

Betrachtet man das Quellungsverhalten der Extrudate, wird deutlich, dass die Wasserdiffusion in die Polymermatrix in den ersten 16 Tagen

hauptsächlich von der PLGA-Konzentration abhängt. Je niedriger der PLGA-Gehalt der Formulierungen ist, desto schneller quellen die Extrudate. Es ist dabei weitestgehend unerheblich, ob die niedrige PLGA-Konzentration durch einen hohen Arzneistoff- oder einen hohen Weichmacher-Anteil bedingt wird. Vermutlich kann durch das eingebettete hydrophile Gentamicinsulfat und PEG 400 das Freisetzungsmedium leichter in die relativ hydrophobe Polymermatrix eindringen. Bei einem hohen Arzneistoff-Anteil wird außerdem eine Perkolationschwelle überschritten, so dass durch herausgelösten Arzneistoff Poren entstehen, durch die das Wasser leichter ins Innere der Extrudate diffundieren kann und somit eine stärkere Quellung hervorruft.

Während die Quellung der Extrudate von dem PLGA-Anteil abhängig ist, zeigt sich bei dem Masseverlust zunächst ein Zusammenhang mit der Arzneistoffkonzentration (Abbildung 4.38). Die 20% Gentamicinsulfat-Formulierungen weisen zu Beginn eine Massezunahme auf, die wahrscheinlich auf nicht vollständig getrocknete Extrudate nach der Gefriertrocknung zurückzuführen sind. Davon abgesehen zeigen die Extrudate während der ersten zwei bis drei Wochen im Freisetzungsmedium einen Masseverlust entsprechend der freigesetzten Arzneistoffmenge. So unterscheiden sich analog den Freisetzungsprofilen die Masseverluste der 20% und 25%-Formulierungen nicht mit zunehmender PEG 400-Konzentration. Lediglich bei den Formulierungen mit 30% Arzneistoff ist eine schnellere Masseabnahme bei höherem PEG 400-Anteil entsprechend der schnelleren Wirkstofffreisetzung zu beobachten. Um diese Abhängigkeit zu verdeutlichen, sind in Abbildung 4.39 die Masseverluste von zwei Formulierungen ihren Freisetzungsverläufen gegenübergestellt. Die Formulierung mit 25% Arzneistoff hat nach 16 Tagen einen Masseverlust von 14,1%. Zum gleichen Zeitpunkt

war bei den Freisetzungsversuchen 60% des Gentamicinsulfats freigesetzt, was einer Masse von 15% der Extrudate entspricht. Gleichermaßen gut korreliert der Masseverlust der 30%-Formulierung, die nach 16 Tagen einen Masseverlust von 24,6% zeigt, mit den 74,4% freigesetzter Menge Arzneistoff, das eine Masse von 22,3% des Extrudates darstellt.

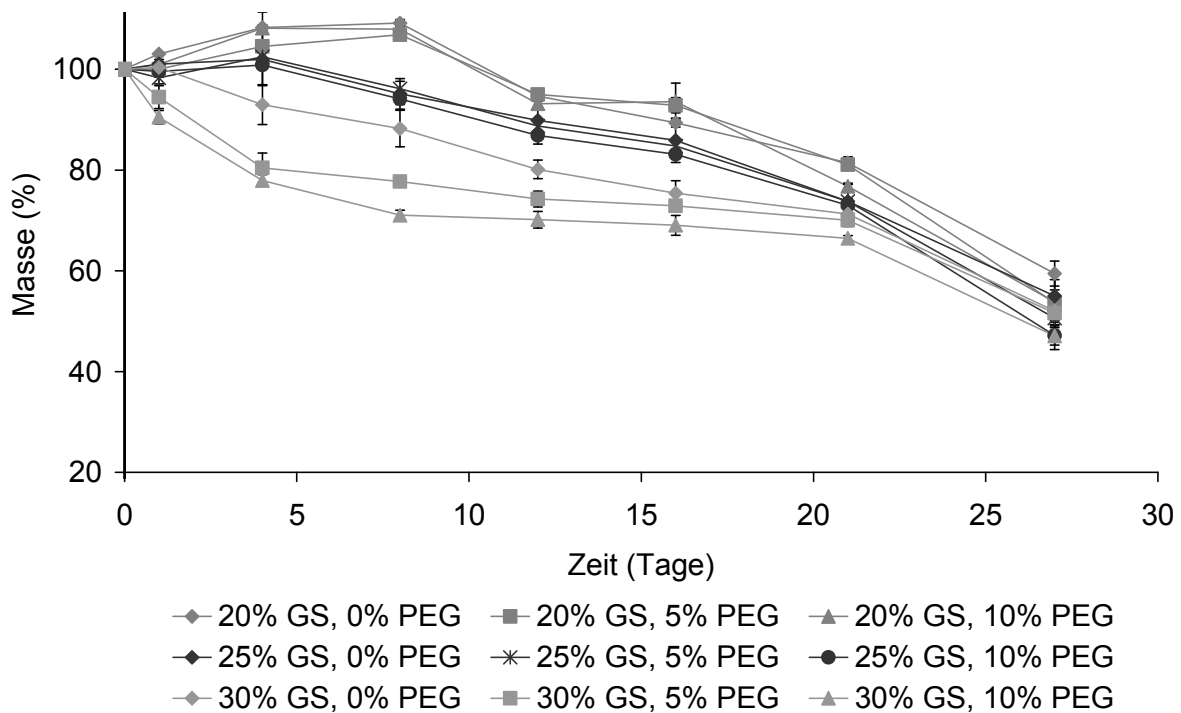


Abbildung 4.38: Masseverlust der Extrudate

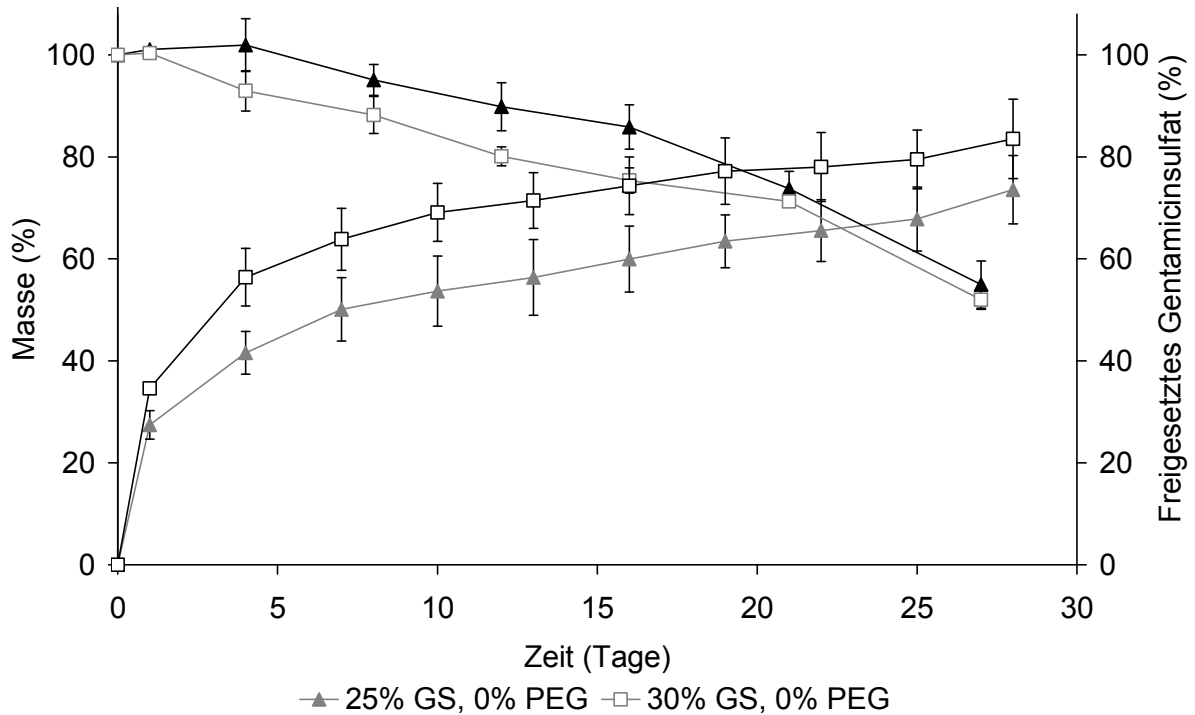


Abbildung 4.39: Masseverlust von zwei Formulierungen im Vergleich zur Arzneistofffreisetzung

Darüber hinaus lässt sich anhand des Masseverlustes der Beginn der Erosion der Extrudate nach etwa 16 Tagen und deutlicher nach 21 Tagen erkennen, der weitestgehend unabhängig von der Zusammensetzung der Formulierungen ist. Der Start der Erosion wirkt sich auch auf den pH-Wert des Freisetzungsmediums aus (Abbildung 4.40 und Abbildung 4.41). So bleibt der pH-Wert zunächst im Verlauf der Freisetzung über die ersten drei Wochen nahezu unverändert, nach 19 Tagen beginnt dieser jedoch stark abzufallen (von pH 7,4 auf  $< 4$ ). Die Erniedrigung des pH-Wertes wird durch die sauren Polymerbruchstücke hervorgerufen, die mit Beginn der Erosion aus der Matrix freigesetzt werden. Der Start der Erosionsphase dieser Extrudate ist dabei unabhängig sowohl von der Arzneistoffkonzentration (Abbildung 4.40) als auch vom PEG 400-Gehalt (Abbildung 4.41).



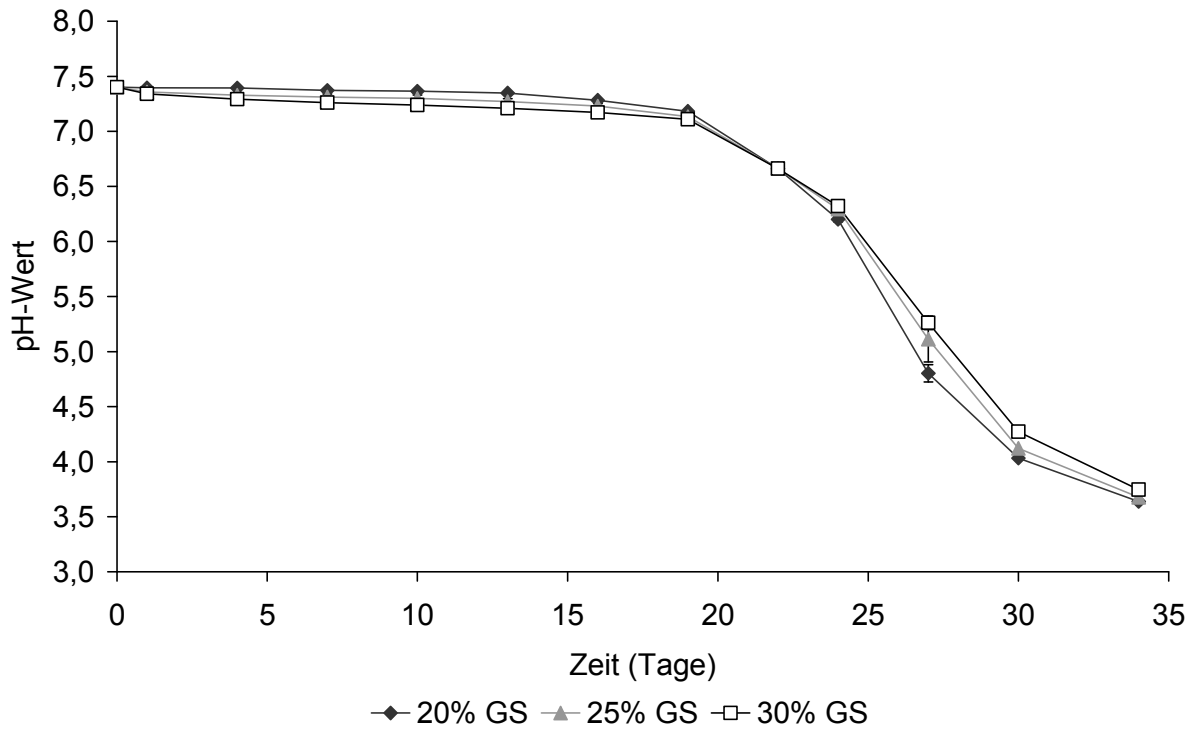


Abbildung 4.40: pH-Wert-Verlauf von Freisetzungsmitteln mit Formulierungen ohne Weichmacher und steigender Arzneistoffkonzentration

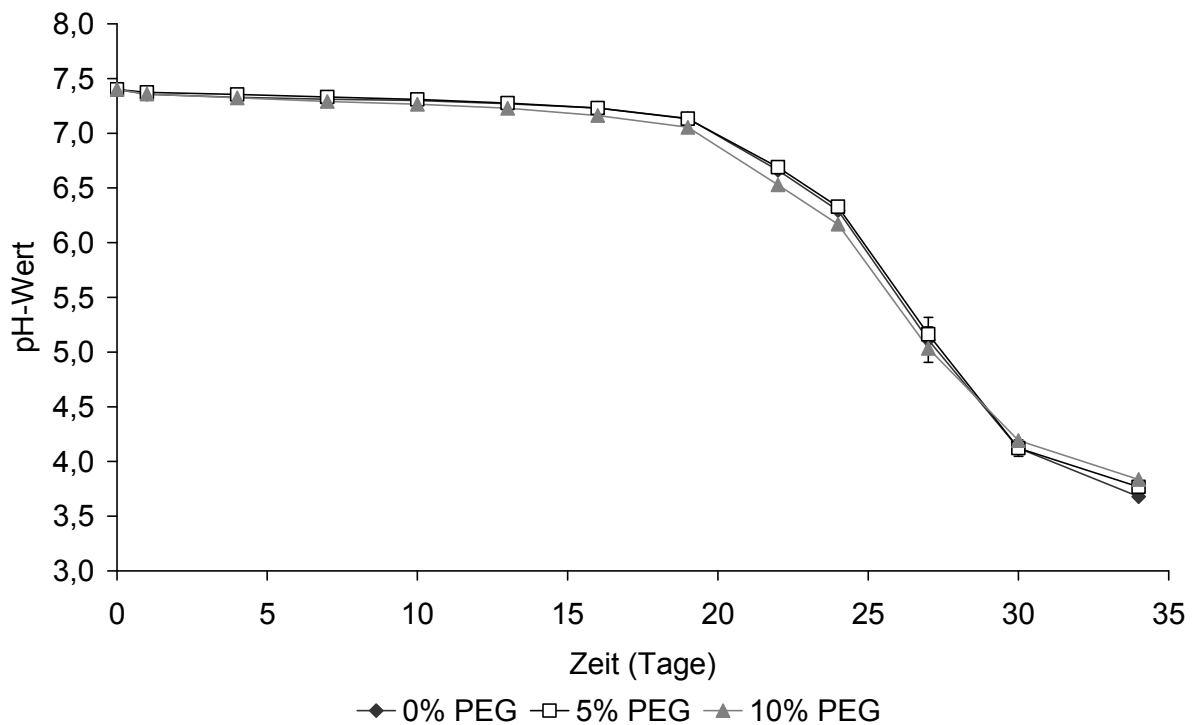


Abbildung 4.41: pH-Wert-Verlauf von Freisetzungsmitteln mit Formulierungen mit 25% Gentamicinsulfat und steigender Weichmacherkonzentration

Die Ergebnisse zeigen somit, dass trotz der unterschiedlichen Ausprägung und Geschwindigkeit der Quellung der Extrudate der Beginn der Erosionsphase unverändert bleibt. Als Ursache für den fehlenden Zusammenhang ist die relativ hohe Gentamicinsulfat- und die niedrige PLGA-Konzentration zu betrachten. Durch den hohen Anteil des leichtlöslichen Arzneistoffs entstehen schnell viele Poren, durch die das Wasser sehr leicht in die Matrix eindringen kann. Außerdem ist die Matrix der Extrudate durch den geringen Polymeranteil weniger fest und dicht. Die Wasserdiffusion ins Innere erfolgt somit bei allen Extrudaten schneller als der Abbau des Polymers. Aufgrund dessen bestehen keine Unterschiede bezüglich des Degradationsverhaltens dieser Extrudate verursacht durch die Komponenten und deren Konzentrationen, da gleichmäßig über die gesamte Matrix ein Polymerabbau der gleichen Geschwindigkeit nach einer Kinetik erster Ordnung abläuft (Witt et al., 2000). Bei einem Auftreten einer Verzögerungsphase der Wasserdiffusion in die Polymermatrix setzt die Erosionsphase später ein (Bittner et al., 1999). Dieses Phänomen konnte bei den Formulierungen mit einem sehr geringen Arzneistoffanteil (zum Beispiel 10%) oder bei den Formulierungen mit der hydrophoben PLGA-Qualität beobachtet werden (siehe Kapitel 4.3.1 und 4.3.3.2). So setzte beispielsweise der Anstieg der Freisetzungsgeschwindigkeit, welcher den Beginn der Erosionsphase indiziert, bei den Extrudaten basierend auf dem PLGA-Polymer mit den hydrophoben Laurylendgruppen mehr als eine Woche später ein. Sobald jedoch mit Beginn der Freisetzung ein sofortiges Eindringen des Wassers in die Extrudatmatrix möglich ist, ist die Degradation des Polymers der geschwindigkeitsbestimmende Schritt und der Start der Erosion findet zum gleichen Zeitpunkt statt.

#### **4.4.6 OBERFLÄCHENMORPHOLOGISCHE BETRACHTUNGEN DER EXTRUDATE**

Um den Degradationsverlauf der Extrudate auch visuell sichtbar zu machen, wurden elektronenmikroskopische Aufnahmen der gefriergetrockneten Proben angefertigt (Abbildung 4.42 bis Abbildung 4.45). Dazu wurden Formulierungen mit 25% Gentamicinsulfat zum einen ohne Weichmacher und zum anderen als Vergleich mit 10% PEG 400 ausgewählt. Betrachtet man zunächst die Bilder mit der 500-fachen Vergrößerung von Tag 1 und 4 (Abbildung 4.42 und Abbildung 4.44), fallen die unterschiedlichen Oberflächenstrukturen der Extrudate mit und ohne Weichmacher auf. Die Oberflächen der Extrudate weisen zwar ungefähr den gleichen Grad an Unregelmäßigkeiten bedingt durch den inkorporierten Arzneistoff auf, aber die Rauigkeiten der Oberflächen unterscheiden sich. Diese ist bei den Extrudaten mit Weichmacher rauer und weniger glatt, wobei diese Textur vermutlich durch das eingearbeitete PEG 400 hervorgerufen wird. Weiterhin lassen sich auf diesen Bildern deutliche Hohlräume erkennen, aus denen Gentamicinsulfat-Partikel herausgelöst worden sind. Die Ränder dieser Löcher sind mit zunehmender Zeit der Extrudate im Freisetzungsmedium weniger definiert. Bei Betrachtung der Bilder in 50-facher Vergrößerung im zeitlichen Verlauf kann zudem eine Zunahme an Poren und eine Vergrößerung der Poren beobachtet werden (deutlicher erkennbar in Abbildung 4.44 und 4.45, hervorgehoben durch Pfeile). Der Bruch des gefriergetrockneten und damit sehr fragilen Extrudates in der 50-fachen Vergrößerung von Tag 1 in Abbildung 4.44 ist während der Anfertigung der Aufnahmen aufgetreten und somit nicht von weiterer Bedeutung. Mit der Gesamtheit der Bilder wird die Degradation der Extrudate im Zeitverlauf durch Zunahme der Unregelmäßigkeiten, der Anzahl und Größe der Poren und letztendlich durch Verlust des Extrudatkörpers visuell sichtbar.

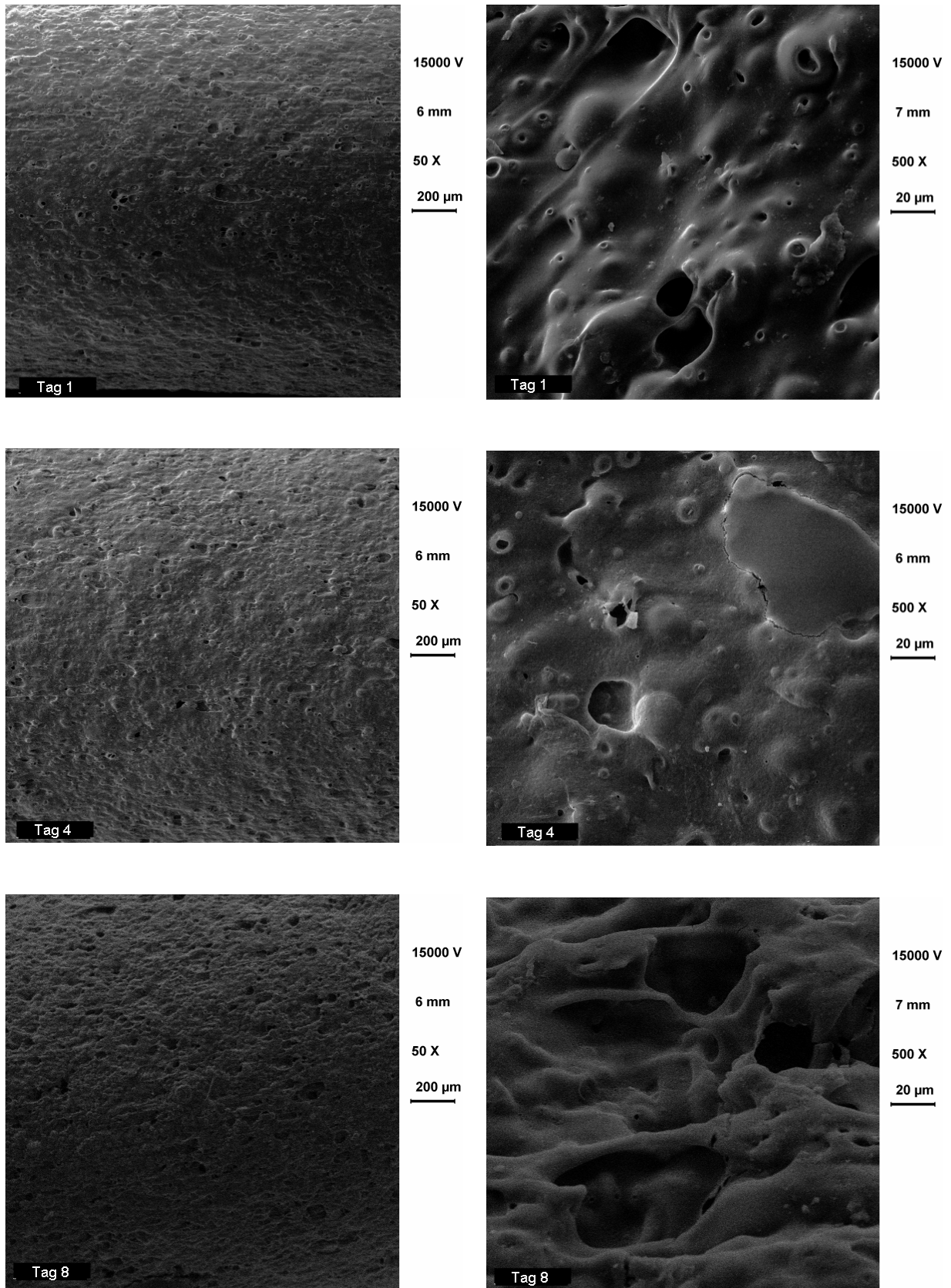


Abbildung 4.42: Degradationsverlauf der Extrudate mit 25% Gentamicinsulfat und ohne PEG 400; Tag 1, 4 und 8

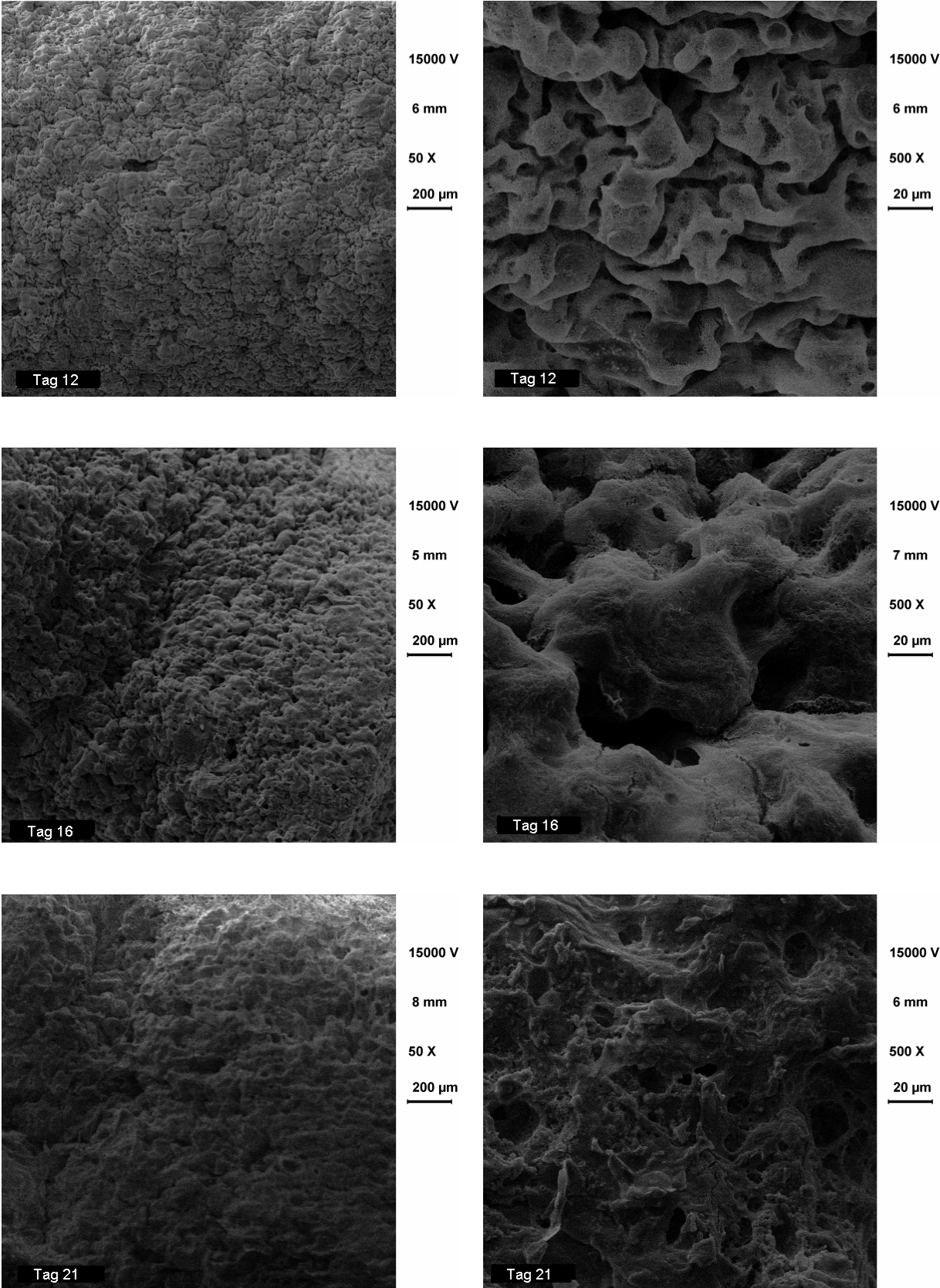


Abbildung 4.43: Degradationsverlauf der Extrudate mit 25% Gentamicinsulfat und ohne PEG 400; Tag 12, 16 und 21

