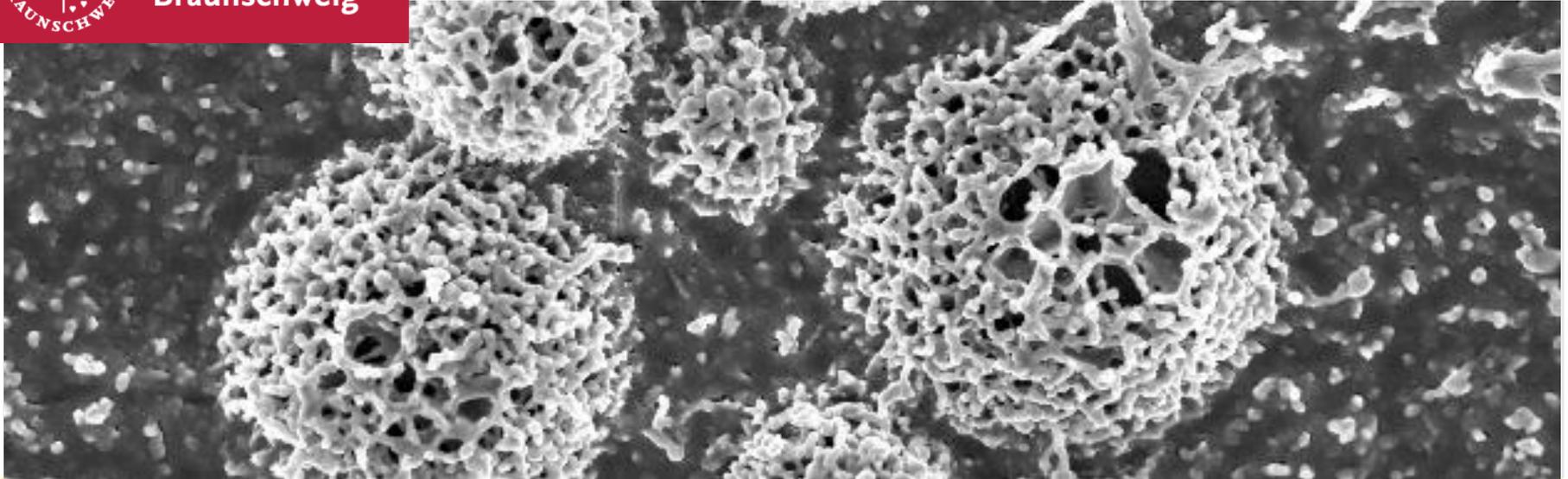




Technische  
Universität  
Braunschweig



Institut für Pharmazeutische Technologie  
pharmazie in braunschweig



## Charakterisierung Hydrogel-basierter Trägersysteme für therapeutische Proteine

Heike Bunjes

Stefanie Wöhl-Bruhn, Andreas Bertz, Henning Menzel et al.

11.03.2015

# Beteiligte Arbeitsgruppen

## Pharmazeutische Technologie

Heike Bunjes  
Stefanie Wöhl-Bruhn

## Technische Chemie

Henning Menzel  
Andreas Bertz



## Physikalische Chemie

Karl-Heinz Gericke  
Jan-Eric Ehlers



## Biotechnologie

Michael Hust  
Sebastian Mieth



## Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung

Peter P. Müller  
Muhammad Badar



## Universität Potsdam

Joachim Koetz  
Brigitte Tiersch



Institut für Chemie

## University of Southern Denmark

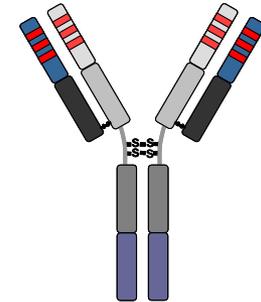
Judith Kuntsche



# Formulierung therapeutische Antikörper

## Herausforderungen

- Hydrophile Moleküle, großes Molekulargewicht (IgG = 150 kDa)
  - ⇒ Geringe Absorption durch biologische Membranen