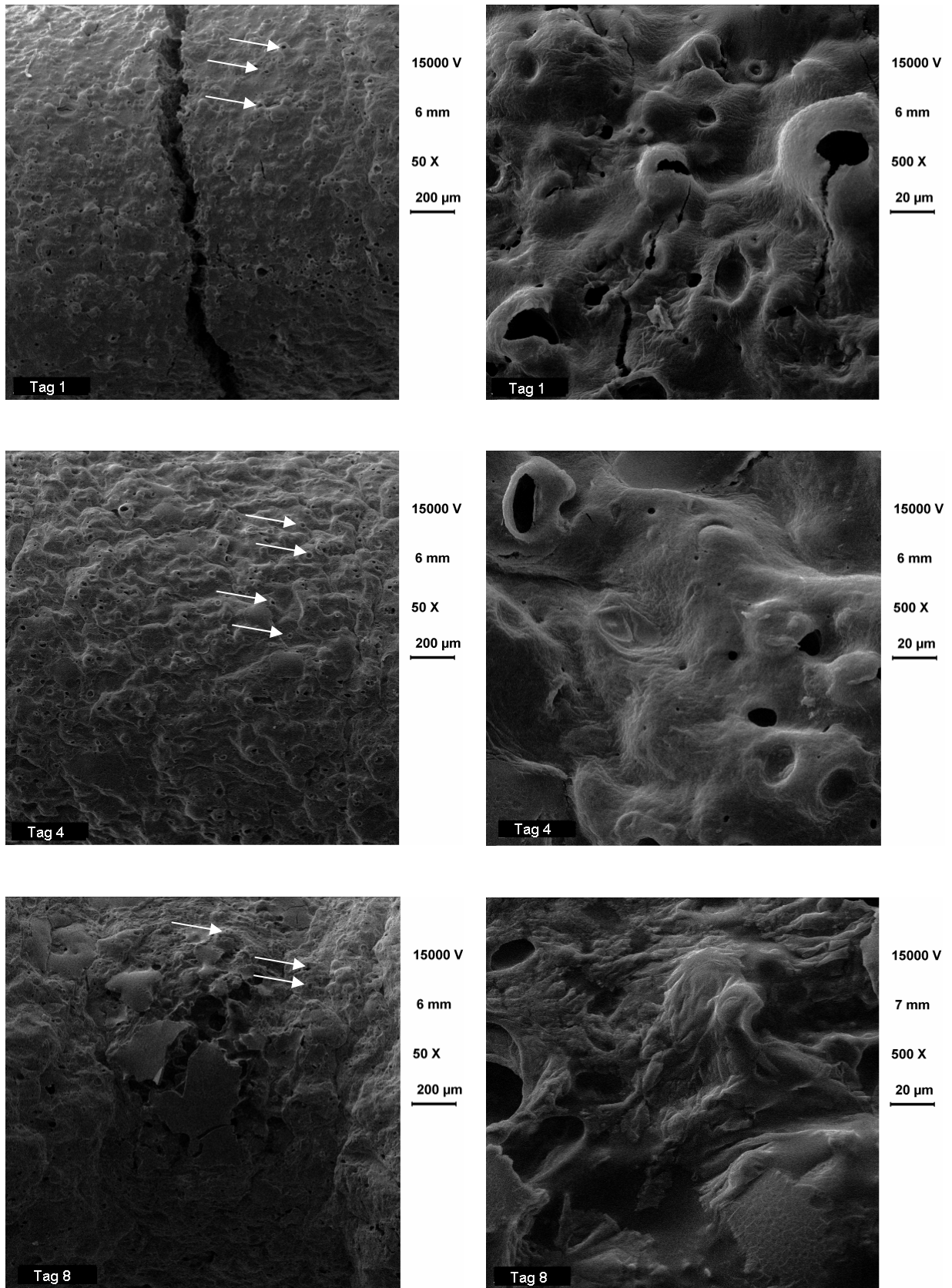


Abbildung 4.44: Degradationsverlauf der Extrudate mit 25% Gentamicinsulfat und 10% PEG 400; Tag 1, 4 und 8

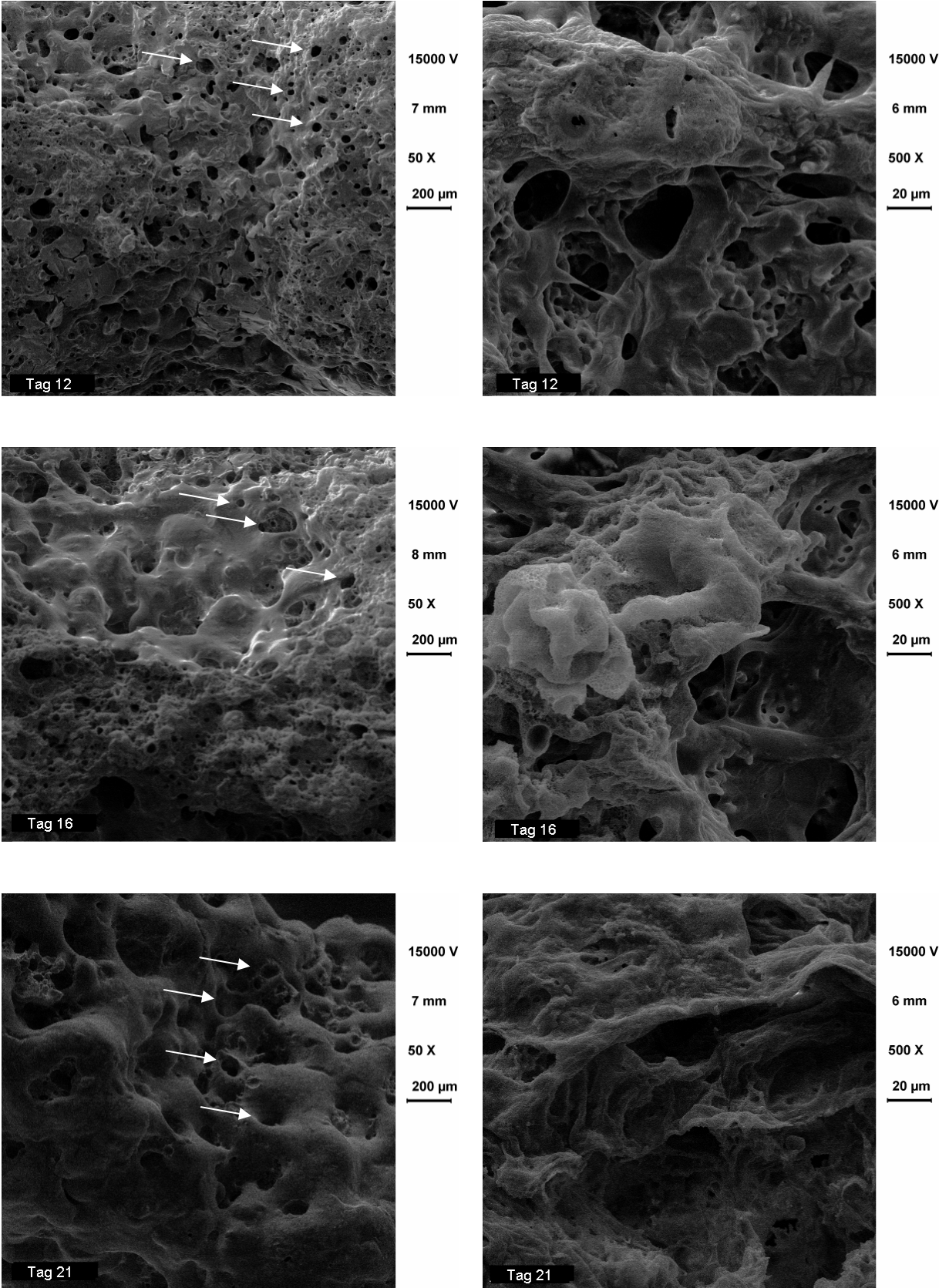


Abbildung 4.45: Degradationsverlauf der Extrudate mit 25% Gentamicinsulfat und 10% PEG 400; Tag 12, 16 und 21

#### **4.4.7 EINFLUSS EINER STRAHLENSTERILISATION**

Da parenterale Depotarzneiformen sterilisiert werden müssen, wurde der Einfluss einer Strahlensterilisation auf die Extrudate untersucht. Sterilisationsverfahren wie Dampf- und Heißluftsterilisation sind wegen des temperatur- und feuchtigkeitsempfindlichen Polymers nicht geeignet und einer aseptischen Herstellung wird die Sterilisation des Endprodukts vorgezogen. PLGA-basierte Arzneiformen werden aufgrund dessen in der Regel strahlensterilisiert. Die allgemeinen Vorteile einer Strahlensterilisation sind eine hohe Penetrierfähigkeit, geringe chemische Reaktivität, wenige messbare Rückstände und nur eine geringe Temperaturerhöhung während der Sterilisation (Fernandez-Carballido et al., 2006). Es ist allerdings auch bekannt, dass durch diese Form der Sterilisation chemische Veränderungen des Polymers wie Quervernetzung, Kettenspaltung, Radikalbildung und eine Verringerung des Molekulargewichts hervorgerufen werden können (Geze et al., 2001). Die Erniedrigung des Molekulargewichts wird dabei durch die Temperatur, die Strahlendosis und die Eigenschaften des inkorporierten Arzneistoffs und Hilfsstoffes beeinflusst (Hausberger et al., 1995). Aufgrund dieser verschiedenen Einflussfaktoren sind die Resultate hinsichtlich der Auswirkung der Strahlensterilisation auf die Eigenschaften der Arzneiform (zum Beispiel Stabilität, Freisetzung) sehr unterschiedlich. So zeigten Volland et al. (1994) eine erniedrigte Freisetzungsgeschwindigkeit von Captopril aus gammasterilisierten Mikropartikeln, während dagegen Yoshioka et al. (1995) eine erhöhte Progesteron-Freisetzungsrate aus gammasterilisierten Mikrospherulen feststellten. Auch Montanari et al. (2001) wiesen eine um 10% erhöhte Freisetzungsrate von Clonazepam aus Mikrospherulen nach eine Gammasterilisation mit 25 kGy auf. Keinen signifikanten Einfluss auf das Freisetzungsverhalten des Arzneistoffes (Melanotan) aus PLGA-



Implantaten durch Strahlensterilisation mit 25 kGy zeigten Bhardwaj et al. (1997).

Wie aus diesen Beispielen deutlich wird, ist eine Prognose des Einflusses auf das Freisetzungsverhalten nach Strahlensterilisation äußerst schwierig. Um die Auswirkung einer Sterilisation auf die entwickelten Implantate zu untersuchen, wurden sowohl Gehaltsbestimmungen (Abbildung 4.46) als auch Freisetzungsversuche nach einer Gamma-Strahlensterilisation durchgeführt.

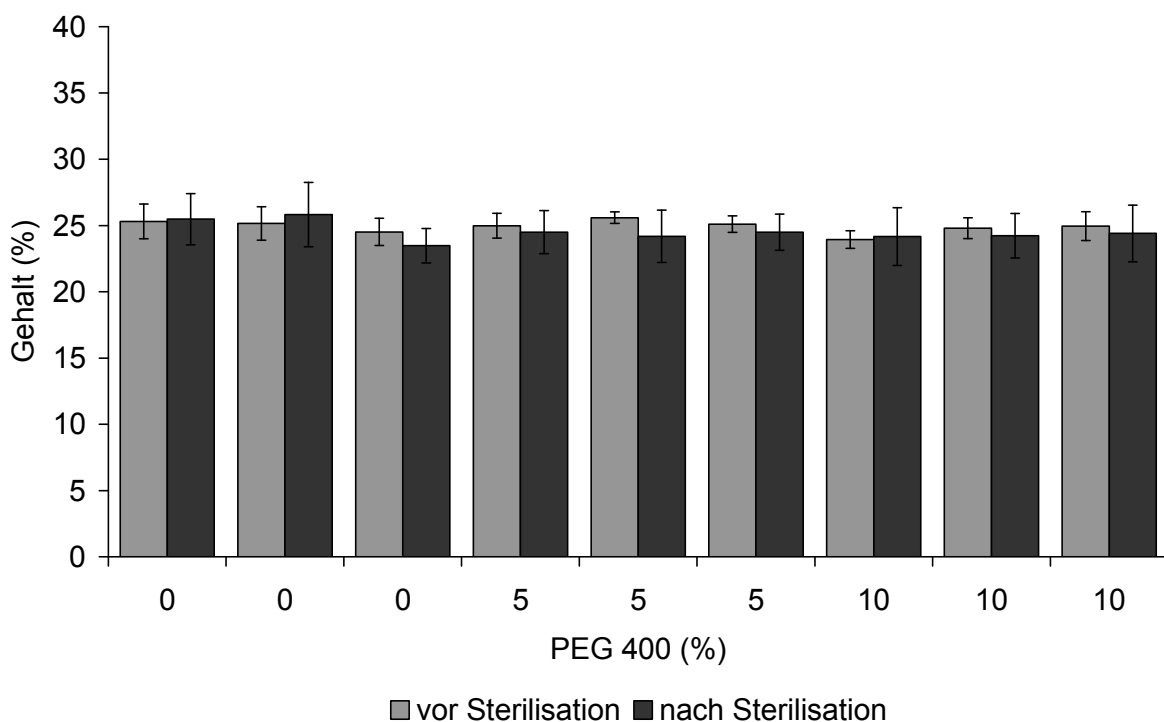


Abbildung 4.46: Gehaltsbestimmungen der jeweils drei Chargen der 25% Gentamicinsulfat-Formulierungen mit steigender PEG 400-Konzentration vor und nach der Sterilisation, n = 5

Die Extrudate weisen keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich des Gehalts an Gentamicinsulfat nach der Sterilisation auf. Dies stimmt mit den Erkenntnissen von Friess et al. (2006) überein, die ebenfalls keinen signifikanten Aktivitätsverlust von Gentamicinsulfat (UV-Detektion und mikrobiologische Aktivitätsbestimmung) durch Gamma-Strahlen beobachten konnten.

Bei Betrachtung der Freisetzungprofile vor und nach der Sterilisation (Abbildung 4.47) kann jedoch ein Einfluss beobachtet werden. Nach der Sterilisation zeigen die Verläufe ein leicht sigmoides Profil, ähnlich wie es bei den 20% Formulierungen aufgetreten war. Die Freisetzungsgeschwindigkeit während der ersten Phase (Diffusionsphase) ist etwa 10% bis 20% geringer, indessen die Freisetzungsrate bei Beginn der Erosionsphase höher ist. Obgleich sich das Profil leicht verändert hat, zeigen die Verläufe auch nach der Sterilisation eine gleichmäßige und weit oberhalb der MHK von *S. aureus* liegende Wirkstofffreisetzung über ungefähr fünf Wochen mit einer Burst-Freisetzung zu Beginn.

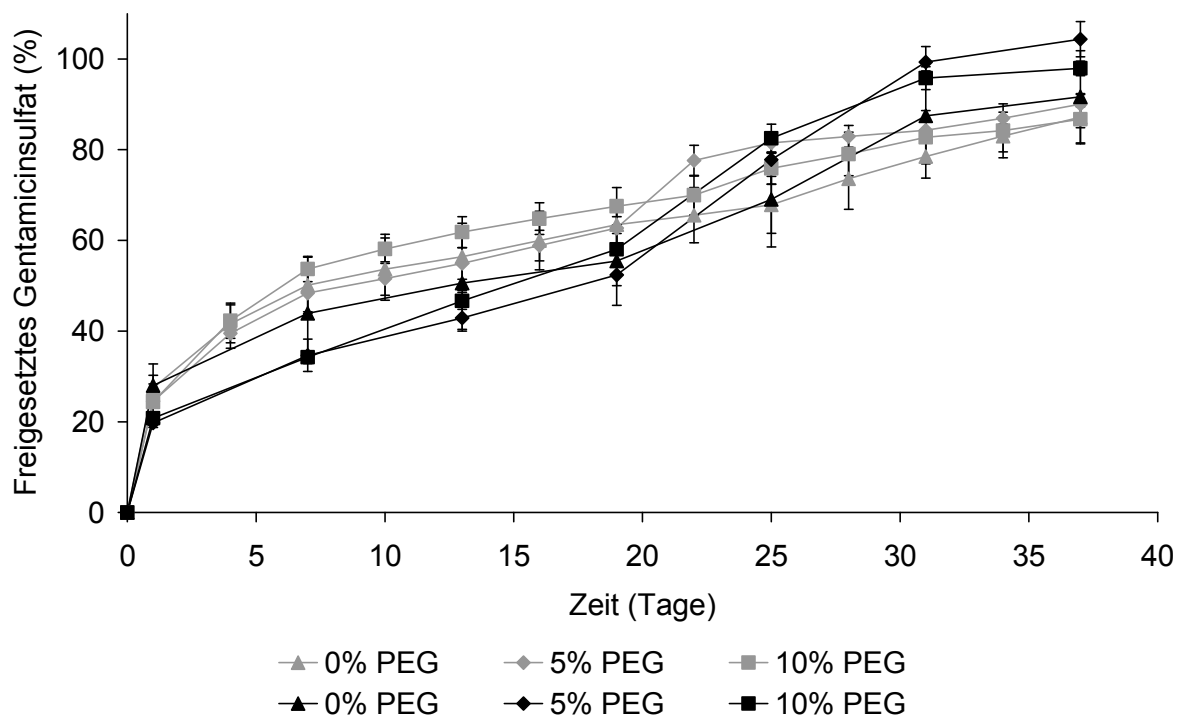


Abbildung 4.47: Freisetzungverläufe der Formulierungen mit 25% Gentamicinsulfat mit steigender Weichmacher-Konzentration vor (helle Symbole) und nach (dunkle Symbole) der Sterilisation

### 4.5 ZUSAMMENFASSUNG DES KAPITELS

Zur Entwicklung Gentamicinsulfat-beladener PLGA-Implantate wurde der Einfluss von Weichmachern zum einen auf die Prozessierbarkeit bei der Herstellung durch Schmelzextrusion und zum anderen auf die Eigenschaften der Arzneiform untersucht.

Dazu wurden zunächst in Vorversuchen die Mischbarkeit und Weichmachereffizienz verschiedener Weichmacher analysiert. Triethylcitrat, Tributylcitrat und PEG 400 wurden aufgrund einer guten Mischbarkeit und Effizienz für erste Versuche zur Herstellung durch Schmelzextrusion und zur Freisetzung ausgewählt. Nach Herstellung der Extrudate liegt das Gentamicinsulfat als stabile amorphe Präzipitation in dem Polymer vor. Bei den Studien zur Freisetzung des Gentamicinsulfats aus den Extrudaten zeigte sich das typische dreiphasige Profil einer PLGA-basierten monolithischen Arzneiform mit einer Burstfreisetzung, einer Verzögerungsphase und einer erhöhten Freisetzung mit Beginn der Erosion der Matrix. Die lange lag-Phase mit einer sehr geringen Arzneistoffliberation konnte durch drei verschiedene Ansätze verkürzt werden. Der Austausch der relativ hydrophoben gegen eine hydrophilere PLGA-Qualität, die anstelle von Laurylgruppen Carboxylendgruppen aufweist, bewirkte eine signifikante Verkürzung der lag-Phase. Des Weiteren führte eine Erhöhung der Arzneistoffkonzentration aufgrund von Porenbildung durch den leichtlöslichen Arzneistoffs ebenfalls zu einer Verkürzung, ab einer Konzentration von >20% auch zur vollständigen Elimination der Verzögerungsphase.

Der dritte Ansatz zur Verringerung der lag-Phase war der Zusatz der Weichmacher, wobei sich der Einfluss von Tributylcitrat und PEG 400 stark unterschied (Triethylcitrat wurde wegen des ähnlichen

Freisetzungsvorgang mit Tributylcitrat in den Vorversuchen nicht weiter untersucht).

Während beide Weichmacher die Glasübergangstemperatur des PLGAs stark senken und somit eine Extrusion bei niedrigeren Temperaturen erlauben, ist der Effekt auf das Freisetzungsprofil unterschiedlich. Tributylcitrat verbleibt während der Freisetzung in den Extrudaten und senkt damit über den gesamten Zeitraum die Glasübergangstemperatur des PLGAs. Durch die höhere Mobilität und Flexibilität der Polymerketten ist die Diffusion in der Matrix erleichtert, so dass das Gentamicinsulfat schneller freigesetzt wird. Aber das Polymer wird auch aufgrund der höheren Kettenmobilität schneller abgebaut, so dass die gesamte Abgabe des Arzneistoffs bei linearer Freisetzung über nur 19 Tage erfolgte.

PEG 400 dagegen diffundiert während der Freisetzung sehr schnell aus den Extrudaten, so dass die Glasübergangstemperatur des PLGAs wieder ansteigt. Die Freisetzungsvorgänge der Formulierungen mit Weichmacher unterscheiden sich damit nicht mehr von denen ohne Weichmacher; die Degradation erfolgt ohne Beschleunigung durch den Weichmacher und der Arzneistoff wird über fünf bis sechs Wochen freigesetzt. Die Formulierungen mit PEG 400 vereinen damit die Vorteile der möglichen Herstellung bei relativ niedrigen Temperaturen und eines präferierten Freisetzungsprofils bei einer Arzneistoffkonzentration von 25% über vier bis fünf Wochen nach einem Bursteffekt, das auch einen Vergleich mit dem etablierten Marktprodukt Septopal<sup>®</sup> hervorragend standhält.

Bei der weiteren Charakterisierung dieser Formulierungen konnte der positive Einfluss des PEG 400 auf die Prozessierbarkeit bei der Extrusion durch Erniedrigung der Schmelzviskosität nachgewiesen werden. Die Gehaltsbestimmungen von drei Chargen pro Formulierung

zeigten zudem eine hervorragende Reproduzierbarkeit und eine gute Gleichförmigkeit des Gehalts. Bei weiteren Untersuchungen hinsichtlich des Degradationsverhaltens des PLGAs der ausgewählten Formulierungen konnte weder ein Einfluss des Arzneistoffs noch des Weichmachers beobachtet werden. Die hohen Gentamicinsulfat-Anteile bzw. die relativ geringen PLGA-Konzentrationen lassen die Extrudate sofort quellen, so dass der Polymerabbau der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist. Da dieser in allen Formulierungen identisch nach einer Kinetik erster Ordnung abläuft, beginnt die Erosion der Matrices zur gleichen Zeit.

Abschließend wurden ausgewählte Formulierungen durch Gamma-Strahlen sterilisiert. Die im Anschluss durchgeführten Gehaltsbestimmungen zeigten keine Erniedrigung des Gentamicinsulfat-Anteils. Die Freisetzungsprofile wiesen dagegen leichte Veränderungen in Richtung sigmoider Verläufe auf. Die Extrudate setzen aber dessen ungeachtet weiterhin nach einer Burstfreisetzung den Arzneistoff gleichmäßig über ungefähr fünf Wochen frei und entsprechen damit den gewünschten Anforderungen an ein Antibiotikaträgersystem zur Behandlung der chronischen Osteomyelitis.

## **5 ENTWICKLUNG VON TAUROLIDIN-IMPLANTATEN**

Polymethylmethacrylat-Kugeln beladen mit Gentamicinsulfat stellen das Standardarzneimittel zur lokalen Behandlung der chronischen Knocheninfektion dar. In den vorhergehenden Kapiteln konnte die erfolgreiche Entwicklung einer bioabbaubaren Depotarzneiform mit Gentamicinsulfat auf der Basis von PLGA gezeigt werden, deren in vitro Freisetungsverhalten als ideal erachtet wird und welche nach der Applikation im Gegensatz zu den PMMA-Kugeln keine zusätzliche Operation zur Entfernung erfordert. Da allerdings insbesondere bei nosokomialer Osteomyelitis häufig resistente Keime ursächlich für den chronischen Verlauf der Infektion sind (Torres-Viera et al., 2000), soll im Folgenden das Arzneistoffträgersystem auf den Wirkstoff Taurolidin übertragen werden. Aufgrund des Wirkmechanismus des Taurolidins, einer chemische irreversiblen Reaktion mit der Bakterienzellwand, wird die Entwicklung von Resistenzen verhindert und es sind somit keine Resistenzen gegen Taurolidin bekannt (Geistlich Pharma, 2008). Taurolidin findet wegen dieser positiven Eigenschaften auch bereits Anwendung bei der lokalen Therapie der chronischen Osteomyelitis, zum Beispiel in Form einer Spüllösung (Taurolin<sup>®</sup> Ringer 0,5% Taurolidin, Geistlich Pharma AG, Wolhusen, Schweiz).

### **5.1 HERSTELLUNG ERSTER TAUROLIDIN-EXTRUDATE**

Beruhend auf den Resultaten der Versuche zur Entwicklung der Gentamicinsulfat-Extrudate wurde PEG 400 als Weichmacher ausgewählt. Es hatte sich gezeigt, dass durch den Zusatz von Tributylcitrat zwar die Verzögerungsphase zu Beginn der Freisetzung eliminiert werden konnte, es wurde jedoch auch die Degradation des Polymers beschleunigt, so dass die gesamte Freisetzung in weniger als

20 Tagen beendet war. Aufgrund der günstigeren Freisetzungsprofile der Formulierungen mit PEG 400 wurde dieser Weichmacher als Hilfsstoff für die Taurolidin-Extrudate eingesetzt.

Außerdem wurden die niedrigeren Wirkstoff-Konzentration 10% und 15% nicht untersucht, weil bei den Gentamicinsulfat-Extrudaten erst bei höheren Konzentrationen optimale Profile erreicht wurden und Taurolidin im Gegensatz zu Gentamicinsulfat weniger potent ist. Um eine ausreichende Wirksamkeit des Taurolidins zu erreichen, müssen möglichst hohe Arzneistoff-Konzentrationen freigesetzt werden. Die Zusammensetzung der in den folgenden Kapiteln untersuchten Formulierungen sind in Tabelle 5.12 aufgeführt.

Tabelle 5.12: Zusammensetzung der Formulierungen mit Taurolidin, Angaben in %

Taurolidin	PEG 400	Resomer <sup>®</sup> RG 503 H
20	0	80
20	5	75
20	10	70
20	20	60
30	0	70
30	5	65
30	10	60
30	20	50
40	0	60
40	5	55
40	10	50
40	20	40
50	0	50
50	5	45
50	10	40
50	20	30

### 5.1.1 GLASÜBERGANGS- UND EXTRUSIONSTEMPERATUREN

Nach Schmelzextrusion der Formulierungen mit dem Einschneckenextruder wurden diese hinsichtlich ihrer Glasübergangstemperatur untersucht. Bei der Herstellung war dabei eine Reduzierung der Extrusionstemperatur (dargestellt ist die Temperatur der wärmsten Temperaturzone) entsprechend der Senkung der Glasübergangstemperatur möglich (Abbildung 5.48). Die Senkung der Prozess-temperatur scheint bei der Herstellung der Taurolidin-Formulierungen von größerer Relevanz als bei den Gentamicinsulfat-Extrudaten zu sein. So wiesen die Extrudate ohne Weichmacher, die bei einer maximalen Temperatur von 110°C extrudiert wurden, an der Oberfläche eine leicht gelbliche Verfärbung auf, obwohl diese bei einer Temperatur weit unterhalb des Schmelzbereiches von Taurolidin (163-179°C) extrudiert wurden. Schon die Zugabe von 5% PEG 400 ermöglichte eine Schmelzextrusion bei 95°C, bei der keine Verfärbung der Extrudate auftrat. Außer der Verfärbung der Extrudate konnten allerdings keine weiteren Beeinträchtigungen festgestellt werden. So konnte auch in der HPLC keine Verkleinerung des Taurultam-Peaks oder das Auftreten eines Taurinamid-Peaks (Zersetzungsprodukt des Taurultams) beobachtet werden. Auch die Tatsache, dass die sich auf dem Markt befindenden Taurolidin-Lösungen zur Sterilisation autoklaviert (15 min, 121°C) werden, spricht dafür, dass bei Extrusionstemperaturen von  $\leq 110^\circ\text{C}$  keine Wirkminderung des Taurolidins auftritt (Woolfson, 1989).



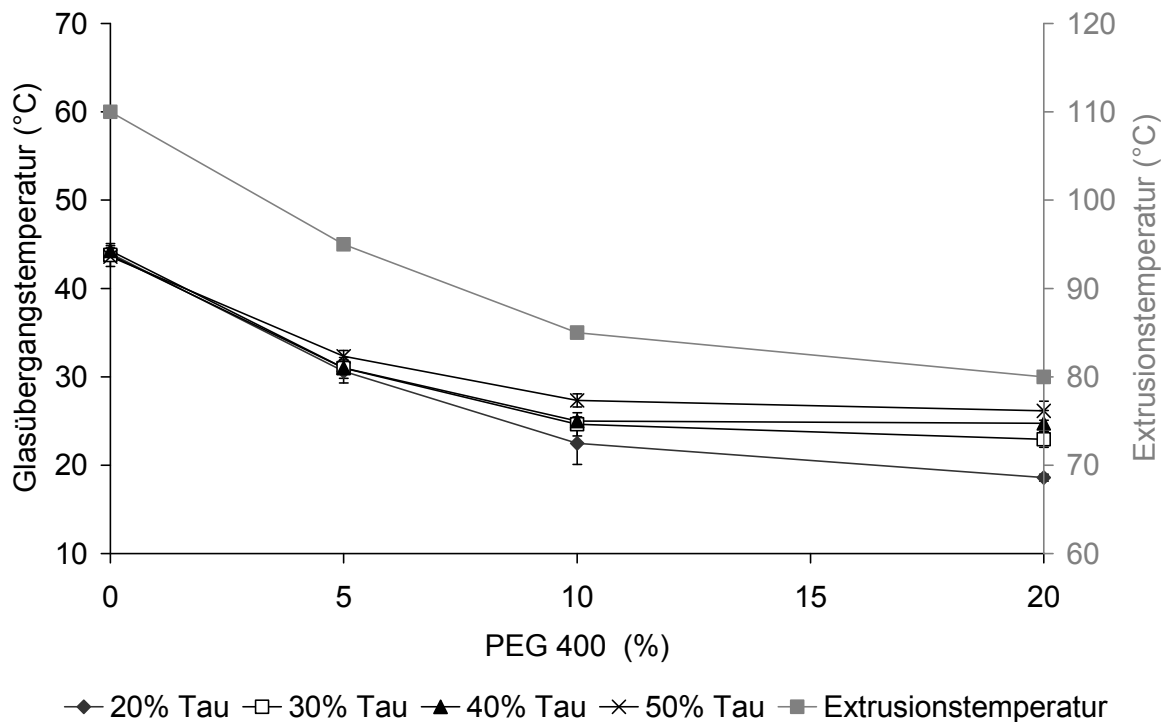


Abbildung 5.48: Glasübergangs- und Extrusionstemperaturen mit steigender Weichmacher-Konzentration

Bei Betrachtung der Glasübergangstemperaturen der Formulierungen mit steigender Taurolidin-Konzentration (Abbildung 5.49), kann bei den Extrudaten ohne Weichmacher keine Beeinflussung der Tg des PLGAs durch Taurolidin beobachtet werden. Taurolidin agiert somit nicht als nicht-traditioneller Weichmacher (siehe Kapitel 4.1).

Allerdings tritt bei den Formulierungen mit Weichmacher mit zunehmender Taurolidin-Konzentration eine Erhöhung der Tg von PLGA auf, die umso stärker ausgeprägt ist, je höher der PEG 400-Anteil ist. Dies bedeutet, dass mit zunehmendem Taurolidin-Anteil die Weichmachereffizienz des PEG 400 abnimmt (Abbildung 5.50). Gentamicinsulfat zeigte im Vergleich dazu eine Zunahme der Weichmachereffizienz. Begründet wurde dies zum einen durch die geringere Anzahl an intermolekularen Bindungen der Polymerketten aufgrund der niedrigen PLGA-Konzentration. Zum anderen durch einen im Verhältnis zu PLGA höheren vorliegenden PEG 400-Anteil, da durch

eine höhere Gentamicinsulfat-Konzentration der PLGA-Anteil sinkt. Bei Taurolidin ist nun der gegenteilige Effekt zu beobachten, der vermutlich durch ein partielles Lösen des Taurolidins im PEG 400 und damit im PLGA hervorgerufen wird. Um diese Vermutung zu überprüfen, wurde die Sättigungslöslichkeit des Taurolidins im PEG 400 bestimmt. Dazu wurden 0,5 g Taurolidin in 4,5 g PEG 400 gegeben (n = 5) und zwölf Stunden bei Raumtemperatur geschüttelt. Nach Filtration wurde mit Hilfe der HPLC die Taurolidin-Konzentration in dem Weichmacher analysiert. Mit einer Sättigungslöslichkeit von 1 g in 36,8 ml ist Taurolidin in PEG 400 wenig löslich. Ein Teil des Taurolidins liegt folglich molekular dispers in den Extrudaten vor und erhöht leicht die Glasübergangstemperatur des PLGAs bei gleicher PEG 400-Konzentration; der Weichmacher wirkt damit als Lösungsvermittler.

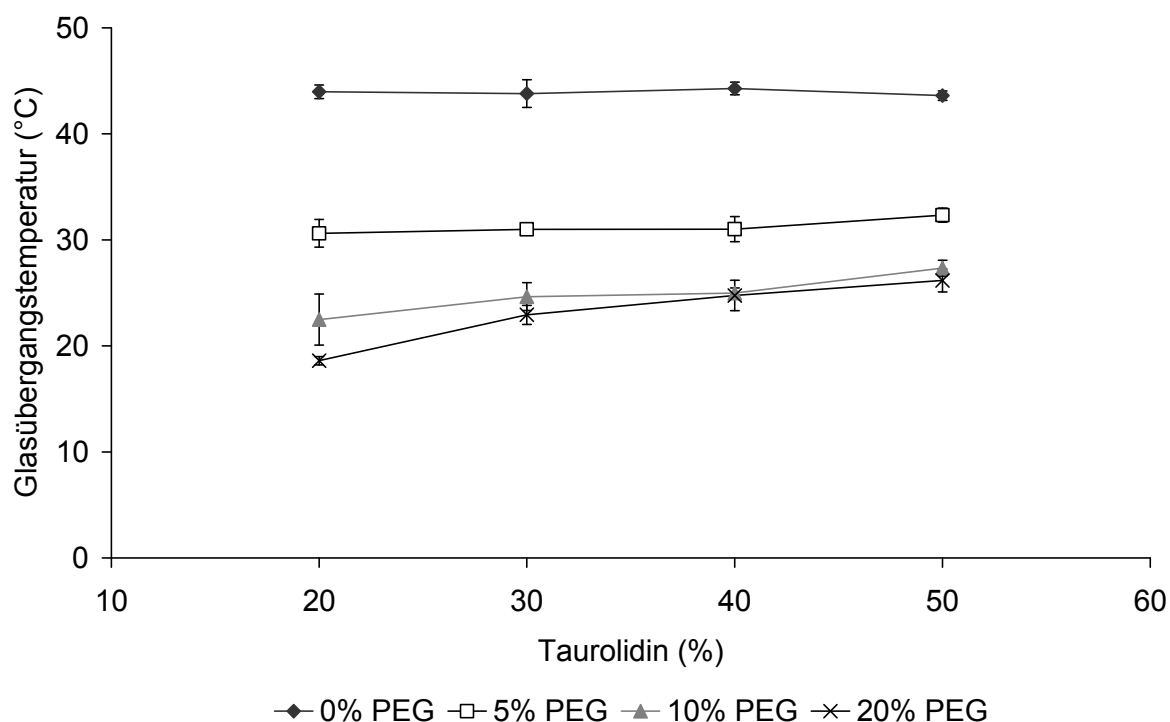


Abbildung 5.49: Glasübergangstemperaturen der Formulierungen mit steigender Taurolidin-Konzentration

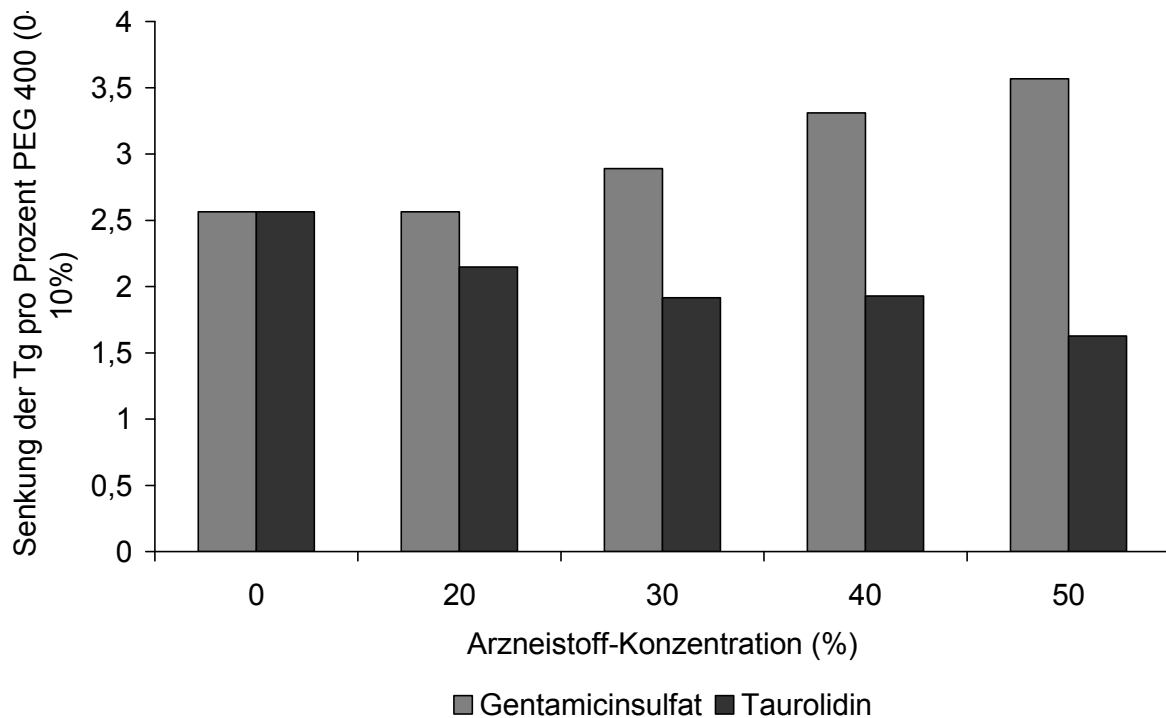


Abbildung 5.50: Weichmachereffizienzen des PEG 400 in Abhängigkeit von der Arzneistoff-Konzentration

### 5.1.2 CHARAKTERISIERUNG DES VORLIEGENDEN DISPERSEN SYSTEMS

Nach Schmelzextrusion der Pulvermischungen konnte anhand des Erscheinungsbildes der Extrudate eine erste Einteilung des dispersen Systems erfolgen. Die Extrudate mit inkorporiertem Taurolidin waren wie auch die Gentamicinsulfat-Extrudate opak mit einer weißen bis weiß-gelblichen Färbung (Abbildung 5.51). Dabei wiesen die Extrudate mit höherem Weichmacher-Anteil eine weniger weiß-gelbliche Verfärbung auf, da diese bei einer geringeren Temperatur extrudiert werden konnten (siehe Kapitel 5.1.1). Die Undurchsichtigkeit der Extrudate weist daraufhin, dass das Taurolidin zumindest nicht komplett gelöst vorliegt, womit ein molekular disperses System ausgeschlossen werden konnte.



a) Extrudat ohne Taurolidin

b) Extrudat mit 20% Taurolidin

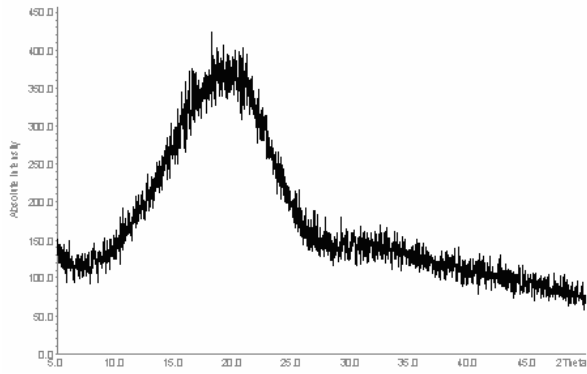
Abbildung 5.51: Extrudate a) ohne und b) mit 20% Taurolidin

Zur weiteren Differenzierung wurden röntgendiffraktometrische Aufnahmen angefertigt (Abbildung 5.52). Es wurden dazu Extrudate mit flüssigen Stickstoff stark gekühlt und anschließend in der Reibschale pulverisiert. In den Diffraktogrammen der Extrudatproben (Bild c und e) sind deutlich die kristallinen Peaks des Taurolidins (Bild b) mit dem, durch die amorphen Strukturen des PLGAs (Bild a) hervorgerufenen Halo erkennbar. Damit liegt das Taurolidin zumindest zum Teil kristallin in der Polymermatrix vor.

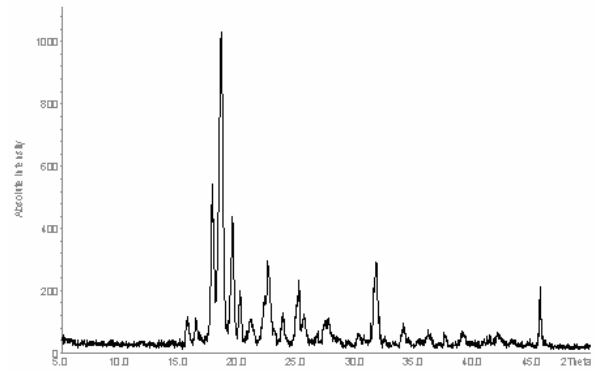
Im vorherigen Kapitel 5.1.1 wurde bereits erläutert, dass der Weichmacher PEG 400 dem Taurolidin als Lösungsvermittler dient und somit der Arzneistoff vermutlich teilweise gelöst im Polymer vorliegt. Um diese These zu bestätigen, wurden Röntgendiffraktogramme von physikalischen Mischungen der untersuchten Formulierungen angefertigt. Es wurden dazu die gleichen Probenmengen sowohl der zerkleinerten Extrudate als auch der physikalischen Mischung analysiert. Ferner sind die Skalierungen der Ordinaten der jeweils zu vergleichenden Röntgendiffraktogramme (Extrudat und physikalische Mischung der gleichen Formulierung) identisch. Die Diffraktogramme der Extrudatprobe und der physikalischen Mischung der Formulierung mit 30% Arzneistoff zeigen die kristallinen Peaks des Taurolidins mit etwa

den gleichen Intensitäten (Bild c und d). Dies lässt darauf schließen, dass das Taurolidin nahezu ungelöst und damit kristallin in dem PLGA in den Formulierungen ohne Weichmacher dispergiert ist. Bei diesen Formulierungen handelt es sich demnach um eine Suspensionen mit einem festen amorphen Träger (siehe Kapitel 4.2.1).

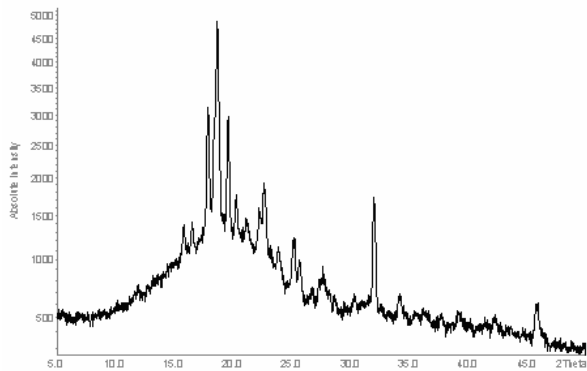
Um zu überprüfen, ob ein Teil des Taurolidins in Gegenwart von PEG 400 gelöst in den Extrudaten vorliegt, wurde eine physikalische Mischung ohne PEG 400, aber mit dem gleichen Verhältnis von PLGA und Taurolidin wie in der Extrudatprobe hergestellt. Von der physikalischen Mischung wurde außerdem 10% weniger zur Analyse eingewogen, um eine Vergleichbarkeit der Peakintensitäten zu erreichen. Betrachtet man nun die Röntgendiffraktogramme der Extrudatprobe und der physikalischen Mischung (Bild e und f), kann man zwar bei beiden die charakteristischen Peaks des kristallinen Taurolidins erkennen, allerdings sind die Intensitäten bei der Extrudatprobe geringer. Drei Wiederholungsmessungen sowohl von Extrudatproben als auch der physikalischen Mischung bestätigten die geringeren Peakintensitäten in den Diffraktogrammen der Extrudatproben. Dies ist ein weiterer Beleg dafür, dass ein kleiner Anteil des Taurolidins gelöst in den Extrudaten mit PEG 400 vorliegt. Bei dem dispersen System der Formulierungen mit Weichmacher handelt es sich demnach um eine Mischung aus Wirkstofflösung und –suspension.



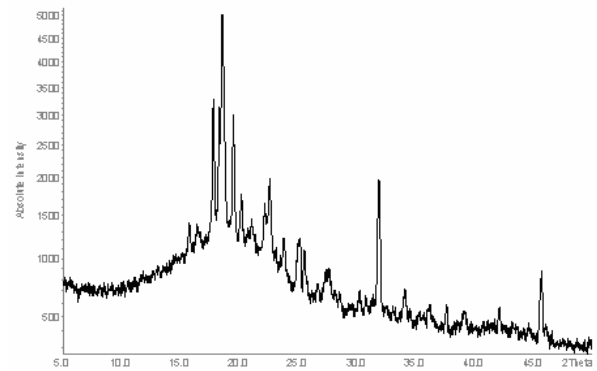
a) PLGA



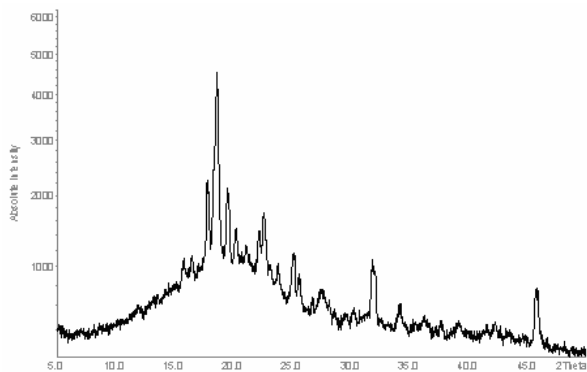
b) Taurolidin



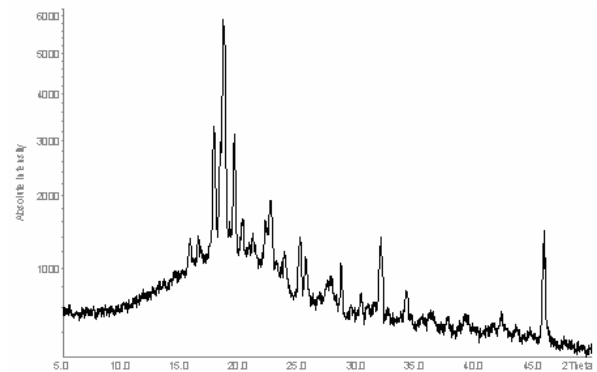
c) Extrudatprobe mit 70% PLGA und 30% Taurolidin



d) Physikalische Mischung von 70% PLGA mit 30% Taurolidin



e) Extrudatprobe mit 60% PLGA, 30% Taurolidin und 10% PEG 400



f) Physikalische Mischung von 60% PLGA mit 30% Taurolidin

Abbildung 5.52: Röntgendiffraktogramme der Ausgangssubstanzen, zweier Formulierungen und deren physikalischer Mischungen

### 5.1.3 IN VITRO FREISETZUNG

Auch bei den Freisetzungsverläufen der Taurolidin-Extrudate bietet es sich an, für eine erste Bewertung zunächst die Form der Profile zu betrachten (Abbildung 5.53 bis Abbildung 5.56). Die Freisetzungprofile der 20%-Formulierungen mit 0, 5 und 10% PEG 400 zeigen einen sigmoiden Verlauf, wie es auch bei den entsprechenden Gentamicinsulfat-Formulierungen beobachtet werden konnte. Dabei tritt nach der Burstfreisetzung von etwa 20% eine relativ lange lag-Phase (10-13 Tage) auf, in der nur wenig Arzneistoff abgegeben wird. Die 20%-Formulierung mit 20% PEG 400 verhält sich gleichermaßen analog zu den Gentamicinsulfat-Extrudaten: nach der Burstfreisetzung besitzen diese einen annähernd linearen Verlauf mit einem Bestimmtheitsmaß von 0,98. Jedoch erwiesen sich auch bei den Taurolidin-Extrudaten die Formulierungen mit 20% PEG 400 als zu weich und klebrig, so dass sie sich während der Lagerung als nicht formstabil erwiesen.

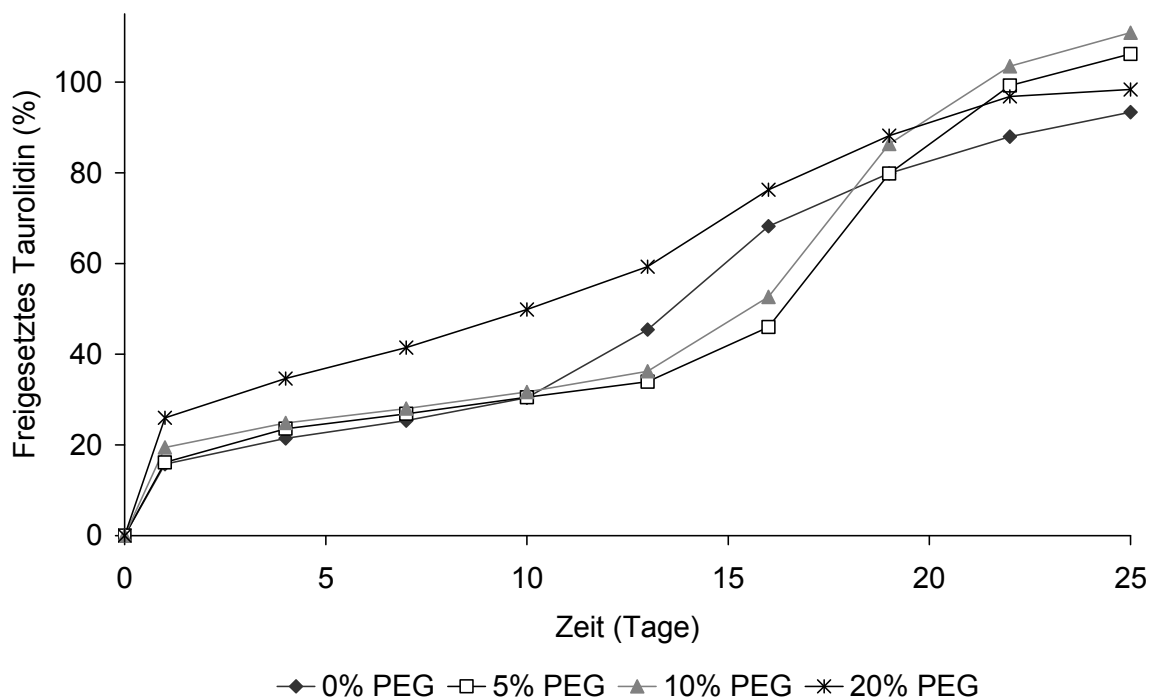


Abbildung 5.53: Freisetzungsverläufe der Formulierungen mit 20% Taurolidin und steigender PEG 400-Konzentration

Bei Betrachtung der 30%-Formulierungen lassen sich zwei verschiedene Formen der Profile beobachten: bis zu einer Weichmacher-Konzentration von 5% eine sigmoide Form und ab 10% eine exponentielle Annäherung, wobei bei 20% PEG 400 nahezu die gesamte Taurolidin-Menge mit dem Bursteffekt freigesetzt wurde. Die Extrudate mit einem Weichmacher-Anteil von 0 und 5% setzten Taurolidin über etwa zwei Wochen sehr gleichmäßig frei, gefolgt von einer höheren Freisetzungsrate, die durch die Erosion der Extrudate bedingt wird.

Insgesamt unterscheiden sich die Zeiträume, über die das Gentamicinsulfat und das Taurolidin freigesetzt wurden, signifikant voneinander. So wurde das Gentamicinsulfat über insgesamt fünf bis sechs Wochen freigesetzt, das Taurolidin hingegen nur über drei bis vier Wochen. Da auch das Taurolidin aus den Formulierungen ohne Weichmacher schneller als das Gentamicinsulfat freigesetzt wird, kann das in den Extrudaten mit Weichmacher zum Teil gelöst vorliegende Taurolidin als alleinige Ursache ausgeschlossen werden. Vielmehr scheint bei den Taurolidin-Extrudaten eine schnellere Polymerdegradation vorzuliegen, da auch die Erosionsphase früher einsetzt. Die Ursache für die unterschiedlichen Degradationsgeschwindigkeiten liegt vermutlich in der Basizität der Arzneistoffe begründet. Gentamicinsulfat ist eine stärkere Base als Taurolidin, so dass durch eine geringere Senkung des pH-Wertes im Inneren der Extrudate die Polymerdegradation langsamer als beim Taurolidin abläuft.

In Abbildung 5.53 und Abbildung 5.54 kann man weiterhin einen zunächst unerwarteten Verlauf der 20 und 30%-Formulierungen ohne Weichmacher beobachten: die Erosionsphase setzt einige Tage früher als bei den Formulierungen mit Weichmacher ein. Wie bereits in Kapitel 5.1.1 beschrieben, zeigt PEG 400 dem Taurolidin gegenüber eine lösungsvermittelnde Wirkung. In den Extrudaten mit Weichmacher liegt



infolgedessen insbesondere zu Beginn mehr gelöstes Taurolidin vor, welches die Senkung des pH-Wertes leicht abpuffert. Somit werden die Extrudate ohne Weichmacher schneller abgebaut und die Erosionsphase beginnt eher.

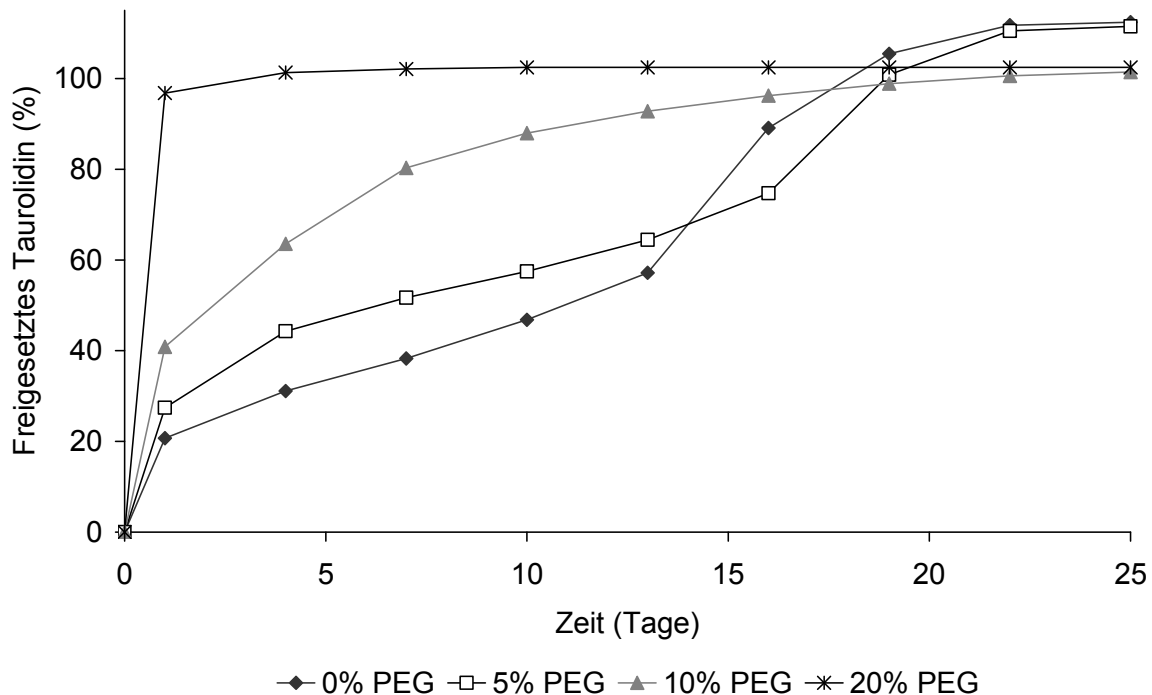


Abbildung 5.54: Freisetzungverläufe der Formulierungen mit 30% Taurolidin und steigender PEG 400-Konzentration

Die Ansätze mit 40 und 50% Arzneistoff-Anteil haben aufgrund der niedrigen PLGA-Konzentration nur eine geringe bis komplett fehlende retardierende Wirkung. Die 40%-Formulierungen ohne und mit 5% PEG 400 zeigen im Unterschied zu den Gentamicinsulfat-Extrudaten noch eine gewisse verzögerte Freisetzung, bei der das Taurolidin über zwei Wochen abgegeben wird. Hervorgerufen wird dies vermutlich durch die geringere Löslichkeit des Taurolidins in Wasser, wodurch nur langsamer als beim Gentamicinsulfat Poren entstehen, aus denen das Taurolidin aus dem Inneren der Matrix heraus diffundieren kann. Entgegen der Erwartung unterscheiden sich diese beiden Formulierungen jedoch nicht in ihrer Freisetzungsgeschwindigkeit. Hier

wäre eine langsamere Arzneistoffabgabe bei der Formulierung ohne Weichmacher erwartet worden. Da den Daten nur eine Einfachbestimmung zugrunde liegt, wurde diese Formulierung in der folgenden Versuchsreihe nochmals analysiert.