⇒ parenterale Applikation

- Komplexe 3D-Struktur
- Instabilitäten durch chemische und physikalische Abbaureaktionen
  - ⇒ Aktivitätsverlust
  - ⇒ Ggf. Ursache von Immunreaktionen

# Proteinformulierung

## Proteinlösungen

- Einfachste und wirtschaftlichste Darreichungsform
- Kurze Halbwertszeiten (25 min → 23 Tage)
- Regelmäßige Injektion / Infusion

## Retard-Arzneiformulierungen

- Freisetzung über Wochen bis Monate
  - ⇒ Akzeptanz ↑
- Einbettung in Matrixstruktur
  - ⇒ Schutz des Wirkstoffes
- Gezielte, lokale Applikation
  - ⇒ Systemische Nebenwirkungen ↓

## Einschluss von Proteinen in Matrixsysteme

- Langzeit-Freisetzung
- Häufig verwendet: PLGA
  - ⇒ Organische Lösungsmittel
  - ⇒ Hydrophobes Polymer → Interaktion mit Protein
  - ⇒ Niedrige pH-Werte während Abbau → Degradation

⇒ Einschluss in Hydrogelsysteme

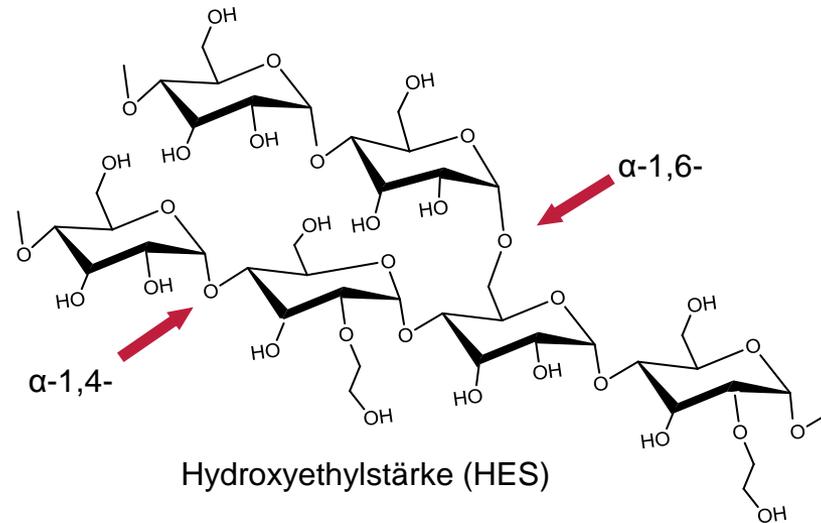
# Hydrogele als Freisetzungssysteme

## Hydrogele

- 3-dimensionale, hydrophile Netzwerke
  - I.d.R. hoher Wassergehalt
  - Weich, biokompatibel
  - Herstellung ohne organische Lösungsmittel
- ⇒ Proteinfreundliche Umgebung
- Bioabbaubarkeit abhängig vom Polymer
  - Freisetzung durch Diffusion und/oder Degradation
  - Netzwerkdichte beeinflusst Freisetzungsprofil
  - Herstellbar in unterschiedlichen Formen (z.B. Zylinder, Mikropartikel)

Biokompatible Hydrogele auf der Basis von Hydroxyethylstärke  
zur kontrollierten Freisetzung von Antikörpern

# Hydroxyethylstärke (HES)

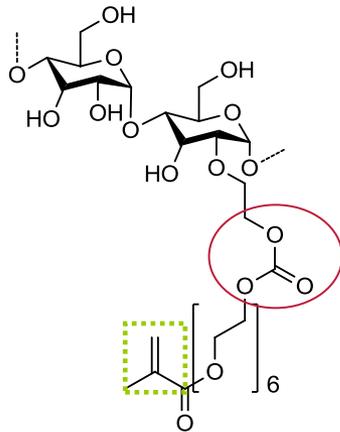


- Wasserlösliches Polysaccharid
- $\alpha$ -1,4- und  $\alpha$ -1,6-glykosidisch verknüpfte D-Glucose
- Plasmaexpander
- Biokompatibel, gut bioabbaubar