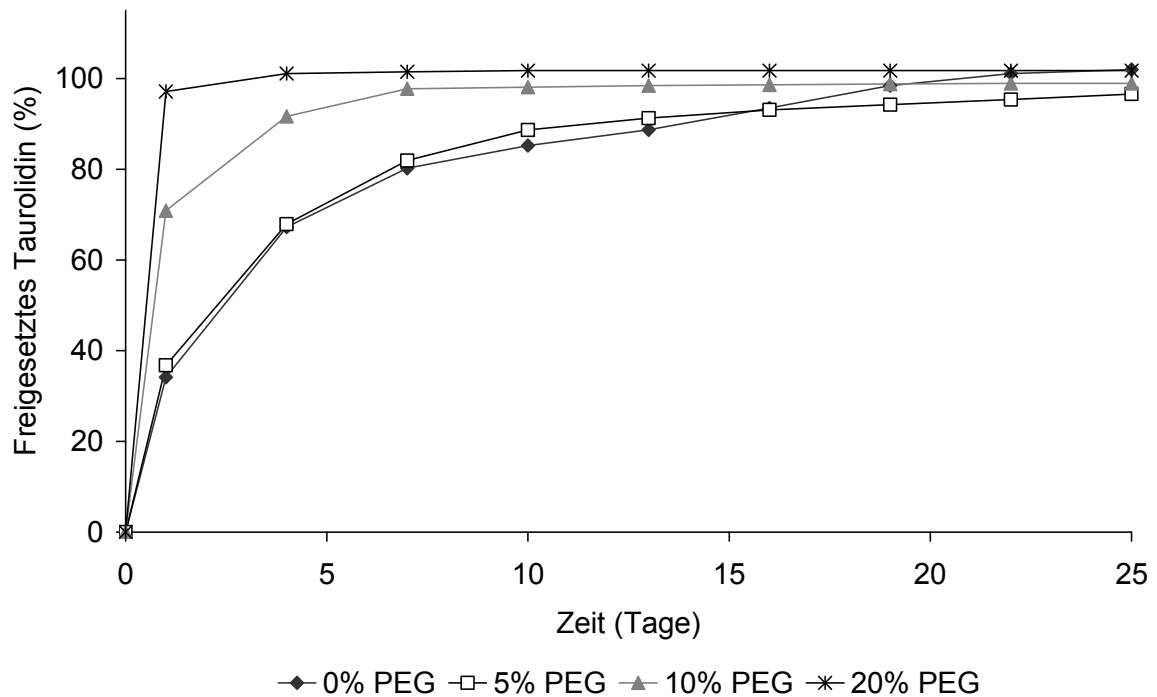


Abbildung 5.55: Freisetzungverläufe der Formulierungen mit 40% Taurolidin und steigender PEG 400-Konzentration

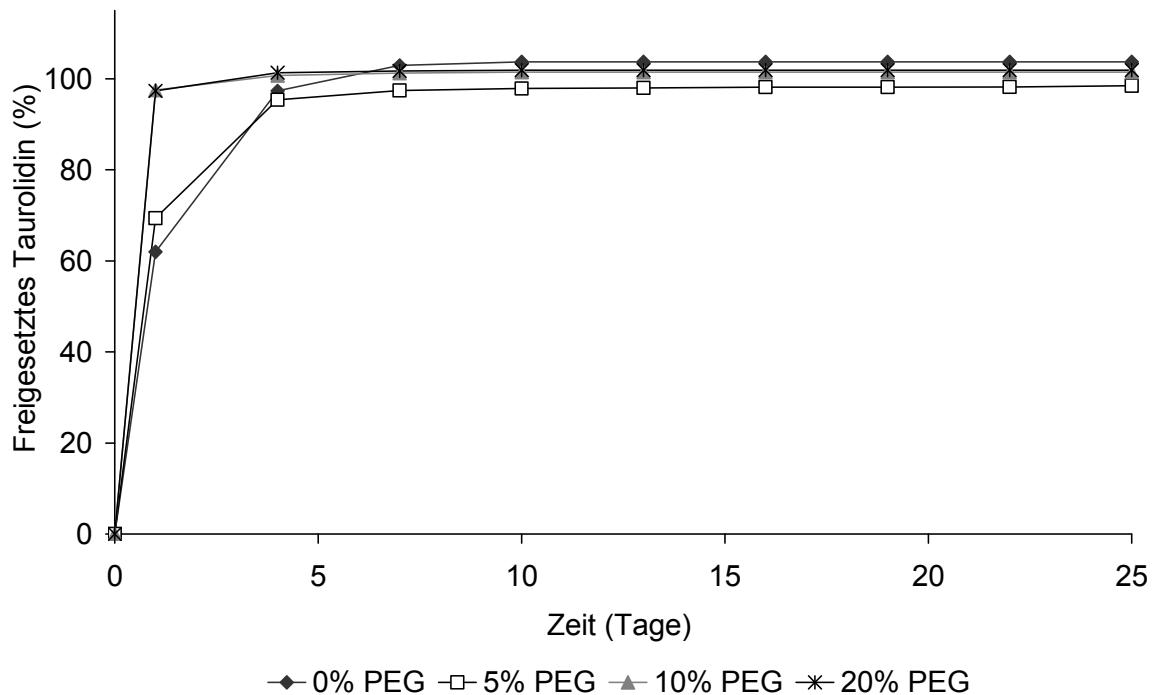


Abbildung 5.56: Freisetzungverläufe der Formulierungen mit 50% Taurolidin und steigender PEG 400-Konzentration

Bei der statistischen Auswertung der Freisetzungverläufe hinsichtlich ihrer Einflussfaktoren kann eine leicht höhere Korrelation der PEG 400-Konzentration mit der Burst-Freisetzung als es bei den Gentamicinsulfat-Extrudaten der Fall war, festgestellt werden (Abbildung 5.57). Dies beruht vermutlich auf dem im PEG 400 zum Teil gelöst vorliegenden Taurolidin. So liegt bei einer höheren PEG 400-Konzentration auch bereits eine größere Menge Taurolidin molekular dispers im Polymer vor, die eine etwas schnellere Freisetzung hervorruft. Dieser Effekt ist nach sieben Tagen nicht mehr feststellbar, da das PEG 400 sehr schnell aus der Polymermatrix ausgewaschen wird (Abbildung 5.58).

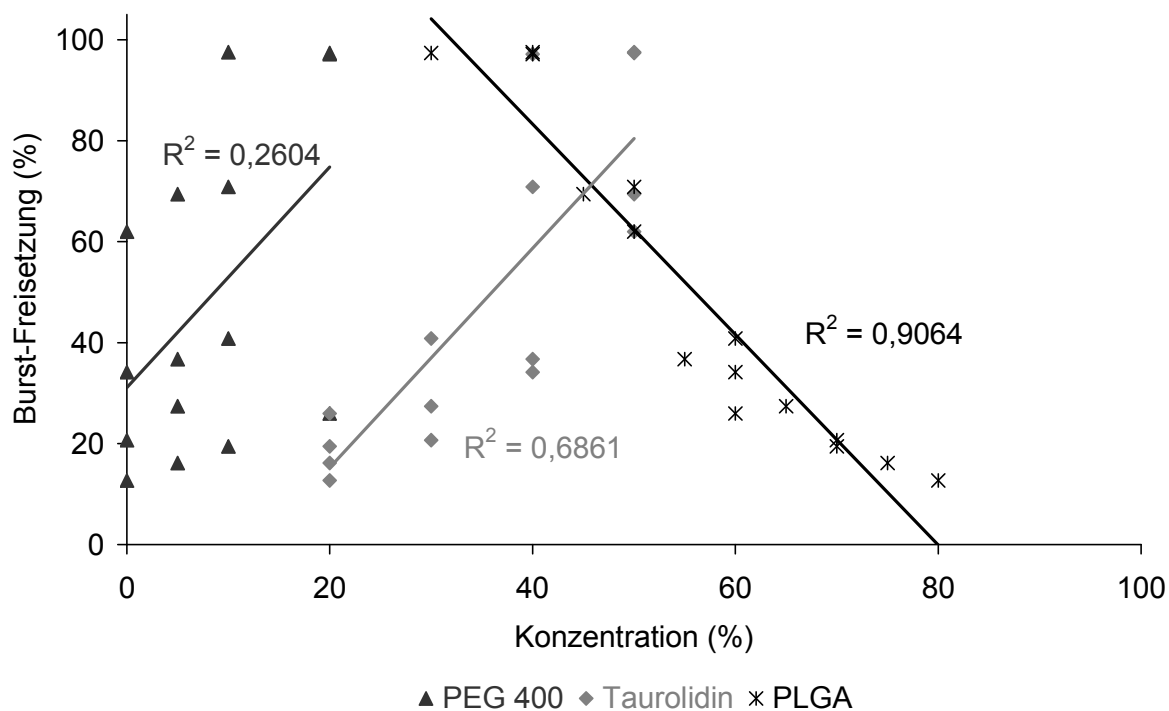


Abbildung 5.57: Statistische Auswertung der Burst-Freisetzung, Tag 1

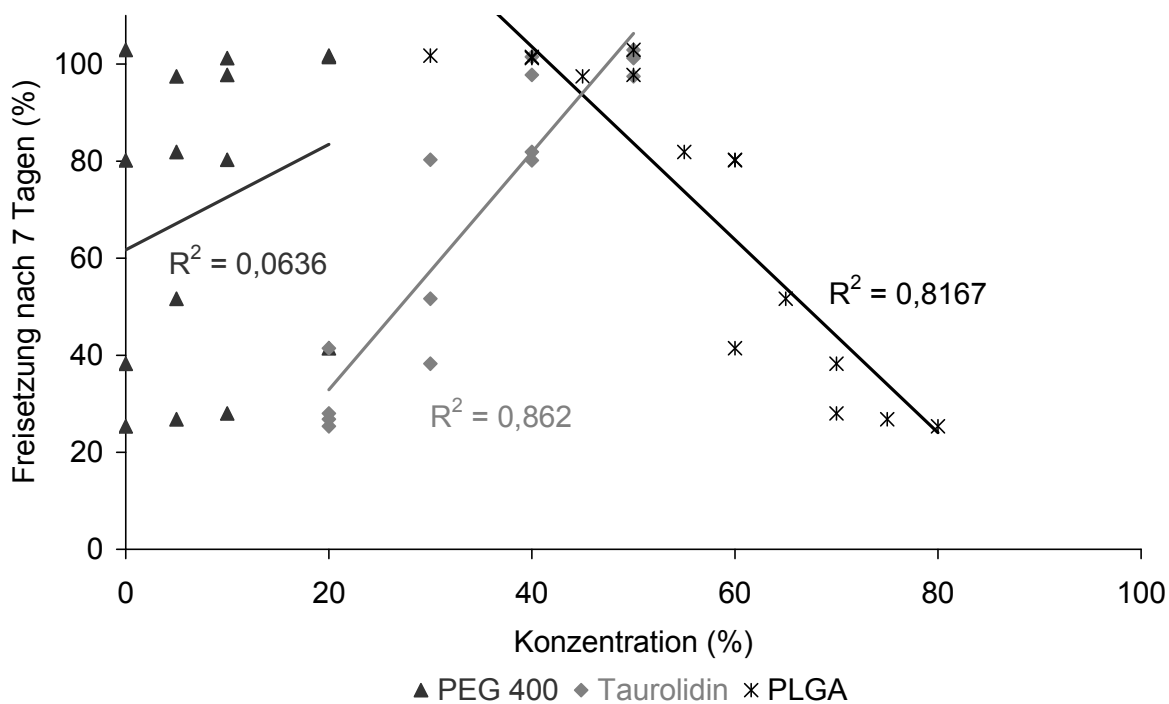


Abbildung 5.58: Statistische Auswertung der Freisetzung nach 7 Tagen

Zusammenfassend lässt sich nach den ersten in vitro Freisetzungsversuchen feststellen, dass sich vor allem die Freisetzungsdauer der Taurolidin- von der der Gentamicinsulfat-Extrudate unterscheidet. Diese ist bei den Taurolidin-Formulierungen wesentlich verkürzt, bzw. bei den Gentamicinsulfat-Formulierungen verlängert, da das Gentamicinsulfat eine stärkere Base ist und somit den Polymerabbau stärker verzögert als das Taurolidin. Bei den Weichmacher-enthaltenden Formulierungen wird der PLGA-Abbau durch einen höheren Anteil an gelöstem Taurolidin stärker verlangsamt als bei den Formulierungen ohne Weichmacher.

In Hinblick auf das Freisetzungsverhalten zeigen die Extrudate mit 30% Taurolidin ohne und mit 5% Weichmacher von den getesteten Formulierungen das beste Profil. Einem Bursteeffekt mit anschließender linearer Freisetzung über zwei Wochen folgt eine höhere Freisetzungsrates über etwa eine Woche bedingt durch die Erosion der Matrix.

### **5.2 CHARAKTERISIERUNG DER TAUROLIDIN-EXTRUDATE**

In den Vorversuchen zur Herstellung von Taurolidin-Extrudaten ist bereits eine Charakterisierung des vorliegenden dispersen Systems erfolgt. Weiterhin konnten mögliche Konzentrationen der Bestandteile für eine möglichst gleichmäßige und hohe Freisetzung des Taurolidins ermittelt werden. In den folgenden Versuchsreihen wurden nun ausgewählte Taurolidin-Formulierungen genauer untersucht, um eine umfassende Beurteilung für eine optimale Formulierung vornehmen zu können.

Die in den weiteren Kapiteln näher charakterisierten Formulierungen sind in Tabelle 5.13 aufgeführt. Eine Formulierung mit 25% Arzneistoff-Anteil, wie sie mit Gentamicinsulfat zu optimalen Freisetzungprofilen führte, wurde nicht hergestellt, da aufgrund der relativ geringen Potenz des

Taurolidins eine möglichst hohe Beladung der Extrudate erfolgen sollte. Die Herstellung der Extrudate wurde mit dem Zweischnckenextruder Minilab II durchgeführt, und von jeder Formulierung wurden jeweils drei Chargen produziert. Die Extrusionstemperaturen entsprachen wiederum denen der wärmsten Zone bei der Extrusion im Einschnckenextruder (siehe Kapitel 5.1.1).

Tabelle 5.13: Zusammensetzung der ausgewählten Formulierungen, Angaben in %

Taurolidin	PEG 400	PLGA
30	0	70
30	5	65
30	10	60
40	0	60

### 5.2.1 RHEOLOGISCHE BETRACHTUNGEN DER POLYMERSCHMELZEN

Auch die Taurolidin-Formulierungen wurden hinsichtlich ihrer Prozessierbarkeit bei der Schmelzextrusion untersucht. Bei den Viskositätsversuchen mit den Gentamicinsulfat-Formulierungen konnte bereits der starke viskositätssenkende Einfluss des Weichmachers PEG 400 bestimmt werden. Bei den folgenden Viskositätsmessungen der Polymerschmelzen sollte insbesondere der Einfluss des Taurolidins untersucht werden. Da nur eine begrenzte Menge an Taurolidin zur Verfügung stand, aber eine relativ große Menge des Arzneistoffs pro Messung verbraucht wird und die Proben aufgrund der hohen und langen Temperatureinwirkung verworfen werden müssen, konnte nur eine geringe Anzahl an Taurolidin-Formulierungen vermessen werden. Die Resultate lassen als Folge nur Tendenzen erkennen.

Zur Viskositätsmessung wurden die ausgewählten Formulierungen (Tabelle 5.13) und zusätzlich PLGA kombiniert mit 0, 5 und 10% PEG 400 untersucht. Die erhaltenen Viskositäten bei einer Schergeschwindigkeit von  $100 \text{ s}^{-1}$  und einer Temperatur von  $110^\circ\text{C}$  wurden auch hier mit Hilfe der Software DesignExpert<sup>®</sup> ausgewertet. Das lineare Mischungsmodell ist mit einem p-Wert von 0,0114 signifikant. Das Signal-Rausch-Verhältnis sollte größer als 4 sein und ist mit 10,859 akzeptabel. Das „Predicted R-Squared“ von 0,6893 steht in einem annehmbaren Verhältnis zum „Adjusted R-Squared“ von 0,8401.

Die starke Steigung der Responsefläche in der 3D-Graphik veranschaulicht erneut den enormen Einfluss der Weichmacher-Konzentration auf die Viskosität der Polymerschmelze (Abbildung 5.59). Bei einer PEG 400-Konzentration von 10% und 30% Taurolidin zeigt die Schmelze eine Viskosität von nur  $39 \text{ Pa}\cdot\text{s}$ , vergleichbar mit der Viskosität von  $37,1 \text{ Pa}\cdot\text{s}$  bei der Formulierung mit 20% Gentamicinsulfat und ebenfalls 10% PEG.

Die Responseflächengleichung

$$\eta (\text{Pa}\cdot\text{s}) = 382,8 \cdot \text{PLGA} + 30,6 \cdot \text{Tau} - 2538,1 \cdot \text{PEG}$$

zeigt, dass das Taurolidin die Viskosität der Polymerschmelze erhöht, auch wenn der Einfluss nicht so ausgeprägt wie bei Gentamicinsulfat ist. Ursache für den geringeren Einfluss kann die partielle Löslichkeit des Taurolidins in Gegenwart von PEG 400 sein, die in eine geringere Erhöhung der Schmelzviskosität resultiert. Der vorwiegende Einfluss wird aber unabhängig von dem Taurolidin durch den Weichmacher hervorgerufen, dessen Zusatz eine Extrusion bei niedrigeren Temperaturen ermöglicht und so die Prozessierbarkeit erheblich verbessert.

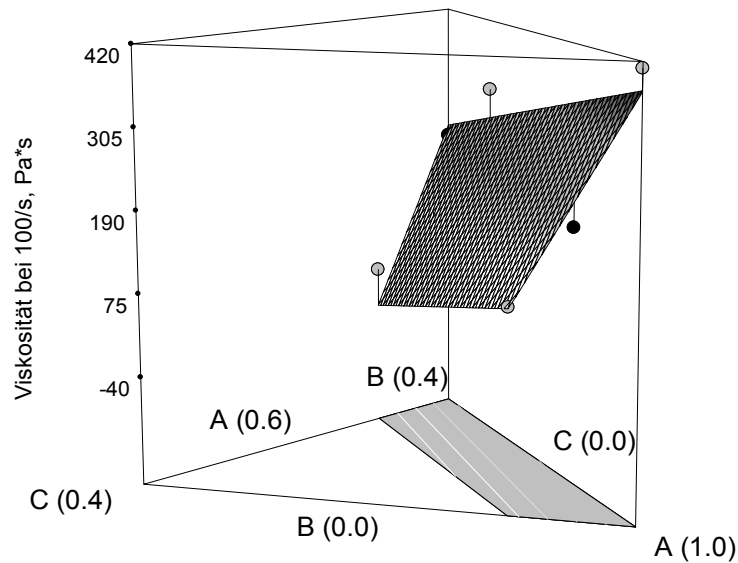


Abbildung 5.59: Viskositäten der Formulierungen bei einer Schergeschwindigkeit von  $100 \text{ s}^{-1}$  und einer Temperatur von  $110^\circ\text{C}$ ; A = PLGA, %; B = Taurolidin, %; C = PEG 400, %

### 5.2.2 REPRODUZIERBARKEIT UND GLEICHFÖRMIGKEIT DES GEHALTS

Um die Reproduzierbarkeit und Gleichförmigkeit des Gehalts der Taurolidin-Extrudate beurteilen zu können, wurde der Arzneistoffgehalt von fünf Extrudaten jeder Charge einer Formulierung analysiert. Da die Gleichförmigkeit der Extrudate bei der Herstellung mit dem Zweischneckenextruder ohne Anwendung des Rückflusskanals auch signifikant von der Ausgangspulvermischung abhängt (vergleiche Kapitel 4.4.2), wurde zuvor die Teilchengrößenverteilung des Taurolidins bestimmt und mit PLGA verglichen (Abbildung 5.60 und Tabelle 5.14 ).



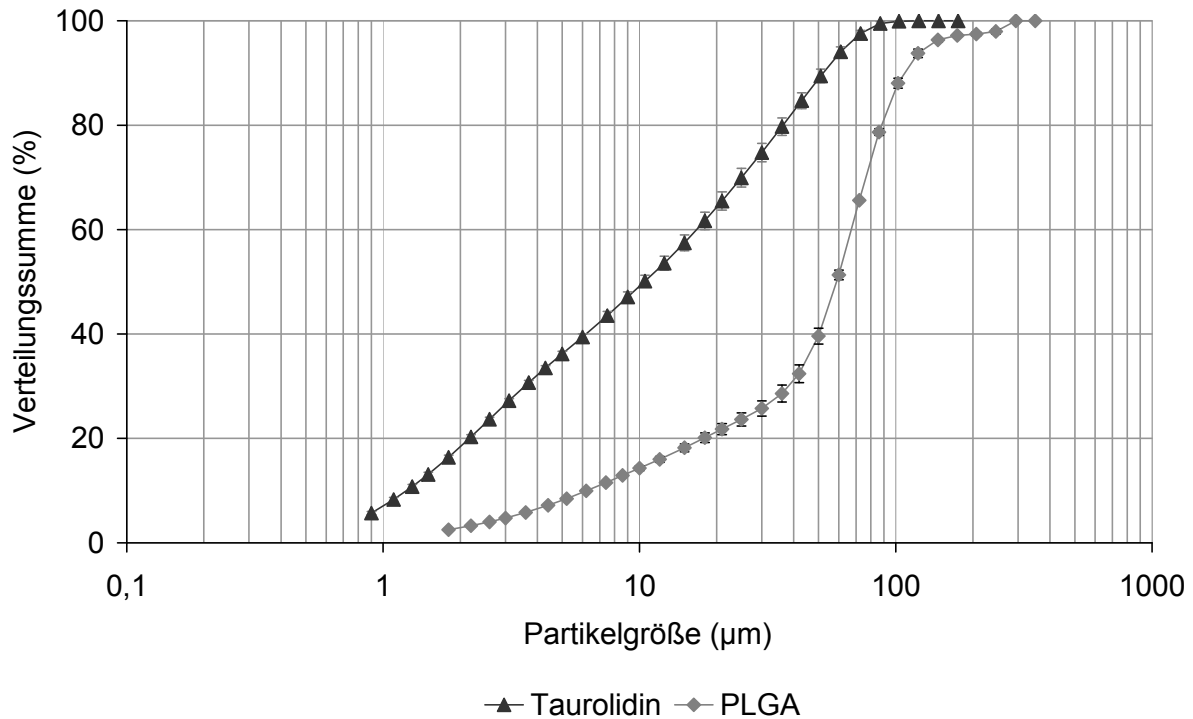


Abbildung 5.60: Summenkurven der Partikelgrößen von Taurolidin und PLGA

Tabelle 5.14: Kennzahlen der Partikelgrößenverteilungen von Taurolidin und PLGA

Pulver	$X_{10}$ (µm)	$X_{50}$ (µm)	$X_{90}$ (µm)
Taurolidin	1,24	10,64	52,03
PLGA	6,25	58,85	108,79

Taurolidin weist nach der Zerkleinerung (siehe Kapitel 3.2.1.3) deutlich kleinere Partikel mit einer breiteren Größenverteilung als PLGA auf. Die Ergebnisse der Gehaltsbestimmungen zeigen dessen ungeachtet, dass die vermessenen Extrudate den angestrebten Arzneistoffgehalt von 30 und 40% aufweisen (Abbildung 5.61). Dabei liegen die Mittelwerte der Einzelgehalte, ausgedrückt als Prozentsatz der angestrebten Werte, zwischen 95% und 105%, wobei allerdings der Variationskoeffizient der einzelnen Chargen mit bis zu 9,86% zum Teil sehr hoch ist.

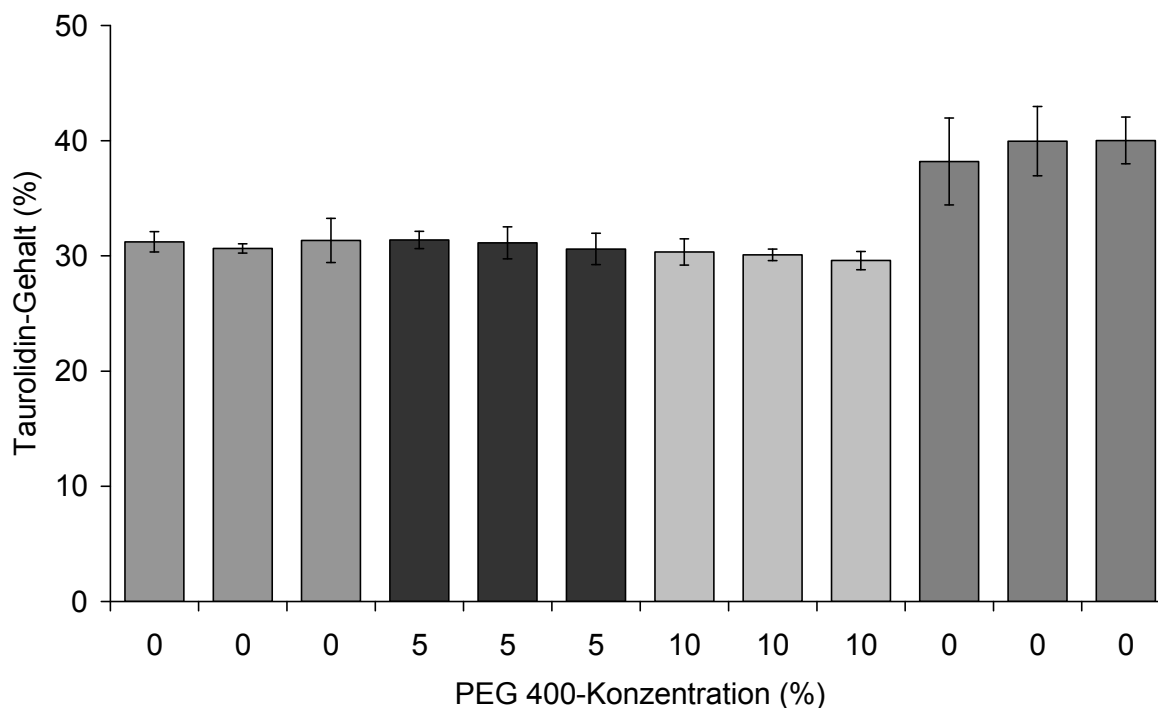


Abbildung 5.61: Mittelwerte der Gehaltsbestimmungen (n = 5) jeder Charge; drei Chargen pro Formulierung

Die relativ hohen Standardabweichungen schlagen sich auch in den berechneten Akzeptanzwerten nieder, die zwar alle unter 15 liegen (maximaler Wert: 12,06) und somit die Prüfung auf Gleichförmigkeit des Gehalts bestehen würden, aber tendenziell höhere Werte als bei den Gentamicinsulfat-Extrudaten aufweisen. Es sei dabei nochmals darauf hingewiesen, dass die Prüfung auf Gleichförmigkeit des Gehalts nach dem europäischen Arzneibuch mit einem Probenumfang von zehn durchgeführt werden müsste, hier allerdings nur fünf Proben analysiert wurden.

Um eine Aussage über die Reproduzierbarkeit des Verfahrens machen zu können, wurden auch diese Gehaltsbestimmungen statistisch hinsichtlich signifikanter Unterschiede zwischen den Chargen einer Formulierung mit der Software DesignExpert<sup>®</sup> ausgewertet (Tabelle 5.15). Die p-Werte liegen allesamt über 0,1, womit sich die Chargen einer Formulierung nicht signifikant voneinander unterscheiden. Das

Herstellungsverfahren ermöglicht somit reproduzierbar, Implantate mit gleichförmigem Gehalt zu produzieren.

Tabelle 5.15: p-Werte der Chargen einer Formulierung im Vergleich

Formulierung	Charge a-b	Charge a-c	Charge b-c
30% Tau, 0% PEG	0,4751	0,8588	0,3762
30% Tau, 5% PEG	0,7628	0,3401	0,4951
30% Tau, 10% PEG	0,6536	0,1959	0,3811
40% Tau, 0% PEG	0,3711	0,3566	0,9771

### 5.2.3 IN VITRO FREISETZUNG

Die 30%-Formulierungen zeigten in den Einzelbestimmungen der Vorversuche nach einer Burstfreisetzung eine gleichmäßige lineare Arzneistoffabgabe. Um die Reproduzierbarkeit der erhaltenen Profile zu überprüfen, wurden diese Taurolidin-Extrudate nach Herstellung mit dem Zweischneckenextruder in einer Dreifachbestimmung freigesetzt. Darüber hinaus wurde die 40%-Formulierung ohne Weichmacher aufgrund des unerwarteten Freisetzungsverlaufs im Vorversuch erneut analysiert. Zusätzlich zu diesen Freisetzungsversuchen wurde außerdem die Charge mit 30% Taurolidin und 5% PEG 400 mit einer doppelten Anzahl an Extrudaten in gleicher Menge Freisetzungsmittel (3 ml) getestet, um zu überprüfen, ob sich die absolut freigesetzte Menge an Arzneistoff ohne Veränderung des Profils verdoppeln lässt. Es wurde hier ebenfalls eine Dreifachbestimmung durchgeführt.

Die Freisetzungsverläufe der 30%-Formulierungen dieser Versuchsreihe zeigen zu den Vorversuchen vergleichbare Profile (Abbildung 5.62). Nur die Formulierung mit 40% Taurolidin weist, wie erwartet, eine langsamere Freisetzungsrates auf als bei der Einfachbestimmung aufgetreten ist (vergleiche Kapitel 5.1.3). Dabei zeigt sie etwa die gleiche

Freisetzungsrate wie die Formulierung mit 30% Taurolidin und 5% PEG 400, allerdings nach einer um etwa 10% höheren Burst-Freisetzung.

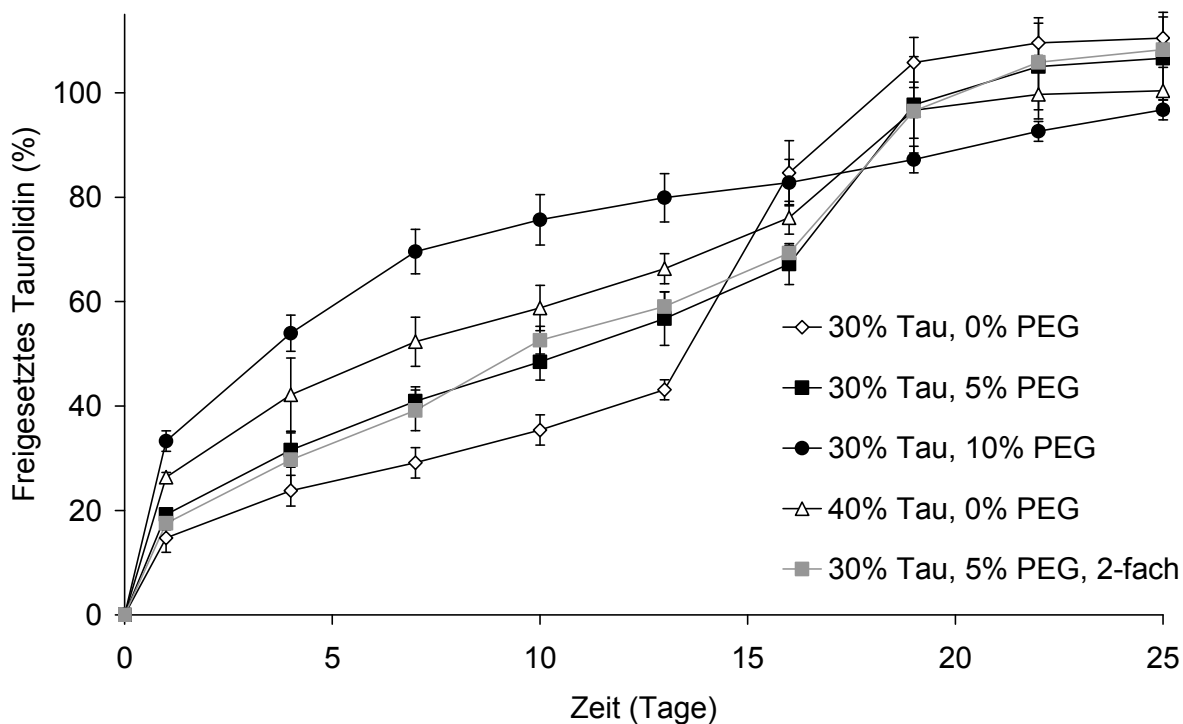


Abbildung 5.62: Freisetzungsverläufe der ausgewählten Formulierungen und der Formulierung mit 30% Taurolidin und 5% PEG 400 mit doppelter Anzahl Extrudate

Weiterhin wird deutlich, dass sich das Freisetzungsprofil durch Verdopplung der Extrudatanzahl bei gleicher Menge Freisetzungsmedium nicht verändert. Der Unterschied zwischen den beiden Freisetzungsraten wird erst bei Betrachtung der absolut freigesetzten Mengen Taurolidin ersichtlich (Abbildung 5.63). So wird annähernd über den gesamten Freisetzungszeitraum die doppelte Menge an Arzneistoff abgegeben. Lediglich an Tag 10 wird etwas mehr und an Tag 13 etwas weniger als die doppelte Menge freigesetzt. Es wurde damit belegt, dass durch Erhöhung der Extrudatanzahl die absolut freigesetzte Menge an Arzneistoff im gleichen Maße zunimmt, ohne dabei den Freisetzungsverlauf zu verändern.

In der Graphik ist zusätzlich zu den freigesetzten Mengen Taurolidin die minimale Hemmkonzentration (MHK) des Hauptkeims *Staphylococcus aureus* aufgetragen, um eine Einschätzung hinsichtlich der Wirksamkeit der Extrudate zu ermöglichen (Nösner und Focht, 1994; Geistlich Pharma, 2008). Dabei zeigt sich, dass die entwickelten Extrudate den Wirkstoff über einen Zeitraum von drei bis vier Wochen oberhalb der MHK freisetzen. Die Überschreitung der MHK ist im Unterschied zu Gentamicinsulfat nicht so deutlich ausgeprägt. Allerdings muss berücksichtigt werden, dass sich die MHK-Werte des Taurolidins nicht einfach auf die Klinik übertragen lassen, da die Wirksamkeit *in vivo* bis zu achtfach höher ist (Schulz et al., 1989; Blenkarn, 1990).

Mit einer Freisetzung über drei bis vier Wochen liegt die Freisetzung noch im angestrebten Zeitraum. Ein Versuch, die Freisetzung weiter zu verzögern, zum Beispiel durch Zusatz einer basischen Komponente und somit Anhebung des pH-Wertes in der Polymermatrix, wurde hier als nicht sinnvoll erachtet. Eine Freisetzung über einen längeren Zeitraum würde zu geringeren freigesetzten Mengen Taurolidin führen, da eine höhere Beladung dieser Extrudate nicht möglich ist (siehe Kapitel 5.1.3).

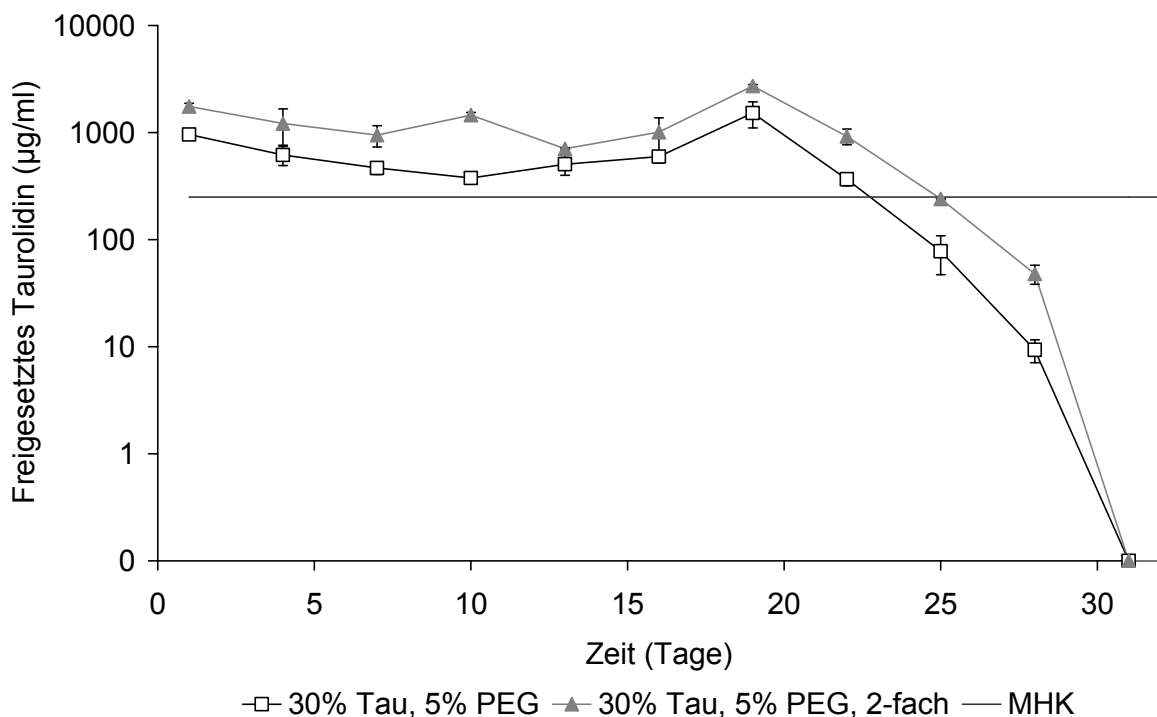


Abbildung 5.63: Absolut freigesetztes Taurolidin der Formulierungen mit 30% Taurolidin und 5% PEG 400 im einfachen und doppelten Ansatz im Vergleich zur MHK von *S. aureus* (250 µg/ml)

#### 5.2.4 DEGRADATION DER EXTRUDATE

Bereits in den vorherigen Kapiteln wurde aufgrund der Freisetzungsvläufe ein verändertes Degradationsverhalten der Polymermatrix der Taurolidin-Extrudate im Vergleich zu den Gentamicinsulfat-Extrudaten angenommen. Zur Überprüfung und näheren Charakterisierung des Polymerabbaus wurden erneut Quellung und Masseverlust der Extrudate sowie der pH-Wert-Verlauf der Freisetzungsmidien untersucht.

Die Quellung der Taurolidin-Formulierungen ist entsprechend der Gentamicinsulfat-Extrudate vorrangig von der PLGA-Konzentration abhängig (Abbildung 5.64). So zeigt der Ansatz mit dem höchsten PLGA-Anteil von 70% (30% Taurolidin, 0% PEG 400) die langsamste Quellung. Durch den relativ geringeren Taurolidin-Anteil entstehen zu Beginn weniger Poren, wodurch wiederum weniger Wasser in die

Extrudate eindringen kann. Außerdem sind durch den höheren PLGA-Anteil zwischen den Ketten mehr intermolekulare Bindungen vorhanden, so dass das Polymer fester ist und somit auch weniger Wasser hineindiffundieren kann. Als Folge quellen diese Extrudate langsamer als die Proben der anderen Formulierungen.

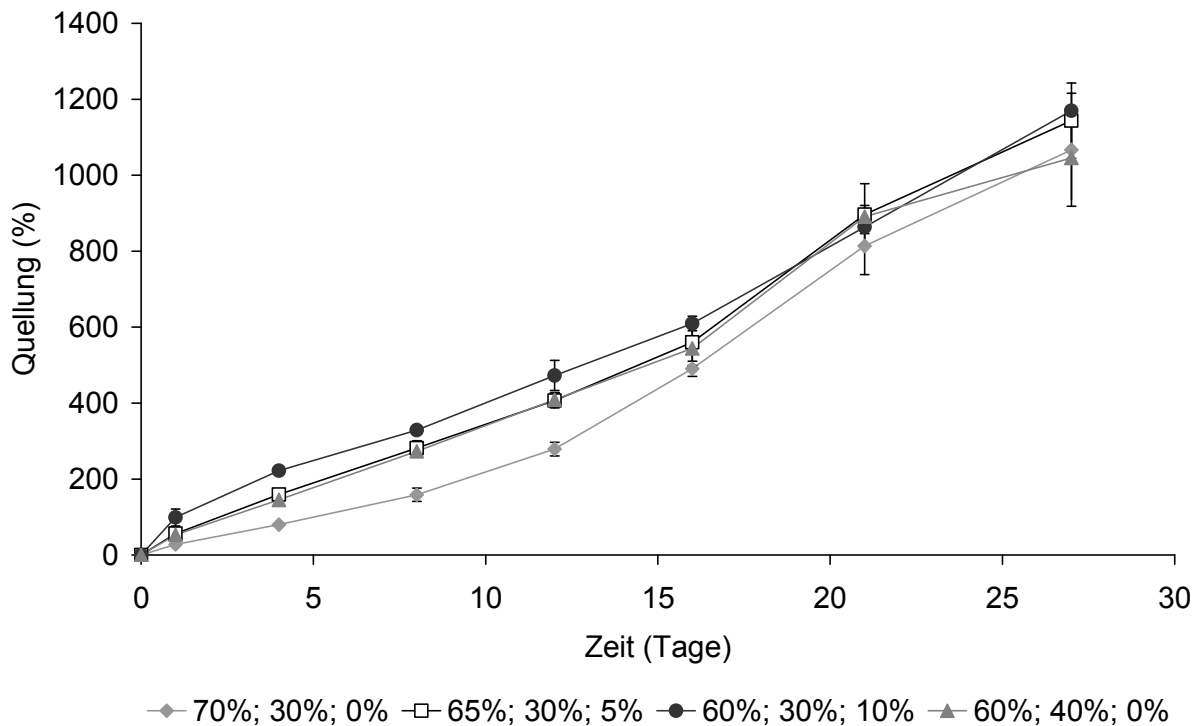


Abbildung 5.64: Massezunahme der Extrudate durch Quellung  
(Konzentrationsangaben: PLGA; Taurolidin; PEG 400)

Die Formulierung mit 30% Taurolidin kombiniert mit 5% Weichmacher und die 40%-Formulierung zeigen eine fast identische Quellung mit einem linearen Anstieg über vier Wochen. Die stärkste Quellung der Extrudate, insbesondere während der ersten zwei Wochen, zeigt die Formulierung mit 30% Arzneistoff und 10% PEG 400, obwohl sie den gleichen PLGA-Gehalt wie die 40%-Formulierung aufweist. Vermutlich wird dieser Effekt durch das PEG 400 innerhalb der ersten Tage hervorgerufen. Dieser sehr hydrophile Weichmacher erleichtert die Diffusion des Wassers in die hydrophobe Polymermatrix stärker als das

Taurolidin, so dass die Extrudate schneller quellen. Ein solcher Einfluss des PEG 400 konnte bei den Gentamicinsulfat-Extrudaten nicht beobachtet werden, da der Arzneistoff aufgrund seines amorphen Zustandes sehr leicht wasserlöslich ist und wahrscheinlich damit ähnlich wie das PEG 400 auf die Wasserpenetration wirkt.

Der Masseverlust der Extrudate entspricht wie bei den Gentamicinsulfat-Formulierungen ungefähr der Masse an freigesetztem Arzneistoff (Abbildung 5.65). Dies bedeutet zum Beispiel bei der 40%-Formulierung nach sieben Tagen ein Masseverlust von etwa 19%, was der freigesetzten Menge an Arzneistoff mit einer prozentualen Masse von circa 20% bezogen auf die Gesamtmasse entspricht. Nach 12 Tagen tritt ein stärkerer Masseverlust der Extrudate auf, welcher den Beginn der dritten Freisetzungsphase, der Erosionsphase, anzeigt (Abbildung 5.66). Die Formulierung mit 30% Taurolidin und 10% PEG 400 zeigt dabei einen leicht abweichenden Verlauf des Masseverlusts: die Erosionsphase beginnt erst nach 16 Tagen. Als Ursache kommen vermutlich zwei Effekte zum Tragen: zum einen die bereits in Kapitel 5.1.1 beschriebene partielle Lösung des Taurolidins, die eine geringere Senkung des pH-Wertes in der Polymermatrix und in Folge dessen einen langsameren Polymerabbau bewirkt. Zum anderen entstehen durch die relativ schnelle und hohe Arzneistoffabgabe - in den ersten zwei Wochen etwa 80% des Arzneistoffs - viele Poren. Daher können schon früh Polymerbruchstücke hinaus diffundieren aber auch Freisetzungspuffer in die Extrudate hineindiffundieren und die entstehenden Carboxylgruppen neutralisieren. Die leicht schnellere Quellung dieser Formulierung wurde bereits anfangs diskutiert. Als Folge dieses Effektes findet auch eine geringere Ansäuerung im Inneren der Extrudate statt und somit eine verzögerte Polymerdegradation.



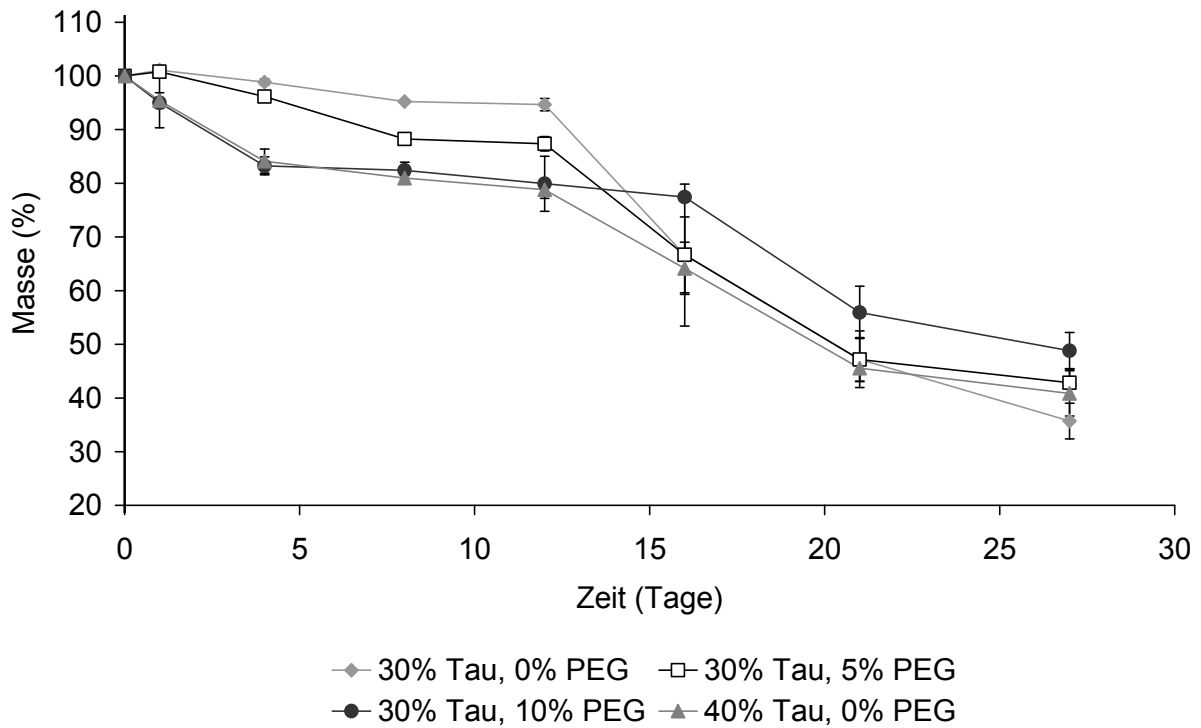


Abbildung 5.65: Masseverlust der Extrudate

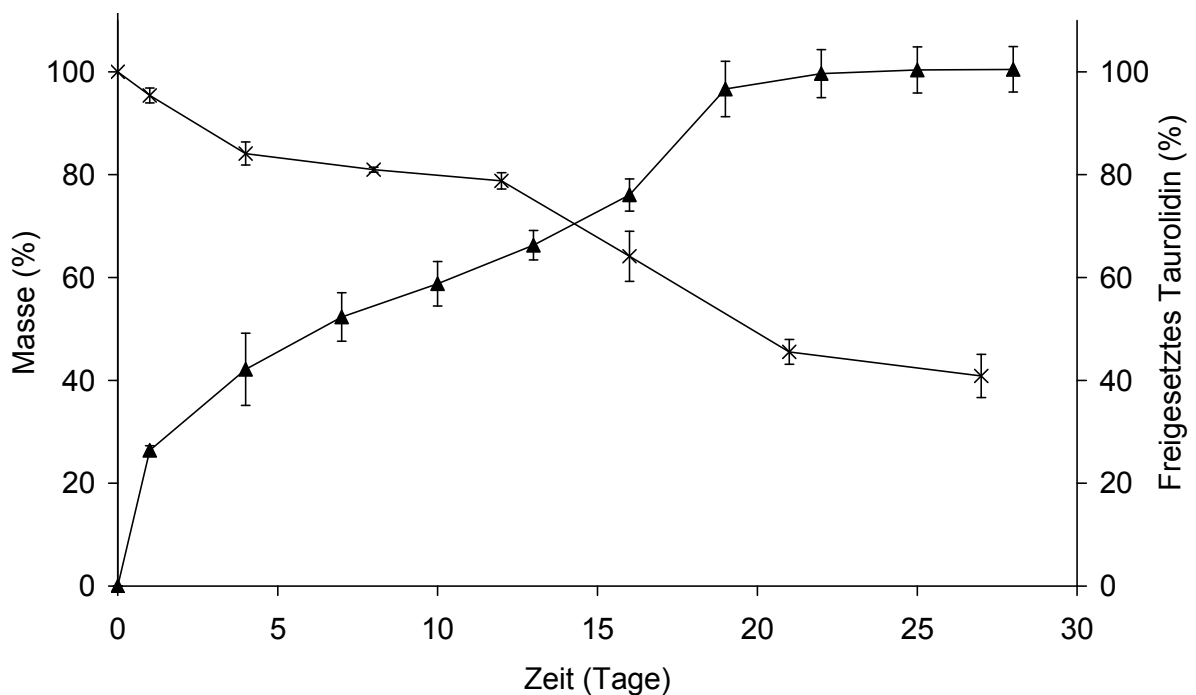


Abbildung 5.66: Masseverlust im Vergleich zur Arzneistofffreisetzung am Beispiel der 40% Taurolidin-Formulierung

Diesen abweichenden Degradationsverlauf der Formulierung mit 30% Taurolidin und 10% PEG 400 kann man zudem anhand des pH-Wert-Verlaufes beobachten (Abbildung 5.67). So findet während der ersten zwei Wochen eine stärkere pH-Wert-Senkung des Freisetzungsmediums statt, da bereits Polymerbruchstücke aus den Extrudaten diffundieren. Nach etwa zwei Wochen fällt der pH-Wert der Freisetzungsmedien der weiteren Formulierungen deutlich ab, da die Erosion der Polymermatrix beginnt. Die Senkung des pH-Wertes der Formulierung mit 30% Taurolidin und 10% PEG 400 setzt aufgrund des langsameren Polymerabbaus verzögert ein. Nach etwa 24 Tagen ist ein pH-Wert von 4,5-5 erreicht. Anschließend verlangsamt sich die Senkung des pH-Wertes, da die in der zweiten Freisetzungsphase im Inneren entstandenen Polymerbruchstücke bereits hinaus diffundiert sind. Die weitere Senkung des pH-Wert wird dann nur noch durch die in dem Zeitraum tatsächlich entstandenen löslichen sauren PLGA-Oligomere hervorgerufen.

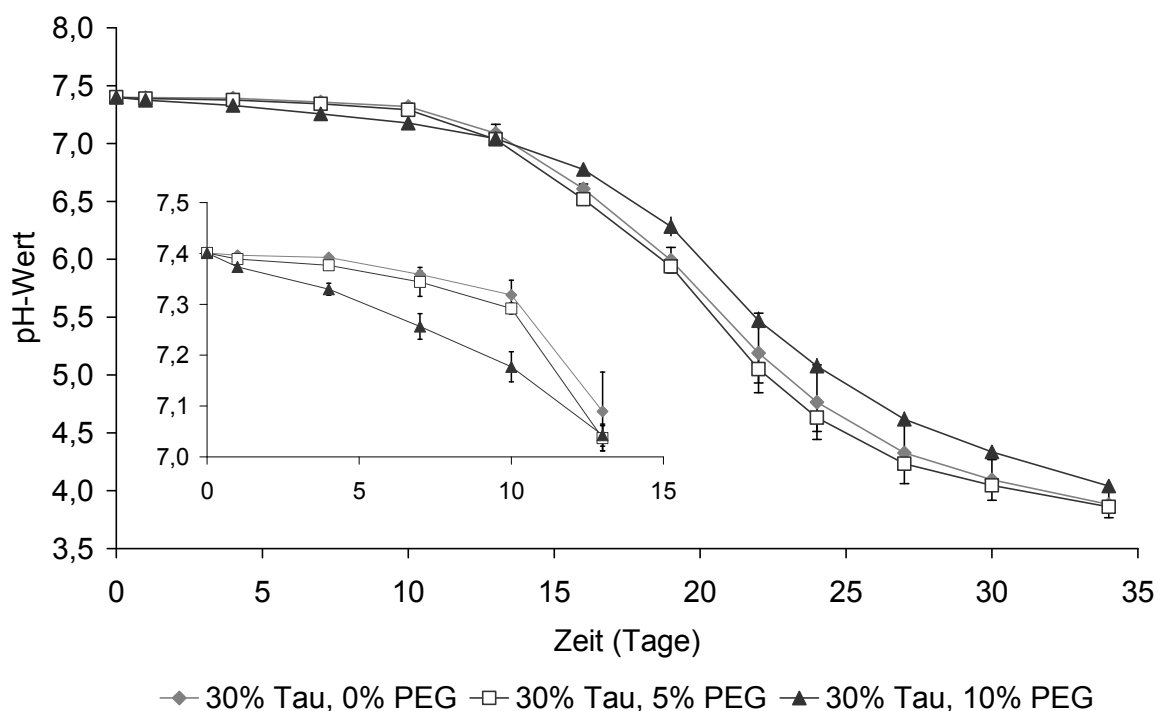


Abbildung 5.67: pH-Wert-Verlauf der Freisetzungsmedien

### **OBERFLÄCHENMORPHOLOGISCHE BETRACHTUNGEN DER EXTRUDATE**

Um auch den Degradationsverlauf der Taurolidin-Extrudate sichtbar zu machen, wurden elektronenmikroskopische Aufnahmen angefertigt (Abbildung 5.68 bis Abbildung 5.70). Für die Aufnahmen wurden die Chargen mit 30% Taurolidin ohne Weichmacher und mit 10% PEG 400 ausgewählt. Von den Chargen ohne Weichmacher konnten allerdings nur Bilder bis zum Tag 8 erstellt werden, da die Extrudate von späteren Zeitpunkten nach der Gefriertrocknung nicht mehr formstabil waren. Die Formulierung mit dem höchsten Weichmacher-Anteil von 10% wies aufgrund des langsameren Polymerabbaus eine etwas bessere Formstabilität auf, so dass Aufnahmen bis zum Tag 12 möglich waren. Anhand dieser Bilder sind die Veränderungen der Oberflächenstruktur während der Freisetzung deutlich zu beobachten. Nach bereits einem Tag sind in der Oberfläche kleine Löcher erkennbar, aus denen Taurolidin herausgelöst wurde. Dieses an der Oberfläche inkorporierte und damit schnell herausgelöste Taurolidin ist für den Bursteffekt zu Beginn der Freisetzung verantwortlich. Weiterhin sind bei der Formulierung mit 10% Weichmacher mehr und größere Poren sichtbar, durch die vermutlich eine schnellere Wasserpenetration in die Extrudate und eine Diffusion von Polymerbruchstücken aus der Matrix möglich werden. Es findet infolgedessen eine langsamere Polymerdegradation statt, weshalb auch die Extrudate länger formstabil bleiben.