⇒ Grundbaustein für die Synthese semi-synthetischer, vernetzbarer Polymere

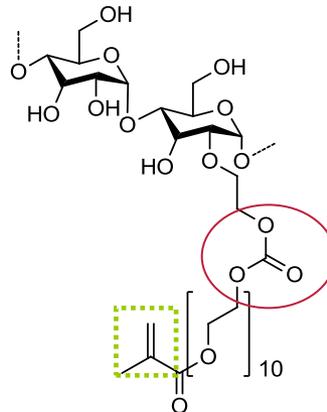
# Wasserlösliche Polymere auf Basis von Hydroxyethylstärke

## HES-P(EG)<sub>6</sub>MA

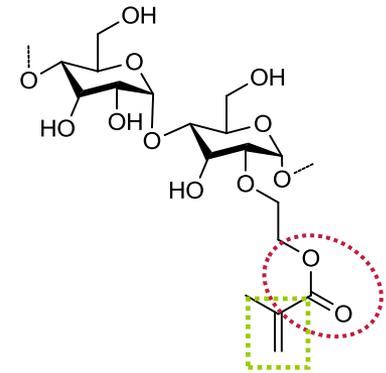


Hydroxyethylstärke-  
polyethylenglykol-methacrylat

## HES-P(EG)<sub>10</sub>MA



## HES-MA



Hydroxyethylstärke-  
methacrylat



Carbonatester



Schnellerer hydrolytischer Abbau



Ester



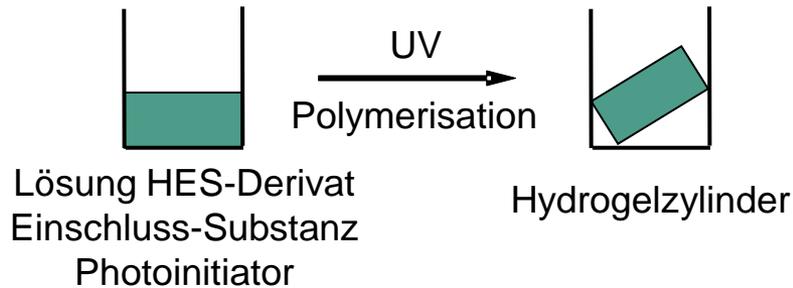