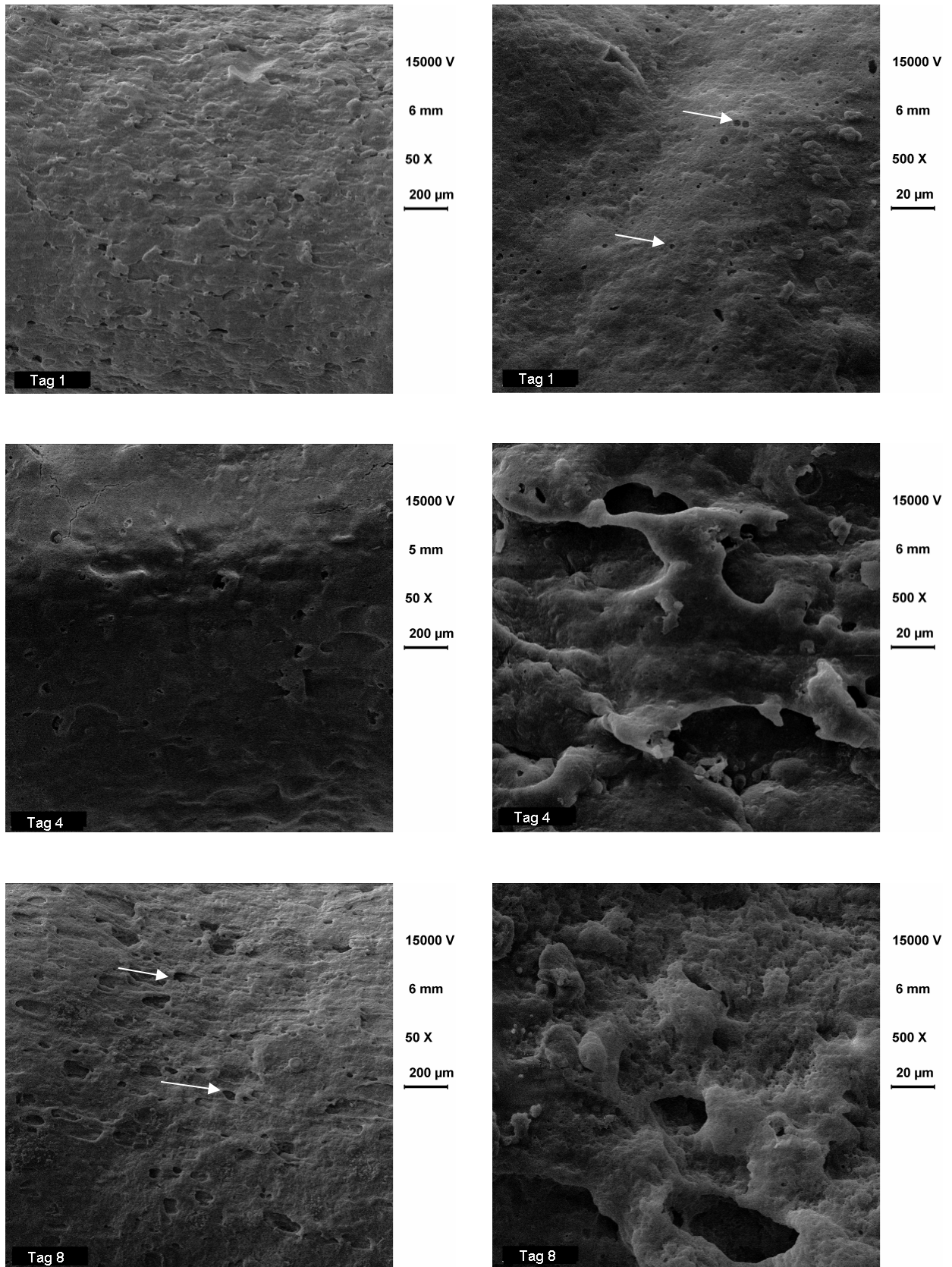


Abbildung 5.68: Degradationsverlauf der Extrudate mit 30% Taurolidin und ohne PEG 400; Tag 1, 4 und 8

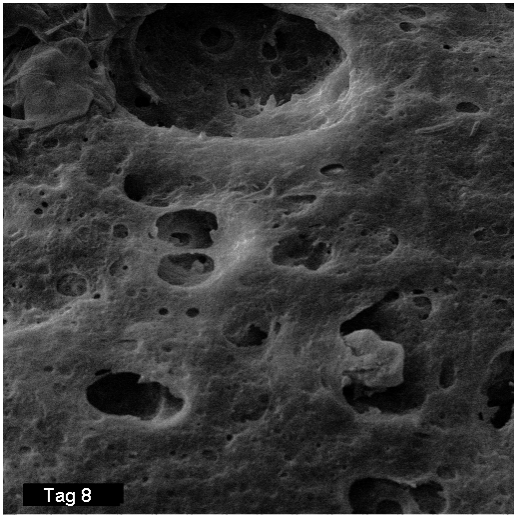
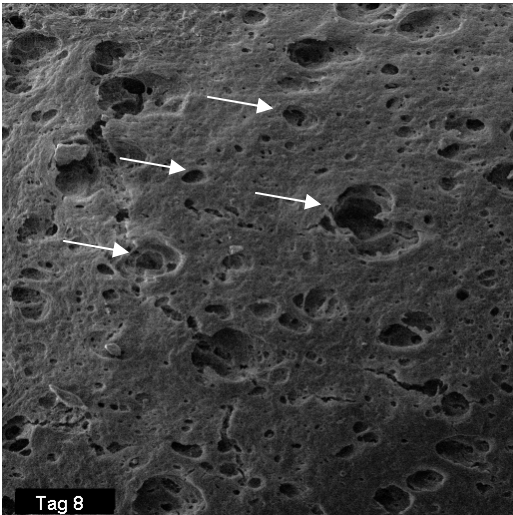
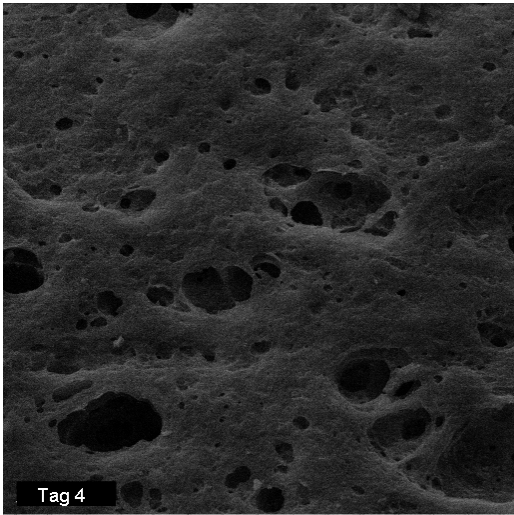
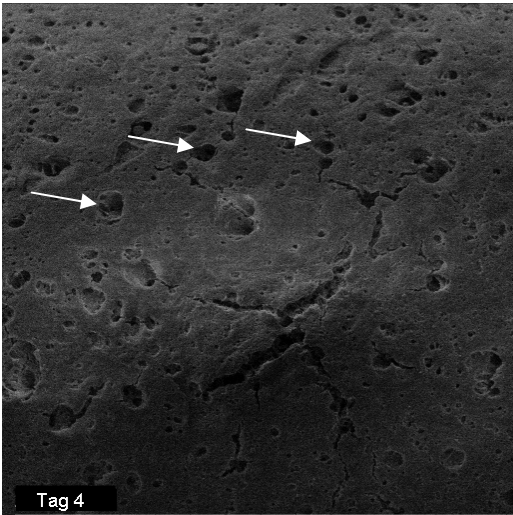
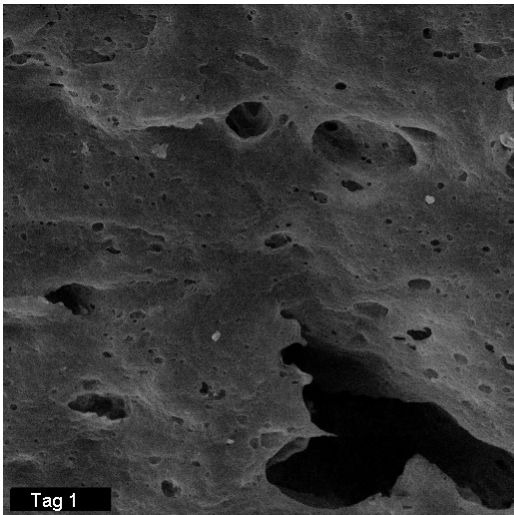
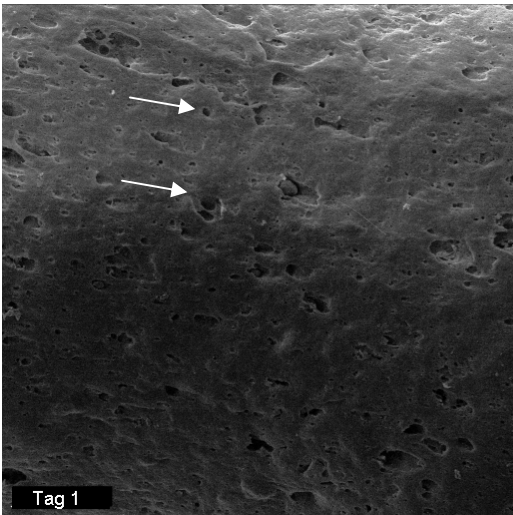


Abbildung 5.69: Degradationsverlauf der Extrudate mit 30% Taurolidin und mit 10% PEG 400; Tag 1, 4 und 8

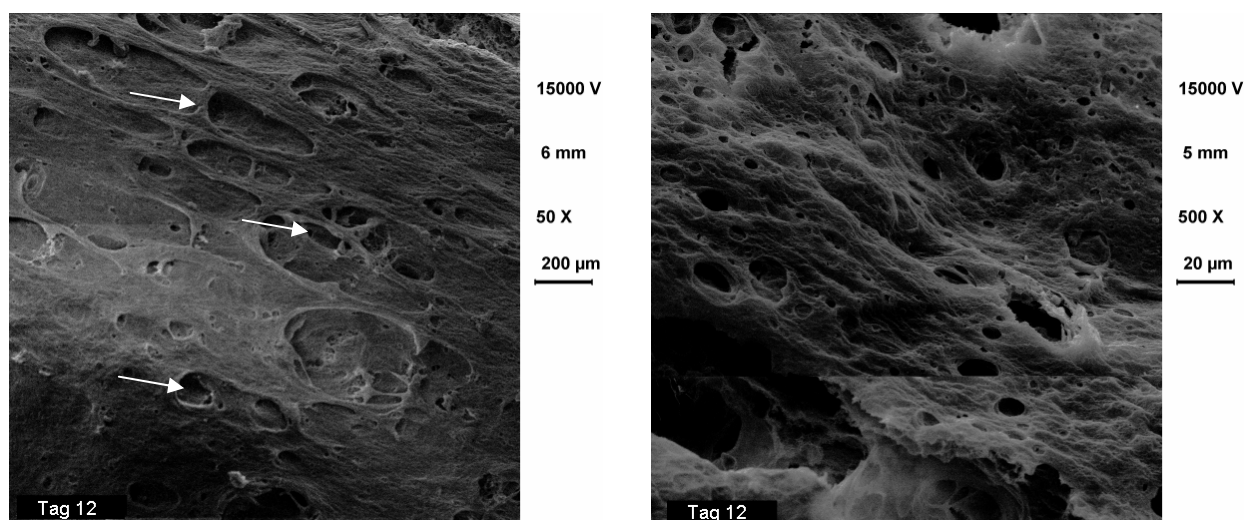


Abbildung 5.70: Degradationsverlauf der Extrudate mit 30% Taurolidin und mit 10% PEG 400; Tag 12

### 5.2.5 EINFLUSS EINER STRAHLENSTERILISATION

Wie in Kapitel 4.4.7 dargelegt, kann eine Strahlensterilisation unterschiedliche Auswirkungen auf eine PLGA-basierte Arzneiform aufweisen, welche bei der Entwicklung berücksichtigt werden sollten. Es wurden aus diesem Grund auch die Taurolidin-Extrudate strahlensterilisiert und anschließend hinsichtlich ihres Arzneistoffgehalts und Freisetzungsverhaltens untersucht.

Die Gehaltsbestimmungen zeigen keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Arzneistoffgehalte vor und nach der Sterilisation (Abbildung 5.71). Die Gehalte der einzelnen Extrudate nach der Sterilisation, ausgedrückt als Prozentsatzes des Sollgehaltes, liegen alle zwischen 90% und 110%. Eine Zersetzung des Taurolidins durch die Strahlensterilisation wurde auch nicht erwartet, da das sich auf dem Markt befindende Taurolin<sup>®</sup> 4%-Feingranulat ebenfalls gammasterilisiert wird (Geistlich Pharma, 2008).

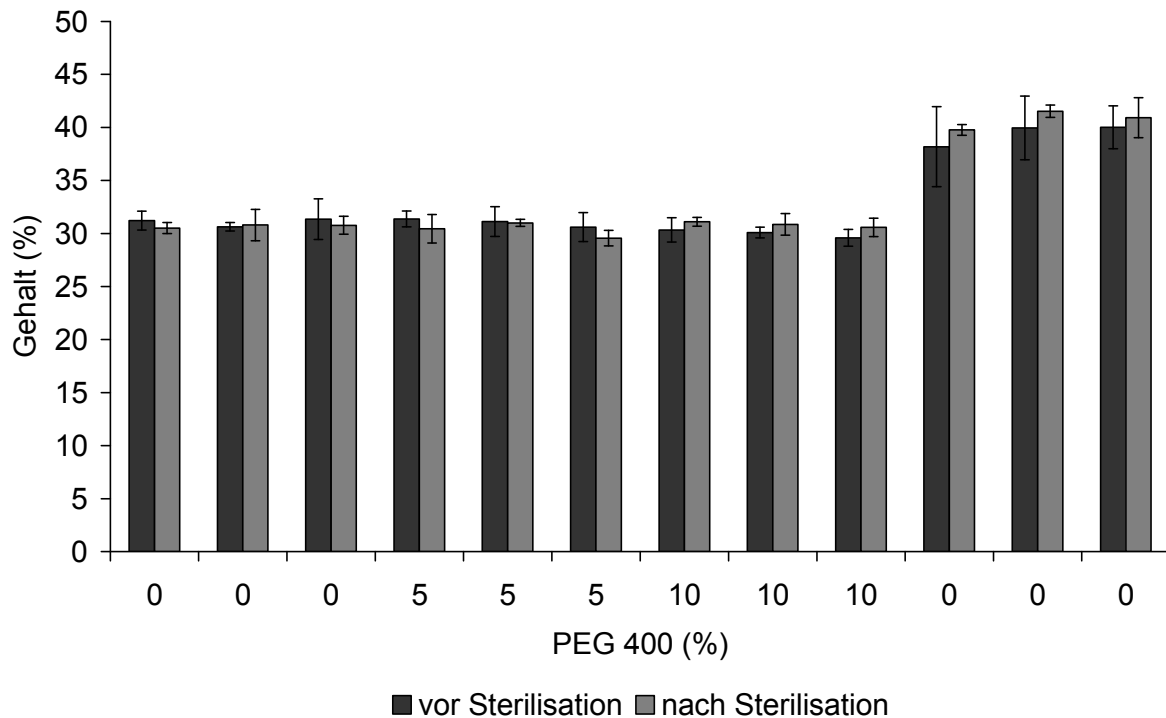


Abbildung 5.71: Gehaltsbestimmungen der Chargen vor und nach der Sterilisation

Bei den Freisetzungsforschungen der Taurolidin-Extrudate zeigen sich jedoch ähnliche Unterschiede wie bei den Gentamicinsulfat-Formulierungen (Abbildung 5.72 und Abbildung 5.73). Bei der Burst-Freisetzung wird weniger Arzneistoff abgegeben, aber anschließend verlaufen die Kurven parallel, was eine gleiche Freisetzungsgeschwindigkeit bedeutet. Des Weiteren weisen nun alle Formulierungen einen Anstieg der Freisetzungsrates und damit den Beginn der Erosion nach etwa 13 Tagen auf. Scheinbar findet durch die Strahlensterilisation eine Erniedrigung des Molekulargewichts des PLGAs statt, so dass zu Beginn der Freisetzung kürzere Polymerketten vorliegen, die dementsprechend schneller zu löslichen Bruchstücken abgebaut werden (Park, 1994). Daher setzt bei den Formulierungen die Erosionsphase etwas früher ein, mit Ausnahme der Formulierung mit 30% Arzneistoff und ohne PEG 400, bei der keine Veränderung bezüglich des Erosionsbeginns auftritt.

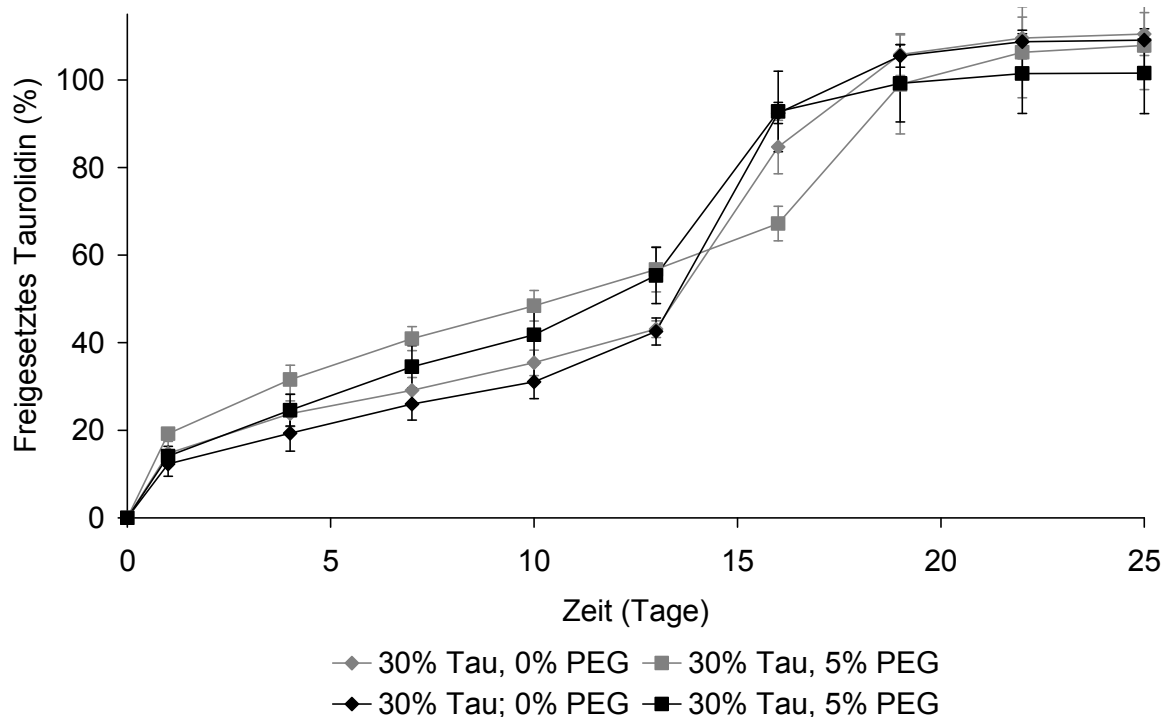


Abbildung 5.72: Freisetzungverläufe vor (helle Symbole) und nach (dunkle Symbole) der Sterilisation

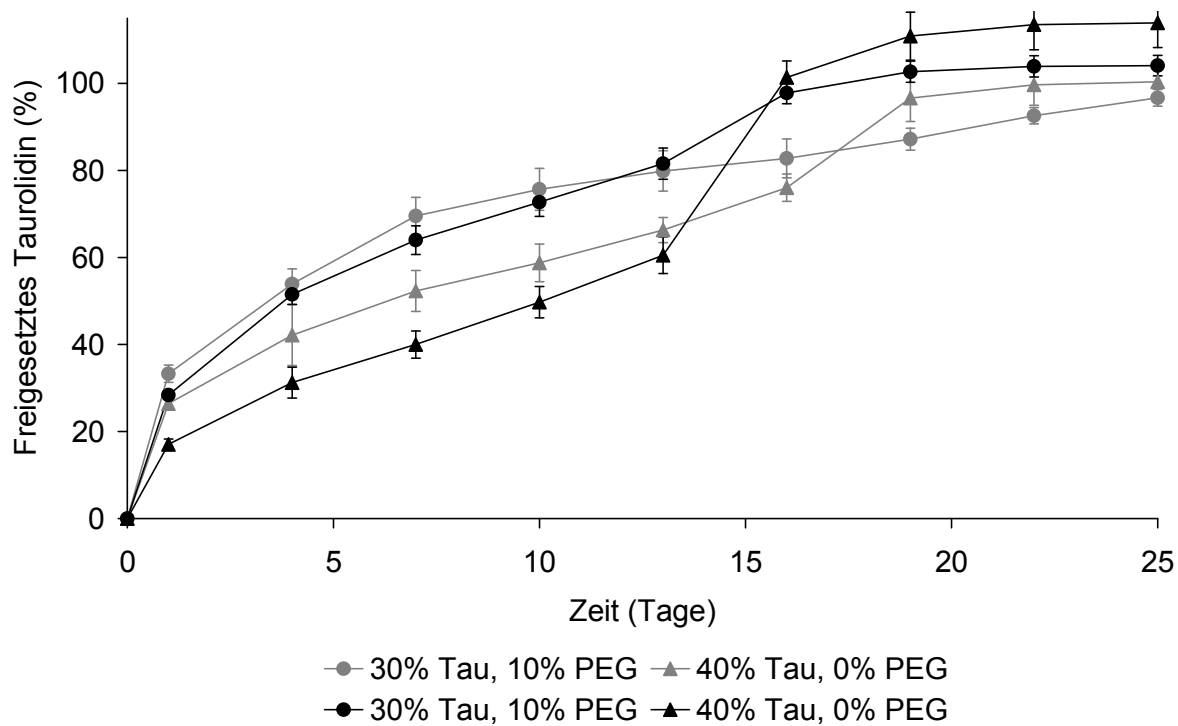


Abbildung 5.73: Freisetzungverläufe vor (helle Symbole) und nach (dunkle Symbole) der Sterilisation



Betrachtet man die absolut freigesetzten Mengen Taurolidin am Beispiel der Formulierung mit 30% Taurolidin und 5% PEG 400 vor und nach der Sterilisation, lassen sich in den ersten zwei Wochen nur geringfügig unterschiedliche Freisetzungsgeschwindigkeiten feststellen. Erst durch das frühere Einsetzen der Erosionsphase weichen die Verläufe voneinander ab. Dessen ungeachtet wird nach wie vor über knapp drei Wochen Taurolidin oberhalb der MHK von *S. aureus* abgegeben.

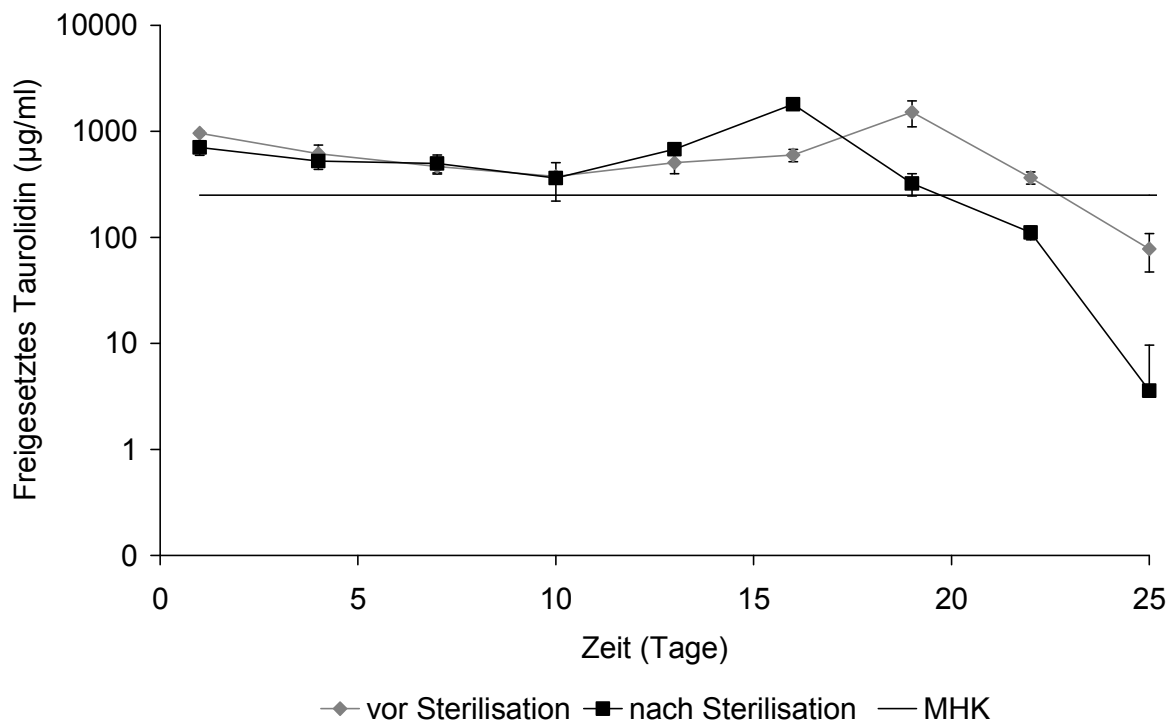


Abbildung 5.74: Absolut freigesetztes Taurolidin der Formulierung mit 30% Taurolidin und 5% PEG 400 vor und nach der Sterilisation im Vergleich zur minimalen Hemmkonzentration von *S. aureus*

### 5.3 ZUSAMMENFASSUNG DES KAPITELS

Nach erfolgreicher Herstellung einer bioabbaubaren Depotarzneiform mit Gentamicinsulfat wurde versucht, dieses Arzneistoffträgersystem auf Taurolidin zu übertragen. Es wurde dazu basierend auf den Resultaten der Entwicklung der Gentamicinsulfat-Extrudate PEG 400 als Weichmacher ausgewählt, da dieses die Prozessierbarkeit der

Formulierung erheblich verbessert, aber nicht die Freisetzung des Arzneistoffs aus den Extrudaten beschleunigt, was wiederum zu favorisierten Freisetzungsprofilen führt. Die hergestellten Taurolidin-Extrudate wurden hinsichtlich der Eigenschaften der Arzneiform und des Freisetzungsverhaltens untersucht sowie deren Unterschiede zu den Gentamicinsulfat-Extrudaten herausgestellt.