Langsamere hydrolytischer Abbau



Vernetzbar über Methacrylatgruppe

# Herstellung verschiedener Freisetzungssysteme

## Bulk-Hydrogele (Zylinder, Scheiben)

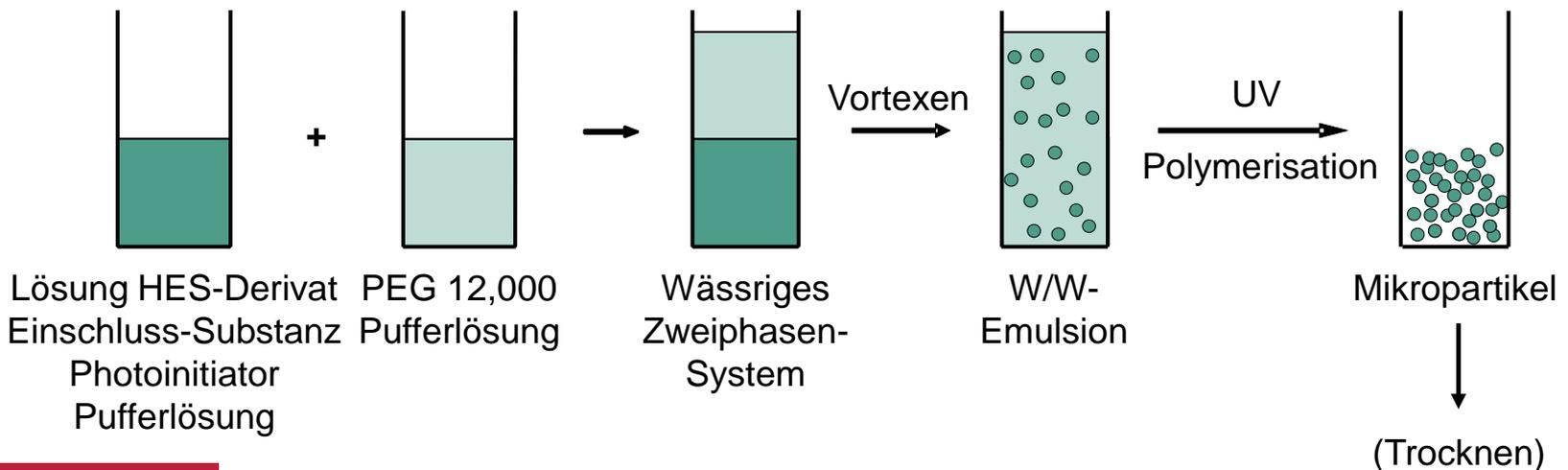


### Einschluss-Substanzen:

FITC-Dextrane (20 - 500 kDa),  
FITC-IgG, FITC-scFv, GFP

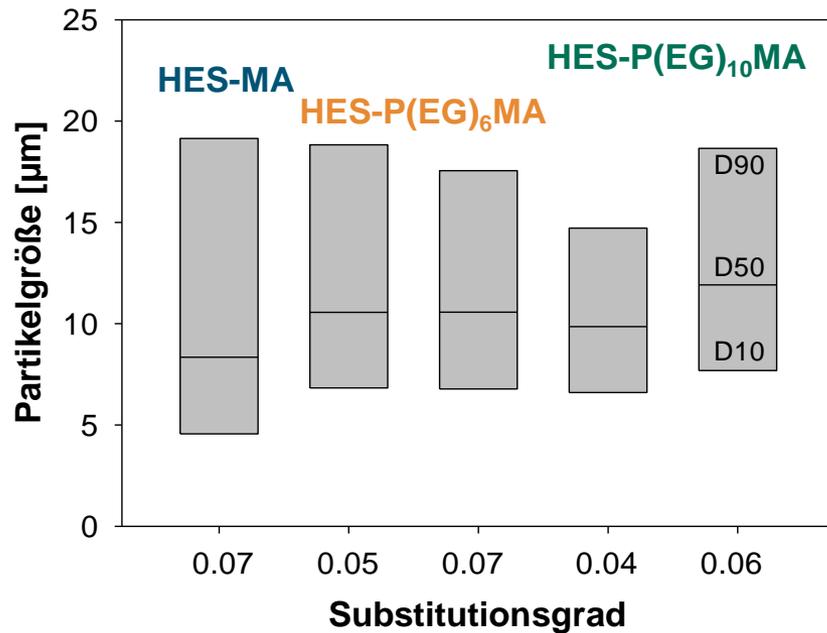
Photoinitiator: Irgacure® 2959

## Hydrogelmikropartikel



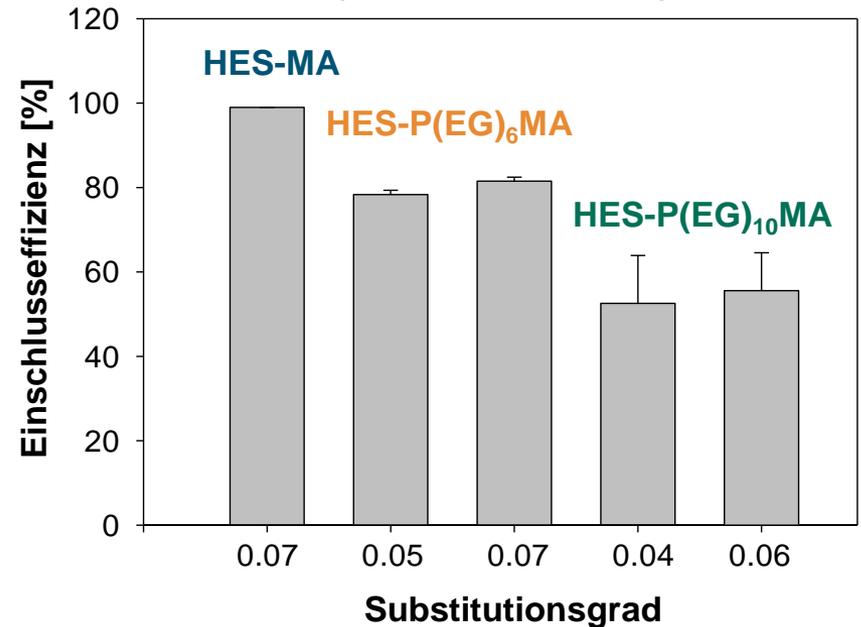
# Eigenschaften der Hydrogelmikropartikel