Die Bestimmung der Glasübergangstemperaturen der extrudierten Formulierungen zeigte eine deutliche Senkung der Tg durch PEG 400, allerdings weisen die Weichmacher-Formulierungen mit zunehmender Taurolidin-Konzentration eine weniger starke Erniedrigung der Tg auf. Dies wird durch eine partielle Lösung des Taurolidins in PLGA verursacht, wobei das PEG 400 als Lösungsvermittler wirkt. Die Weichmachereffizienz sinkt folglich mit zunehmender Taurolidin-Konzentration, wohingegen bei den Gentamicinsulfat-Formulierungen mit zunehmendem Arzneistoff-Gehalt die Weichmachereffizienz erhöht wird. Die Senkung der Schmelzviskosität und damit die enorme Verbesserung der Prozessierbarkeit ist dessen ungeachtet auch bei den Taurolidin-Formulierungen gegeben.

Zur Charakterisierung des vorliegenden dispersen Systems wurden röntgendiffraktometrische Aufnahmen von Extrudaten und physikalischen Mischungen herangezogen, die bei den weichmacherfreien Formulierungen auf das Vorliegen einer Wirkstoffsuspension und bei den PEG 400-haltigen Extrudaten auf eine Mischung aus Wirkstofflösung und -suspension hinweisen.

Die Freisetzungsstudien zeigten, dass die Profile der Taurolidin-Extrudate vergleichbar mit denen der entsprechenden Gentamicinsulfat-Formulierungen sind, die Zeiträume der Arzneistoffabgabe sich hingegen stark unterscheiden. Als Ursache wird die unterschiedliche Basizität der Arzneistoffe angenommen. Gentamicinsulfat ist eine

stärkere Base als Taurolidin und seine Zersetzungsprodukte, so dass während der Freisetzung die Senkung des pH-Wertes in der Polymermatrix durch das Gentamicinsulfat stärker abgepuffert wird. Die Polymerdegradation wird demzufolge durch das Taurolidin weniger verzögert als durch das Gentamicinsulfat, weshalb auch die Erosionsphase eher einsetzt. Beim Vergleich des Degradationsverhaltens der Taurolidin-Extrudate untereinander, konnte ein langsamerer Abbau bei der Formulierung mit einem hohen Weichmacher-Anteil beobachtet werden. Durch das von Beginn an zum Teil gelöst vorliegende Taurolidin wird die Senkung des pH-Wertes stärker abgepuffert, so dass der Abbau weniger katalysiert wird.

Das für die Behandlung der Osteomyelitis beste Freisetzungsprofil der Taurolidin-Extrudate zeigte die Formulierung mit 30% Arzneistoff und 5% PEG 400. Die Wirkstoffabgabe erfolgte dabei nach einem Burst-Effekt linear über zwei Wochen mit einer anschließend durch die Erosion hervorgerufene höhere Freisetzung über etwa ein Woche. Es wurde somit über einen Zeitraum von drei Wochen das Taurolidin oberhalb der MHK von *S. aureus* abgegeben. Durch Sterilisation mit Gammastrahlen wird dieses Freisetzungsprofil hinsichtlich des Einsetzens der Erosionsphase leicht verändert, wenngleich weiterhin eine Arzneistoffliberation über drei Wochen gegeben ist. Die Gehaltsbestimmungen der drei Chargen jeder Formulierung zeigen sowohl vor als auch nach der Sterilisation den angestrebten Sollgehalt ( $\pm 10\%$ ) und eine gute Gleichförmigkeit des Gehalts. Durch den Vergleich der Chargen in Bezug auf signifikante Unterschiede konnte auch bei den Taurolidin-Extrudaten eine hervorragende Reproduzierbarkeit der Herstellung belegt werden.

Beim Vergleich der entwickelten Extrudate mit Gentamicinsulfat und Taurolidin scheinen die Gentamicinsulfat-Extrudate leicht überlegen zu

sein. Die Freisetzungsprofile der besten Gentamicinsulfat-Formulierungen weisen etwas gleichmäßigere Arzneistoffabgaben über einen längeren Zeitraum auf. Zudem wird das Gentamicinsulfat bedeutend oberhalb der MHK von *S. aureus* freigesetzt, das Taurolidin im Vergleich nur relativ wenig oberhalb der MHK, auch wenn in vivo mit einer höheren Wirksamkeit zu rechnen ist. Da allerdings vor der Therapie der chronischen Osteomyelitis im Allgemeinen zunächst ein Antibiogramm erstellt wird (siehe Kapitel 2.2.1), kann eine Wahl entsprechend des Ergebnisses getroffen werden. Liegen Gentamicinsulfat-sensible Bakterienstämme vor, wären die Extrudate mit Gentamicinsulfat zu bevorzugen; bei resistenten Stämmen stellen die Taurolidin-Extrudate eine gute Alternative dar.

## 6 ZUSAMMENFASSUNG DER ARBEIT

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden bioabbaubare Antibiotikaträgersysteme zur lokalen Behandlung der chronischen Osteomyelitis entwickelt. Die Therapie dieser Knocheninfektion beinhaltet neben dem Débridement - einem Ausräumen des gesamten infizierten Knochenmaterials - eine systemische Antibiotikagabe. Zusätzlich erfolgt häufig eine lokale Therapie mit Gentamicinsulfat-beladenen Polymethylmethacrylat-Kugelketten (Septopal®) zur Erreichung hoher Antibiotika-Konzentrationen am schlecht durchbluteten Wirkort, was allerdings eine zweite Operation zur Entfernung der nicht bioabbaubaren Matrix erfordert. Daher sollte einerseits Gentamicinsulfat mit Hilfe der Schmelzextrusion in das bioabbaubare Copolymer Polylaktid-co-glykolid (PLGA) inkorporiert und andererseits dieses System auf Taurolidin, ein Chemotherapeutikum ohne bekannte Resistenzen, übertragen werden.

In den Freisetzungsstudien mit Gentamicinsulfat, welches als stabile amorphe innere Arzneistoffphase in dem amorphen Träger PLGA vorliegt, zeigt sich ein dreiphasiges Profil mit einer Burst-Freisetzung, einer Phase mit verzögerter Arzneistoffliberation (lag-Phase) und einer nachfolgenden erhöhten Freisetzungsrates bedingt durch den Beginn der Erosion der Polymermatrix. Die lag-Phase kann durch Verwendung einer hydrophileren PLGA-Qualität verkürzt und durch eine hohe Arzneistoffbeladung (>25%) sogar vollständig eliminiert werden.

Zur Verbesserung der Prozessierbarkeit während der Schmelzextrusion aber auch zur Modifizierung des Freisetzungsprofils wurden verschiedene Weichmacher hinsichtlich ihrer Kompatibilität und Effizienz untersucht. Die ausgewählten Weichmacher Tributylcitrat und Polyethylenglykol (PEG) 400 weisen eine gute Weichmachereffizienz auf, unterscheiden sich jedoch deutlich hinsichtlich ihres Einflusses auf

das Freisetzungsverhalten. Das im Vergleich zu PEG 400 hydrophobere Tributylcitrat verbleibt während der Freisetzung im Polymer, so dass über den gesamten Zeitraum die Glasübergangstemperatur erniedrigt ist. Durch die höhere Mobilität und Flexibilität der Polymerketten wird die Diffusion innerhalb der Polymermatrix erleichtert und somit die Arzneistofffreisetzung beschleunigt. Darüber hinaus wird das Polymer schneller abgebaut, so dass die gesamte Freisetzung bereits nach etwa 20 Tagen abgeschlossen ist.

PEG 400 hingegen diffundiert während der Freisetzung sehr schnell aus der Polymermatrix und hat damit keinen weiteren Einfluss auf das Freisetzungsprofil. Die Formulierungen mit 25% Gentamicinsulfat zeigen ein optimales Freisetzungsprofil mit einer linearen Freisetzung über vier bis fünf Wochen nach einem initialen Bursteffekt und sind mit dem etablierten Marktprodukt Septopal<sup>®</sup> vergleichbar.

Für die Übertragung des Arzneistoffträgersystems auf Taurolidin wurde der Weichmacher PEG 400 ausgewählt, da dieser die Prozessierbarkeit verbessert, ohne die Freisetzung zu beschleunigen. Die Bestimmung der Glasübergangstemperaturen der Taurolidin-Extrudate zeigte eine abnehmende Weichmachereffizienz bei zunehmender Arzneistoffkonzentration, welche auf eine teilweise Lösung des Taurolidins im PEG 400 zurückgeführt wurde. PEG 400 wirkt hierbei als Lösungsvermittler, so dass Taurolidin zum Teil gelöst im PLGA vorliegt und damit die Glasübergangstemperatur leicht erhöht. Somit liegt vermutlich im dispersen System der Weichmacher-haltigen Extrudate eine Mischung aus Wirkstofflösung und -suspension im Polymer vor, bei den Extrudaten ohne PEG 400 hingegen nur eine Suspension. Die Taurolidin-Extrudate zeigen ähnliche Freisetzungsprofile wie die Gentamicinsulfat-Formulierungen, die Zeiträume unterscheiden sich jedoch beträchtlich. Durch die geringere Basizität des Taurolidins im

Vergleich zu Gentamicinsulfat wird die durch den Polymerabbau bedingte pH-Wert-Senkung im Inneren der Polymermatrix geringer abgepuffert und die Polymerdegradation somit weniger verzögert. Die optimierte Taurolidin-Formulierung mit 30% Arzneistoff und 5% PEG 400 wies eine Wirkstoffabgabe mit einem Burst-Effekt gefolgt von einer linearen Freisetzung über zwei Wochen und eine durch die Erosion bedingte höhere Freisetzungsrates über etwa eine Woche auf.

Weiterhin konnte durch statistische Auswertungen von Gehaltsbestimmungen sowohl bei den Gentamicinsulfat- als auch bei den Taurolidin-Extrudaten eine sehr gute Gleichförmigkeit des Gehaltes sowie eine hervorragende Reproduzierbarkeit des Herstellungsverfahrens aufgezeigt werden.

Da parenterale Depotarzneiformen sterilisiert werden müssen, wurde der Einfluss einer Gammastrahlensterilisation auf die Extrudate untersucht. Es konnte dabei weder bei den Gentamicinsulfat- noch bei den Taurolidin-Extrudaten eine Verringerung der Arzneistoffgehalte festgestellt werden. Die Freisetzungsprofile wiesen dagegen bei beiden Arzneistoffen leichte Veränderungen auf, die vermutlich auf eine geringfügige Reduzierung des Molekulargewichts des PLGAs durch die Sterilisation zurückzuführen ist. Gleichwohl findet eine gleichmäßige Freisetzung des Gentamicinsulfats über etwa fünf und von Taurolidin über etwa drei Wochen oberhalb der minimalen Hemmkonzentration von *S. aureus* – dem Hauptkeim der Osteomyelitis – statt.

Mit dieser Arbeit wurde gezeigt, dass sich mit dem einfachen Verfahren der Schmelzextrusion bioabbaubare Implantate herstellen lassen, die *in vitro* über den für die Therapie der chronischen Osteomyelitis geforderten Zeitraum von drei bis sechs Wochen den Arzneistoff effektiv und gleichmäßig freisetzen.

## 7 ABSTRACT

The aim of this thesis was the development of biodegradable antibiotic delivery systems for the local treatment of chronic osteomyelitis. The therapy of this bone infection includes a débridement of the infected bone material and a systemic administration of antibiotics. In order to achieve high antibiotic concentrations in the poorly blood-supplied bone areas, local drug delivery systems consisting of non-biodegradable polymethylmethacrylate beads loaded with gentamicin sulphate (Septopal®) are often used. However, such a system requires a second surgery for removal.

To circumvent this disadvantage, implants based on the biodegradable polymer poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) with gentamicin sulphate as active pharmaceutical ingredient were developed using a hot melt extrusion process. Additionally, this system was transferred and adopted to taurolidine, a chemotherapeutic without known bacterial resistance.

The in vitro release of amorphous gentamicin sulphate incorporated in PLGA reveals a three-phase profile including a burst release, a lag-phase followed by a phase of faster release caused by the erosion of the polymer matrix. The lag-phase could be reduced by utilizing a more hydrophilic PLGA quality or even could be eliminated completely with higher drug load (>25%).

To improve the processability during hot melt extrusion and to modify the release profiles different plasticizers were investigated regarding their compatibility and plasticization efficiency. The selected plasticizers tributyl citrate and polyethylene glycol (PEG) 400 exhibited good plasticization efficiency. However, the influence on the release behaviour of the extrudates differed considerably. Compared to PEG 400, the more hydrophobic tributyl citrate remains in the polymer during drug release, so that the glass transition temperature is decreased over the whole

---



period of time. Due to the higher mobility and flexibility of the polymer chains, the diffusion inside the polymer matrix is facilitated and therefore the drug liberation is enhanced. Moreover, the polymer is degraded faster, so that the drug release is completed within approximately 20 days.

In contrast, PEG 400 is washed out very fast out of the polymer matrix and hence had no further impact on the release profile. The formulations with 25% gentamicin sulphate showed an optimal release profile with a burst effect followed by a linear drug release rate over approximately four to five weeks. In addition, the drug liberation is comparable to the established marketed product Septopal<sup>®</sup>.

In further investigations gentamicin sulphate was replaced by taurolidine. PEG 400 was chosen as plasticizer since it improves the processability without accelerating the drug release. The measurement of the glass transition temperatures of the taurolidine extrudates exhibited decreasing plasticizer efficiency with increasing drug content, which is attributed to a partial dissolution of taurolidine in PEG 400. The plasticizer acts as solubilizer enabling partial solution of taurolidine in PLGA, thus slightly increasing the glass transition temperature. Consequently, the disperse system of the extrudates with plasticizer presumably represents a mixture of solution and suspension in the polymer matrix, whereas the extrudates without PEG 400 are simple suspensions. The taurolidine extrudates show similar release profiles to the gentamicin sulphate formulations, though the release rates differ remarkably. Due to the lower basicity of taurolidine, the decrease of the pH-value in the polymer matrix caused by degradation of the polymer is more pronounced. Consequently the polymer degradation is enhanced compared to the gentamicin sulphate extrudates. The optimized taurolidine formulation containing 30% active ingredient and 5% PEG 400 revealed an initial

burst release followed by a linear release over a period of two weeks and subsequent a higher drug liberation over one week as result of the polymer erosion.

Furthermore, a statistical evaluation of the drug content of gentamicin sulphate as well as taurolidine demonstrated both an excellent drug content uniformity and a high reproducibility of the manufacturing process.

As sterilization is required for parenteral drug delivery systems, the effect of gamma sterilization on the extrudates was investigated. No decrease in drug content was detectable in either the gentamicin sulphate or the taurolidine extrudates. However, the release profiles of both active ingredients showed slight alterations, which are presumably caused by a reduction of the molecular weight of the polymer during sterilization. Nevertheless, the active ingredients gentamicin sulphate and taurolidine were released well above the minimal inhibitory concentration of *S. aureus* – the main pathogen of osteomyelitis – over a period of approximately five weeks and three weeks, respectively.

The results of this thesis suggest that by using hot melt extrusion technology biodegradable implants can be produced, which reveal effective and prolonged in vitro drug release over the period of time needed to treat chronic osteomyelitis.

## 8 ANHANG

### 8.1 ABKÜRZUNGEN

BCS	Biopharmaceutics Classification System
caMRSA	Community acquired methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
DSC	Differential scanning calorimetry
$\eta_0$	Nullviskosität
FDA	Food and Drug Administration
Fmoc	9-Fluorenylmethylchlorformiat
$\dot{\gamma}$	Schergeschwindigkeit
$\dot{\gamma}_c$	Kritische Schergeschwindigkeit
GS	Gentamicinsulfat
haMRSA	Hospital or healthcare acquired methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
HPLC	High performance liquid chromatography
IL-1 $\beta$	Interleukin-1beta
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
K	Kelvin
k	Konsistenz
kGy	Kilogray
kN	Kilonewton
KOH	Kaliumhydroxid
kV	Kilovolt
laMRSA	Livestock-associated methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
LPS	Lipopolysaccharid
M	Molare Masse
mA	Milliampere

---

MHK	Minimale Hemmkonzentration
mol	Stoffmenge
MRSA	Multi-resistenter Staphylococcus aureus
n	Fließindex
OPA	Ortho-Phthalaldehyd
p	Signifikanzlevel
Pa	Pascal
PBP	Penicillin-Bindeprotein
PEG	Polyethylenglykol
PGA	Polyglycolic acid
Ph. Eur.	Pharmacopoea Europaea
PLA	Polylactic acid
PLGA	Poly(lactic-co-glycolic acid)
PMMA	Polymethylmethacrylat
REM	Rasterelektronenmikroskop
rF	Relative Feuchte
RP	Reverse phase
rRNA	Ribosomale Ribonukleinsäure
S. aureus	Staphylococcus aureus
$\tau$	Schubspannung
Tau	Taurolidin
TBC	Tributylcitrat
TEC	Triethylcitrat
Tg	Glasübergangstemperatur
TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor-alpha
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure
USP	United States Pharmacopeia

---

## ABKÜRZUNGEN

---

UV	Ultraviolett
VISA	Vancomycin intermediär resistenter Staphylococcus aureus
VRSA	Vancomycin-resistenter Staphylococcus aureus
$X_{10}$	10% Quantil der Partikelgrößenverteilung
$X_{50}$	50% Quantil der Partikelgrößenverteilung
$X_{90}$	90% Quantil der Partikelgrößenverteilung

---

## 8.2 VERWENDETE SUBSTANZEN

PLGA 5050 DLFR1	Lakeshore Biomaterials, Birmingham, Großbritannien
9-Fluorenylmethylchlorformiat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Acetonitril	99,8% Reinheit (HPLC-Qualität), J.T. Baker, Deventer, Niederlande
Aqua bidest.	frisch hergestellt, FinnAqua 75, San Asalo Sohlberg Corp., Helsinki, Finnland
Borsäure	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Dibutylsebacat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Dichlormethan	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Essigsäure 96% (Eisessig)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Gentamicinsulfat	Caesar & Lorentz GmbH, Hilden , Deutschland
Glycerol	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Glyceroltriacetat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Isopropanol	99,8% Reinheit (HPLC-Qualität) AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Kaliumhydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Kaliumhydroxid	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

## VERWENDETE SUBSTANZEN

---

Methanol	99,8% Reinheit (HPLC-Qualität), J.T. Baker, Deventer, Niederlande
Natrium-1-heptansulfonat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Natriumhydroxid	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
ortho-Phthalaldehyd	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Polyethylenglycol 400	Lutrol E 400, BASF, Ludwigshafen, Deutschland
Polyethylenglycol 4000	Clariant GmbH, Sulzbach, Deutschland
Resomer <sup>®</sup> RG 503 H	Boehringer Ingelheim, Ingelheim, Deutschland
Sorbitol	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Taurolidin	Hauseigene Synthese
Thioglykolsäure	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Tributylcitrat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Triethylcitrat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Trifluoressigsäure	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

---

## 9 LITERATURVERZEICHNIS

- Aitken-Nichol, C., Zhang, F. und McGinity, J. W. (1996) Hot melt extrusion of acrylic films. *Pharm Res* 13(5): 804-8.
- Allhenn, D. und Lamprecht, A. (2010). Nanopartikel zur oralen Wirkstoffapplikation. *Innovative Arzneiformen*. K. Mäder and U. Weidenauer. Stuttgart, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft: 53-65.
- Ambrose, C. G., Clyburn, T. A., Loudon, K., Joseph, J., Wright, J., Gulati, P., Gogola, G. R. und Mikos, A. G. (2004) Effective treatment of osteomyelitis with biodegradable microspheres in a rabbit model. *Clin. Orthop. Relat. Res.*(421): 293-9.
- Ambrose, C. G., Gogola, G. R., Clyburn, T. A., Raymond, A. K., Peng, A. S. und Mikos, A. G. (2003) Antibiotic microspheres: preliminary testing for potential treatment of osteomyelitis. *Clin. Orthop. Relat. Res.*(415): 279-85.
- Anderson (1997) Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 28: 5-24.
- Andrews, G. P., Jones, D. S., Diak, O. A., McCoy, C. P., Watts, A. B. und McGinity, J. W. (2008) The manufacture and characterisation of hot-melt extruded enteric tablets. *Eur J Pharm Biopharm* 69(1): 264-73.
- Baiardo, M., Frisoni, G., Scandola, M., Rimelen, M., Lips, D., Ruffieux, K. und Wintermantel, E. (2003) Thermal and mechanical properties of plasticized Poly(L-lactic acid). *J Appl Polym Sci* 90: 1731-1738.
- Beck-Broichsitter, M., Kamm, W., Schöttle, I. A. und Kissel, T. (2010). Parenterale Depotarzneiformen - Mikropartikel. *Innovative Arzneiformen*. K. Mäder and U. Weidenauer. Stuttgart, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH: 235-262.
- Berkland, C., Kim, K. und Pack, D. W. (2003) PLG microsphere size controls drug release rate through several competing factors. *Pharm Res* 20(7): 1055-62.



- Bertram, C. (2006) Endogene (hämatogene) Osteomyelitis. Fortbildung Osteologie 1: 111-115.
- Bhardwaj, R. B., J. (1997) In vitro evaluation of Poly(D,L -lactide-co-glycolide) polymer-based implants containing the  $\alpha$ -melanocyte stimulating hormone analog, Melanotan-I J. Control. Release 45(1): 49-55.
- Bischoff, M., Kinzl, L. und Schmelz, A. (1999) [The complicated wound]. Unfallchirurg 102(10): 797-804.
- Bittner, B., Witt, C., Mader, K. und Kissel, T. (1999) Degradation and protein release properties of microspheres prepared from biodegradable poly(lactide-co-glycolide) and ABA triblock copolymers: influence of buffer media on polymer erosion and bovine serum albumin release. J. Control. Release 60(2-3): 297-309.
- Blaha, J. D., Calhoun, J. H., Nelson, C. L., Henry, S. L., Seligson, D., Esterhai, J. L., Jr., Heppenstall, R. B., Mader, J., Evans, R. P., Wilkins, J. und et al. (1993) Comparison of the clinical efficacy and tolerance of gentamicin PMMA beads on surgical wire versus combined and systemic therapy for osteomyelitis. Clin Orthop Relat Res(295): 8-12.
- Blenkharn, J. I. (1990) In-vitro antibacterial activity of noxythiolin and taurolidine. J. Pharm. Pharmacol. 42(8): 589-90.
- Brady, R. A., Leid, J. G., Costerton, J. W. und Shirtliss, M. E. (2006) Osteomyelitis: Clinical Overview and Mechanisms of Infection Persistence. Clinical Microbiology Newsletter 28(9): 65-71.
- Breitenbach, J. (2000) Feste Lösungen durch Schmelzextrusion - ein integriertes Herstellkonzept. Pharmazie in unserer Zeit 1: 46-49.
- Breitenbach, J. (2002) Melt extrusion: from process to drug delivery technology. Eur. J. Pharm. Biopharm. 54(2): 107-17.
- Breitenbach, J. (2010). Herstellung fester Arzneiformen durch Extrusion. Innovative Arzneiformen. K. Mäder and U. Weidenauer. Stuttgart, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH: 89-98.

- Breitenbach, J. und Mägerlein, M. (2003). Melt-Extruded Molecular Dispersions. *Pharmaceutical Extrusion Technology*. I. Ghebressellassie and C. Martin. New York, Marcel Dekker: 245-260.
- Browne, M. K., Leslie, G. B. und Pfirrmann, R. W. (1976) Taurolin, a new chemotherapeutic agent. *J Appl Bacteriol* 41(3): 363-8.
- Bruce, C., Fegely, K. A., Rajabi-Siahboomi, A. R. und McGinity, J. W. (2007) Crystal growth formation in melt extrudates. *Int J Pharm* 341(1-2): 162-72.
- Calhoun, J. H., Henry, S. L., Anger, D. M., Cobos, J. A. und Mader, J. T. (1993) The treatment of infected nonunions with gentamicin-polymethylmethacrylate antibiotic beads. *Clin Orthop Relat Res*(295): 23-7.
- Calhoun, J. H. und Mader, J. T. (1997) Treatment of osteomyelitis with a biodegradable antibiotic implant. *Clin. Orthop. Relat. Res.*(341): 206-14.
- Ceri, H., Olson, M. E., Stremick, C., Read, R. R., Morck, D. und Buret, A. (1999) The Calgary Biofilm Device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms. *J Clin Microbiol* 37(6): 1771-6.
- Cevher, E., Orhan, Z., Sensoy, D., Ahiskali, R., Kan, P. L., Sagirli, O. und Mulazimoglu, L. (2007) Sodium fusidate-poly(D,L-lactide-co-glycolide) microspheres: preparation, characterisation and in vivo evaluation of their effectiveness in the treatment of chronic osteomyelitis. *J. Microencapsul.* 24(6): 577-95.
- Chiou, W. L. und Riegelman, S. (1971) Pharmaceutical applications of solid dispersion systems. *J Pharm Sci* 60(9): 1281-302.
- Ciorny, G., 3rd und DiPasquale, D. (2006) Treatment of chronic infection. *J Am Acad Orthop Surg* 14(10 Spec No.): S105-10.
- Ciorny, G., 3rd, Mader, J. T. und Penninck, J. J. (2003) A clinical staging system for adult osteomyelitis. *Clin Orthop Relat Res*(414): 7-24.
- Crowley, M. M., Zhang, F., Repka, M. A., Thumma, S., Upadhye, S. B., Battu, S. K., McGinity, J. W. und Martin, C. (2007) *Pharmaceutical*

- applications of hot-melt extrusion: part I. *Drug Dev Ind Pharm* 33(9): 909-26.
- Cui, L., Ma, X., Sato, K., Okuma, K., Tenover, F. C., Mamizuka, E. M., Gemmell, C. G., Kim, M. N., Ploy, M. C., El-Solh, N., Ferraz, V. und Hiramatsu, K. (2003) Cell wall thickening is a common feature of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 41(1): 5-14.
- Diefenbeck, M., Muckley, T. und Hofmann, G. O. (2006) Prophylaxis and treatment of implant-related infections by local application of antibiotics. *Injury* 37 Suppl 2: S95-104.
- Dunne, M., Corrigan, I. und Ramtoola, Z. (2000) Influence of particle size and dissolution conditions on the degradation properties of polylactide-co-glycolide particles. *Biomaterials* 21(16): 1659-68.
- Englert, C., Angele, P., Fierlbeck, J., Dendorfer, S., Schubert, T., Müller, R., Lienhard, S., Zellner, J., Nerlich, M. und Neumann, C. (2007) Konduktives Knochenersatzmaterial mit variabler Antibiotikaversetzung. *Unfallchirurg* 110(5): 408-13.
- Erb, F., Febvay, N. und Imbenotte, M. (1982) Structural investigation of a new organic antiseptic: Taurolidine A spectroscopic study of its stability and equilibria in various solvents. *Talanta* 29(11 Pt 1): 953-8.
- Faber, C., Hoogendoorn, R. J., Stallmann, H. P., Lyaruu, D. M., van Nieuw Amerongen, A. und Wuisman, P. I. (2004) In vivo comparison of Dhvar-5 and gentamicin in an MRSA osteomyelitis prevention model. *J Antimicrob Chemother* 54(6): 1078-84.
- Felton, L. (2007). Film Coating of Oral Solid Dosage Forms. *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*. J. Swarbrick. Pinehurst, Informa Healthcare USA. 3: 1729-1747.
- Fernandez-Carballido, A., Puebla, P., Herrero-Vanrell, R. und Pastoriza, P. (2006) Radiosterilisation of indomethacin PLGA/PEG-derivative microspheres: protective effects of low temperature during gamma-irradiation. *Int. J. Pharm.* 313(1-2): 129-35.
- Fix, I. (2004). Anwendungen der quantitativen Röntgendiffraktometrie (QXRD) in der pharmazeutischen Analytik. Mathematisch-

Naturwissenschaftlichen Fakultät. Bonn, Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität.

- Flick, A. B., Herbert, J. C., Goodell, J. und Kristiansen, T. (1987) Noncommercial fabrication of antibiotic-impregnated polymethylmethacrylate beads. Technical note. Clin Orthop Relat Res(223): 282-6.
- Freitas, S., Merkle, H. P. und Gander, B. (2005) Microencapsulation by solvent extraction/evaporation: reviewing the state of the art of microsphere preparation process technology. J. Control. Release 102(2): 313-32.
- Friedrich, A. (2009) Vernetzter Kampf gegen MRSA. Pharmazeutische Zeitung 14.
- Friess, W. und Schlapp, M. (2006) Sterilization of gentamicin containing collagen/PLGA microparticle composites. Eur. J. Pharm. Biopharm. 63(2): 176-87.
- Garvin, K. und Feschuk, C. (2005) Polylactide-polyglycolide antibiotic implants. Clin. Orthop. Relat. Res.(437): 105-10.
- Garvin, K. L., Miyano, J. A., Robinson, D., Giger, D., Novak, J. und Radio, S. (1994) Polylactide/polyglycolide antibiotic implants in the treatment of osteomyelitis. A canine model. J. Bone. Joint Surg. Am. 76(10): 1500-6.
- Geistlich Pharma, G. (2008) Fachinformation Taurolin 4% Feingranulat.
- Gentry, L. O. (1997) Management of osteomyelitis. Int J Antimicrob Agents 9(1): 37-42.
- Geze, A., Venier-Julienne, M. C., Cottin, J., Faisant, N. und Benoit, J. P. (2001) PLGA microsphere bioburden evaluation for radiosterilization dose selection. J Microencapsul 18(5): 627-36.
- Gong, L., Greenberg, H. E., Perhach, J. L., Waldman, S. A. und Kraft, W. K. (2007) The pharmacokinetics of taurolidine metabolites in healthy volunteers. J Clin Pharmacol 47(6): 697-703.

- Gopferich, A. (1996) Mechanisms of polymer degradation and erosion. *Biomaterials* 17(2): 103-14.
- Göpferich, A. (1997) Polymer Bulk Erosion. *Macromolecules* 30: 2598-2604.
- Gorman, S. P., McCafferty, D. F., Woolfson, A. D. und Jones, D. S. (1987) Reduced adherence of micro-organisms to human mucosal epithelial cells following treatment with Taurolin, a novel antimicrobial agent. *J Appl Bacteriol* 62(4): 315-20.
- Grayson, A. C., Cima, M. J. und Langer, R. (2005) Size and temperature effects on poly(lactic-co-glycolic acid) degradation and microreservoir device performance. *Biomaterials* 26(14): 2137-45.
- Gristina, A. G., Oga, M., Webb, L. X. und Hobgood, C. D. (1985) Adherent bacterial colonization in the pathogenesis of osteomyelitis. *Science* 228(4702): 990-3.
- Grizzi, I., Garreau, H., Li, S. und Vert, M. (1995) Hydrolytic degradation of devices based on poly(DL-lactic acid) size-dependence. *Biomaterials* 16(4): 305-11.
- Gross, T., Kaim, A. H., Regazzoni, P. und Widmer, A. F. (2002) Current concepts in posttraumatic osteomyelitis: a diagnostic challenge with new imaging options. *J Trauma* 52(6): 1210-9.
- Gryczke, A. (2008). Downstream processing of extrudates via pelletisation, granulation and milling. APV Experts' Workshop on Hot melt extrusion and its use in the manufacturing of pharmaceutical dosage forms. Ludwigshafen, Germany.
- Günter, S. (2003). Trennungen von Polymeren und Enantiomeren Mizellarelektrokinetische Chromatographie Probenfokussierung. Gemeinsame Naturwissenschaftliche Fakultät. Braunschweig, Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig.
- Haas, D. W. und McAndrew, M. P. (1996) Bacterial osteomyelitis in adults: evolving considerations in diagnosis and treatment. *Am J Med* 101(5): 550-61.

- Habib, M., Onyilofor, S., Ebube, N. K. und Owusu-Ababio, G. (1999) Preparation and characterization of ofloxacin microspheres for the eradication of bone associated bacterial biofilm. *J Microencapsul* 16(1): 27-37.
- Hancock, B. C., Shamblin, S. L. und Zografi, G. (1995) Molecular mobility of amorphous pharmaceutical solids below their glass transition temperatures. *Pharm Res* 12(6): 799-806.
- Hausberger, A. G., Kenley, R. A. und DeLuca, P. P. (1995) Gamma irradiation effects on molecular weight and in vitro degradation of poly(D,L-lactide-CO-glycolide) microparticles. *Pharm Res* 12(6): 851-6.
- Heck, D., Rosenberg, A., Schink-Ascani, M., Garbus, S. und Kiewitt, T. (1995) Use of antibiotic-impregnated cement during hip and knee arthroplasty in the United States. *J Arthroplasty* 10(4): 470-5.
- Höhne, G., Hemminger, W. und Flammersheim, H.-J. (1996). Differential scanning calorimetry: an introduction for practitioners. Berlin Heidelberg, Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York.
- Holland, S. J., Tighe, B. J. und Gould, P. L. (1986) Polymers for biodegradable medical devices. I. The potential of polyesters as controlled macromolecular release systems. *J. Contr. Rel.* 3: 103.
- Jacobi, C. A., Menenakos, C. und Braumann, C. (2005) Taurolidine--a new drug with anti-tumor and anti-angiogenic effects. *Anticancer Drugs* 16(9): 917-21.
- Jain, R. A. (2000) The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) devices. *Biomaterials* 21(23): 2475-90.
- Jao, R. L. und Jackson, G. G. (1964) Gentamicin Sulfate, New Antibiotic against Gram-Negative Bacilli. Laboratory, Pharmacological, and Clinical Evaluation. *Jama* 189: 817-22.
- Kanellakopoulou, K. und Giamarellos-Bourboulis, E. J. (2000) Carrier systems for the local delivery of antibiotics in bone infections. *Drugs* 59(6): 1223-32.

- Klein, C. E., Chiu, Y. L., Awni, W., Zhu, T., Heuser, R. S., Doan, T., Breitenbach, J., Morris, J. B., Brun, S. C. und Hanna, G. J. (2007) The tablet formulation of lopinavir/ritonavir provides similar bioavailability to the soft-gelatin capsule formulation with less pharmacokinetic variability and diminished food effect. *J Acquir Immune Defic Syndr* 44(4): 401-10.
- Klose, D., Siepmann, F., Elkharraz, K., Krenzlin, S. und Siepmann, J. (2006) How porosity and size affect the drug release mechanisms from PLGA-based microparticles. *Int. J. Pharm.* 314(2): 198-206.
- Kluytmans, J. und Struelens, M. (2009) Meticillin resistant *Staphylococcus aureus* in the hospital. *BMJ* 338: 532-537.
- Kong, K. F., Vuong, C. und Otto, M. (2006) *Staphylococcus quorum* sensing in biofilm formation and infection. *Int J Med Microbiol* 296(2-3): 133-9.
- Kranz, H., Ubrich, N., Maincent, P. und Bodmeier, R. (2000) Physicomechanical properties of biodegradable poly(D,L-lactide) and poly(D,L-lactide-co-glycolide) films in the dry and wet states. *J. Pharm. Sci.* 89(12): 1558-66.
- Kresken, M., Hafner, D., Schmitz, F.-J. und Wichelhaus, T. A. (2006) PEG-Resistenzstudie.
- Lazzarini, L., Mader, J. T. und Calhoun, J. H. (2004) Osteomyelitis in long bones. *J Bone Joint Surg Am* 86-A(10): 2305-18.
- Lew, D. P. und Waldvogel, F. A. (2004) Osteomyelitis. *Lancet* 364(9431): 369-79.
- Lin, S. S., Ueng, S. W., Liu, S. J., Chan, E. C., Chao, E. K., Tsai, C. H., Chen, K. T., Wei, F. C. und Shih, C. H. (1999) Development of a biodegradable antibiotic delivery system. *Clin. Orthop. Relat. Res.*(362): 240-50.
- Liu, S. J., Chi, P. S., Lin, S. S., Ueng, S. W., Chan, E. C. und Chen, J. K. (2007) Novel solvent-free fabrication of biodegradable poly-lactic-glycolic acid (PLGA) capsules for antibiotics and rhBMP-2 delivery. *Int. J. Pharm.* 330(1-2): 45-53.

- Liu, S. J., Tsai, Y. E., Wen-Neng Ueng, S. und Chan, E. C. (2005) A novel solvent-free method for the manufacture of biodegradable antibiotic-capsules for a long-term drug release using compression sintering and ultrasonic welding techniques. *Biomaterials* 26(22): 4662-9.
- Marcilla, A. und Beltrán, M. (2004). Mechanisms of Plasticizers Actions. *Handbook of Plasticizers*. G. Wypych. Toronto, ChemTec Publishing: 107-120.
- Martinez-Salgado, C., Lopez-Hernandez, F. J. und Lopez-Novoa, J. M. (2007) Glomerular nephrotoxicity of aminoglycosides. *Toxicol Appl Pharmacol* 223(1): 86-98.
- Maurer, K. M. (2009). Verlaufsbeobachtung zur *Staphylococcus aureus*-Nasenkolonisation bei Intensivpatienten und gesunden Probanden. Medizinischen Fakultät. Tübingen, Eberhard -Karls -Universität.
- McGinity, J. W., Repka, M. A., Koleng, J. J. und Zhang, F. (2007). Hot-Melt Extrusion Technology. *Encyclopedia of pharmaceutical technology*. J. Swarbrick. New York, Informa Healthcare USA. 3: 2004-2020.
- Middleton, J. C. und Tipton, A. J. (2000) Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices. *Biomaterials* 21(23): 2335-46.
- Miller, R. A., Brady, J. M. und Cutright, D. E. (1977) Degradation rates of oral resorbable implants (polylactates and polyglycolates): rate modification with changes in PLA/PGA copolymer ratios. *J Biomed Mater Res* 11(5): 711-9.
- Montanari, L., Cilurzo, F., Valvo, L., Faucitano, A., Buttafava, A., Groppo, A., Genta, I. und Conti, B. (2001) Gamma irradiation effects on stability of poly(lactide-co-glycolide) microspheres containing clonazepam. *J Control Release* 75(3): 317-30.
- Myers, E., Allwood, M. C., Gidley, M. J. und Sanders, J. K. (1980) The relationship between structure and activity of taurolin. *J Appl Bacteriol* 48(1): 89-96.
- Naraharisetti, P. K., Lew, M. D., Fu, Y. C., Lee, D. J. und Wang, C. H. (2005) Gentamicin-loaded discs and microspheres and their



- modifications: characterization and in vitro release. *J Control Release* 102(2): 345-59.
- Nelson, C. L. (2004) The current status of material used for depot delivery of drugs. *Clin Orthop Relat Res*(427): 72-8.
- Nestler, G., Schulz, H. U., Schubert, D., Kruger, S., Lippert, H. und Pross, M. (2005) Impact of taurolidine on the growth of CC531 coloncarcinoma cells in vitro and in a laparoscopic animal model in rats. *Surg Endosc* 19(2): 280-4.
- Neut, D., van de Belt, H., Stokroos, I., van Horn, J. R., van der Mei, H. C. und Busscher, H. J. (2001) Biomaterial-associated infection of gentamicin-loaded PMMA beads in orthopaedic revision surgery. *J Antimicrob Chemother* 47(6): 885-91.
- Nösner, K. und Focht, J. (1994) In-vitro-Wirksamkeit von Taurolidin und 9 Antibiotika gegen klinische Isolate aus chirurgischem Einsendegut sowie gegen Pilze. *Chir Gastroenterol* 10 (Suppl. 2): 80-89.
- Omelczuk, M. O. und McGinity, J. W. (1992) The influence of polymer glass transition temperature and molecular weight on drug release from tablets containing poly(DL-lactic acid). *Pharm Res* 9(1): 26-32.
- Packhaeuser, C. B., Schnieders, J., Oster, C. G. und Kissel, T. (2004) In situ forming parenteral drug delivery systems: an overview. *Eur J Pharm Biopharm* 58(2): 445-55.
- Pahl, M., Gleißle, W. und Laun, H.-M. (1995). *Praktische Rheologie der Kunststoffe und Elastomere*. Düsseldorf, VDI-Gesellschaft Kunststofftechnik.
- Park (1994) Degradation of poly (D,L-lactic acid) microspheres: effect of molecular weight. *J. Control. Release* 30: 161-173.
- Patzakis, M. J., Mazur, K., Wilkins, J., Sherman, R. und Holtom, P. (1993) Septopal beads and autogenous bone grafting for bone defects in patients with chronic osteomyelitis. *Clin Orthop Relat Res*(295): 112-8.

- Peters, K. M. (2006) Exogene (unspezifische) Osteomyelitis. Fortbildung Osteologie 1: 116-119.
- Petridu, J. (2002). Molekularbiologische Analysen der Resistenzmechanismen Makrolid-resistenter Staphylococcus aureus Isolate. Institut für Medizinische Mikrobiologie und Virologie. Düsseldorf, Heinrich-Heine-Universität.
- Pfarrmann, R. W. (1985). Taurolin: Ein neues Konzept zur antimikrobiellen Chemotherapie chirurgischer Infektionen, Einführung und Übersicht. Taurolin. Wien, Brückner, W. L. Pfarrmann, R. W.: 3-24.
- Pietro, L., Silva, D. R., Alberto-Rincon, M. C. und Duek, E. A. (2006) The influence of triethylcitrate on the biological properties of poly (L-lactic-co-glycolic acid) membranes. J. Mater. Sci. Mater. Med. 17(9): 849-57.
- Pistner, H., Bendix, D. R., Muhling, J. und Reuther, J. F. (1993) Poly(L-lactide): a long-term degradation study in vivo. Part III. Analytical characterization. Biomaterials 14(4): 291-8.
- Popham, G. J., Mangino, P., Seligson, D. und Henry, S. L. (1991) Antibiotic-impregnated beads. Part II: Factors in antibiotic selection. Orthop. Rev. 20(4): 331-7.
- Repka, M. A., Gerding, T. G., Repka, S. L. und McGinity, J. W. (1999) Influence of plasticizers and drugs on the physical-mechanical properties of hydroxypropylcellulose films prepared by hot melt extrusion. Drug Dev Ind Pharm 25(5): 625-33.
- Schieker, M., Heiss, C. und Mutschler, W. (2008) [Bone substitutes]. Unfallchirurg 111(8): 613-9; quiz 620.
- Schmidt, C., Wenz, R., Nies, B. und Moll, F. (1995) Antibiotic in vivo/in vitro release, histocompatibility and biodegradation of gentamicin implants based on lactic acid polymers and copolymers. J. Control. Release 37: 83-94.
- Schramm, G. (1995). Einführung in Rheologie und Rheometrie. Karlsruhe, Gebrüder Haake GmbH.

- Schulz, M., Morck, H., Thesen, R. und Zagermann, P. (1989) Taurolidin: Chemotherapeutikum mit neuer Struktur. *Pharmazeutische Zeitung* 4: 212-214.
- Serajuddin, A. T. (1999) Solid dispersion of poorly water-soluble drugs: early promises, subsequent problems, and recent breakthroughs. *J Pharm Sci* 88(10): 1058-66.
- Shenderova, A., Burke, T. G. und Schwendeman, S. P. (1999) The acidic microclimate in poly(lactide-co-glycolide) microspheres stabilizes camptothecins. *Pharm Res* 16(2): 241-8.
- Shtarkman, B. P. R., I.N. (1983) Plasticization mechanism and structure of polymers. *Acta Polymerica* 34: 514-520.
- Siepmann, J., Faisant, N., Akiki, J., Richard, J. und Benoit, J. P. (2004) Effect of the size of biodegradable microparticles on drug release: experiment and theory. *J. Control. Release* 96(1): 123-34.
- Siepmann, J. und Siepmann, F. (2010). Freisetzungsmechanismen in Retard- und Depotarzneiformen. *Innovative Arzneiformen*. K. Mäder and U. Weidenauer. Stuttgart, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH.
- Simpson, A. H., Deakin, M. und Latham, J. M. (2001) Chronic osteomyelitis. The effect of the extent of surgical resection on infection-free survival. *J Bone Joint Surg Br* 83(3): 403-7.
- Soundrapandian, C., Datta, S. und Sa, B. (2007) Drug-eluting implants for osteomyelitis. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 24(6): 493-545.
- Stendel, R. (2007) Pro-apoptotic therapy of brain tumors using taurolidine – experimental and clinical investigations.
- Stewart, P. S. und Costerton, J. W. (2001) Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet* 358(9276): 135-8.
- Tetsworth, K. und Cierny, G., 3rd (1999) Osteomyelitis debridement techniques. *Clin Orthop Relat Res*(360): 87-96.
- Torres-Viera, C., Thauvin-Eliopoulos, C., Souli, M., DeGirolami, P., Farris, M. G., Wennersten, C. B., Sofia, R. D. und Eliopoulos, G. M.

- (2000) Activities of taurolidine in vitro and in experimental enterococcal endocarditis. *Antimicrob Agents Chemother* 44(6): 1720-4.
- Tsukayama, D. T. (1999) Pathophysiology of posttraumatic osteomyelitis. *Clin Orthop Relat Res*(360): 22-9.
- van de Belt, H., Neut, D., Schenk, W., van Horn, J. R., van der Mei, H. C. und Busscher, H. J. (2001) Infection of orthopedic implants and the use of antibiotic-loaded bone cements. A review. *Acta Orthop Scand* 72(6): 557-71.
- Van Duijn, J. W., Barends, D. M., Groot, D. W. und De Neeling, A. J. (1988) High pressure liquid chromatographic determination with ultraviolet detection of gentamicin and correlation with the microbiological potency. *Pharm Weekbl Sci* 10(6): 267-71.
- Völkel, C. (2003). Einfluß von Polymereigenschaften auf pharmazeutisch-technologische und biopharmazeutische Eigenschaften von gepreßten und in situ geformten Implantaten. Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät. Halle-Wittenberg, Martin-Luther-Universität
- Volland, C., Wolff, M. und Kissel, T. (1994) The influence of terminal gamma-sterilization on captopril containing poly(d,l-lactide-co-glycolide) microspheres. *J. Contr. Release* 31: 293-305.
- von Burkersroda, F., Schedl, L. und Gopferich, A. (2002) Why degradable polymers undergo surface erosion or bulk erosion. *Biomaterials* 23(21): 4221-31.
- Wachol-Drewek, Z., Pfeiffer, M. und Scholl, E. (1996) Comparative investigation of drug delivery of collagen implants saturated in antibiotic solutions and a sponge containing gentamicin. *Biomaterials* 17(17): 1733-8.
- Wang, F., Lee, T. und Wang, C. H. (2002) PEG modulated release of etanidazole from implantable PLGA/PDLA discs. *Biomaterials* 23(17): 3555-66.
- Wang, F. C. (2000) Polymer additive analysis by pyrolysis-gas chromatography. I. Plasticizers. *J Chromatogr A* 883(1-2): 199-210.
-

- Wang, G., Liu, S. J., Ueng, S. W. und Chan, E. C. (2004) The release of cefazolin and gentamicin from biodegradable PLA/PGA beads. *Int. J. Pharm.* 273(1-2): 203-12.
- Weigand, R. und Coombes, R. J. (1983) Gentamicin determination by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 281: 381-385.
- Weigel, L. M., Clewell, D. B., Gill, S. R., Clark, N. C., McDougal, L. K., Flannagan, S. E., Kolonay, J. F., Shetty, J., Killgore, G. E. und Tenover, F. C. (2003) Genetic analysis of a high-level vancomycin-resistant isolate of *Staphylococcus aureus*. *Science* 302(5650): 1569-71.
- Winger, D. A. und Fass, R. J. (1996) Antibiotic-impregnated cement and beads for orthopedic infections. *Antimicrob Agents Chemother* 40(12): 2675-9.
- Witt, C., Mader, K. und Kissel, T. (2000) The degradation, swelling and erosion properties of biodegradable implants prepared by extrusion or compression moulding of poly(lactide-co-glycolide) and ABA triblock copolymers. *Biomaterials* 21(9): 931-8.
- Woolfson, A. D. (1989) Assay procedures for Taurolin solutions using pre-column derivatisation and high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Int. J. Pharm.* 49: 135-140.
- Yenice, I., Calis, S., Atilla, B., Kas, H. S., Ozalp, M., Ekizoglu, M., Bilgili, H. und Hincal, A. A. (2003) In vitro/in vivo evaluation of the efficiency of teicoplanin-loaded biodegradable microparticles formulated for implantation to infected bone defects. *J. Microencapsul.* 20(6): 705-17.
- Yoo, J. Y., Kim, J. M., Khang, G., Kim, M. S., Cho, S. H., Lee, H. B. und Kim, Y. S. (2004) Effect of lactide/glycolide monomers on release behaviors of gentamicin sulfate-loaded PLGA discs. *Int. J. Pharm.* 276(1-2): 1-9.
- Yoshioka, S., Aso, Y., Otsuka, T. und Kojima, S. (1995) The effect of  $\gamma$ -irradiation on drug release from polylactide microspheres. *Radiat. Phys. Chem.* 46: 281-285.

- Zhang, X., Wyss, U. P., Pichora, D. und Goosen, M. F. (1994) Biodegradable controlled antibiotic release devices for osteomyelitis: optimization of release properties. *J. Pharm. Pharmacol.* 46(9): 718-24.
- Zhu, Y., Mehta, K. A. und McGinity, J. W. (2006) Influence of plasticizer level on the drug release from sustained release film coated and hot-melt extruded dosage forms. *Pharm Dev Technol* 11(3): 285-94.
- Zhu, Y., Shah, N. H., Malick, A. W., Infeld, M. H. und McGinity, J. W. (2002) Solid-state plasticization of an acrylic polymer with chlorpheniramine maleate and triethyl citrate. *Int J Pharm* 241(2): 301-10.
- Ziegler, K. B. (2006). Die Bedeutung der Biofilmbildung von *Staphylococcus aureus* für die bakterielle Persistenz im Respirationstrakt von Patienten mit der Erbkrankheit Mukoviszidose. Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene. Tübingen, Universitätsklinikum Tübingen.
- Zimmerli, W. (2005) Infektiologie: Der ambulant erworbene methicillinresistente *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA). *Schweiz Med Forum* 5: 1285-1287.

## Danksagung

Mein Dank gilt als erstes meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. Dr. h. c. B. W. Müller für die freundliche Aufnahme in den Arbeitskreis und für die Überlassung des interessanten Themas. Er gab mir die Möglichkeit, mein Promotionsthema frei zu gestalten und stand mit seinem Rat jederzeit zur Seite. Auch für die unkomplizierte und sehr schnelle Beschaffung von Material und Geräten (Minilab II) möchte ich ganz herzlich danken.

Ein weiteres Dankeschön geht an Herrn Prof. Dr. Hartwig Steckel für seine Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit. Er hatte immer ein offenes Ohr für meine Probleme und stand stets mit Anregungen, Ratschlägen und konstruktiver Kritik zur Verfügung. Weiterhin danke ich für die Übernahme des Korreferats und das Korrekturlesen nicht nur meiner Dissertation, sondern auch meiner Veröffentlichungen.

Zu Claudia und Christian,  $\frac{2}{3}$  der morgendlichen Kaffeerunde (wie sehr werde ich diese vermissen ☺), möchte ich nicht mehr schreiben als ein schlichtes: Danke! Erstes wüsste ich gar nicht, wo ich anfangen sollte und zweitens würde eine Aufzählung, wofür dieses „Danke“ ist, einfach den Rahmen dieser Danksagung sprengen.

Susanne und Claudia möchte ich für die schönen gemeinsamen Englischabende danken, bei denen wir zwar auch englische Grammatik und Fachvokabular „gepaukt“ haben, aber vielmehr private Gespräche in Englisch geführt haben.

Für das Korrekturlesen meiner Arbeit möchte ich mich ganz besonders bei Claudia, Regina und Niels für die investierte Zeit und Mühe bedanken. In diesem Rahmen möchte ich mich auch bei Christian und

Maren für das Korrekturlesen meiner Poster und meiner Veröffentlichung bedanken.

Ein besonderes Dankeschön geht an Rüdi, für seine tollen Zeichnungen, seine stete Hilfsbereitschaft und die interessanten, zum Teil philosophischen Unterhaltungen über Theater, Kultur und vieles mehr.

Arne und Detlef danke ich für ihre schnelle Hilfe bei Computerproblemen und Dirk möchte ich für die angefertigten Sonderwünsche danken.

Darüber hinaus möchte ich mich bei Thorsten und Jan für die geopfert Stunden vor dem Rasterelektronenmikroskop und die dabei entstandenen tollen REM-Aufnahmen bedanken.

Ein großer Dank geht auch an alle Kollegen, die nicht nur durch fachliche Diskussionen sondern auch durch eine angenehme und kollegiale Arbeitsatmosphäre zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Die gemeinsamen Feiern, „Klassenfahrten“ und Kongresse während der Promotionszeit werden für mich unvergessen bleiben.

Weiterhin möchte ich von ganzem Herzen Imo, Moni und Yvi sowie der gesamten Familie Homfeldt danken, die mich geduldig durch alle Höhen und Tiefen begleitet haben und mir somit die notwendige Sicherheit für die Erstellung dieser Arbeit gaben.

Zu guter Letzt danke ich meinen Eltern, die mich während meiner gesamten Ausbildung (Schule, Studium und Promotion) immer mit großem Interesse und viel Zuspruch unterstützt haben und ohne die ich niemals so weit gekommen wäre. Vielen Dank!



## **Lebenslauf**

Name	Marieke Gosau
Geburtsdatum	09.04.1981
Geburtsort	Hengelo (O), Niederlande
Staatsangehörigkeit	deutsch

## **Schulbildung**

1987 - 1991	Grund- und Hauptschule Heikendorf
1991 - 2000	Heinrich-Heine-Schule, Gymnasium des Kreises Plön, Heikendorf
Juni 2000	Abitur

## **Studium**

2001 – 2005	Studium der Pharmazie an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
03/2003	1. Staatsexamen
05/2005	2. Staatsexamen

## **Praktische Ausbildung**

07/2005 – 12/2005	Intervet International bv, Boxmeer, Niederlande, Abteilung „Vaccins Technology and Immunology“
01/2006 – 06/2006	Prenz'l-Apotheke, Berlin
07/2006	3. Staatsexamen und Approbation als Apothekerin

## **Promotion**

seit Oktober 2006	am Institut für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie, CAU Kiel
-------------------	------------------------------------------------------------------------

## Erklärung

Hiermit erkläre ich gemäß § 9 der Promotionsordnung der Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, dass ich die vorliegende Arbeit, abgesehen von der Beratung durch meinen Betreuer, selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Ich habe keine anderen als die angegebenen Quellen oder Hilfsmittel benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht. Die vorliegende Arbeit ist unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis entstanden und wurde bei keiner anderen Universität zur Begutachtung eingereicht.

Marieke Gosau