## Partikelgrößenverteilung



- ⇒ Enge Partikelgrößenverteilung
- ⇒ Geringer Einfluss des Substitutionsgrads

## Einschlusseffizienz (FITC-Dextran 70 kDa)

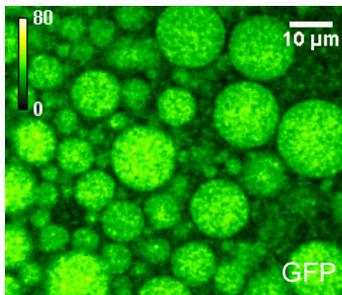
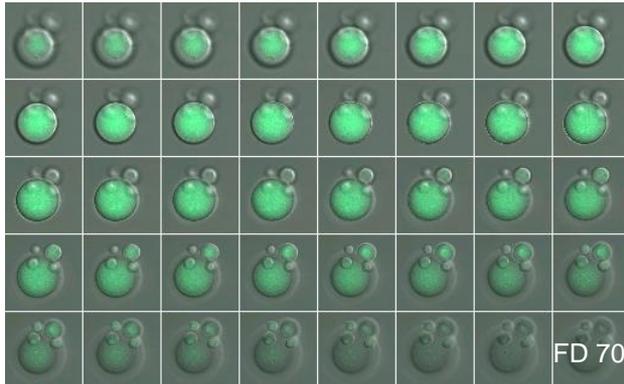


- ⇒ Einschlusseffizienz > 80 % mit HES-MA und HES-P(EG)<sub>6</sub>MA

⇒ HES-MA, HES-P(EG)<sub>6</sub>MA, (HES-P(EG)<sub>10</sub>MA)

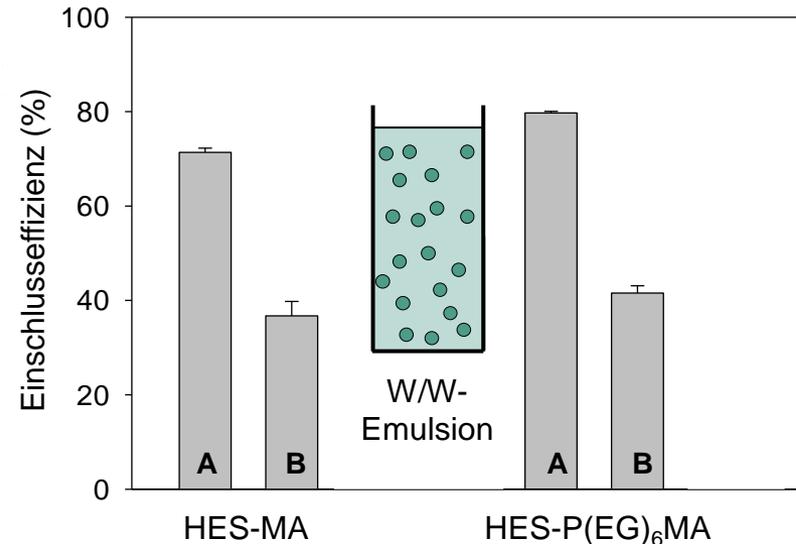
# Eigenschaften der Hydrogelmikropartikel

## Verteilung der Einschluss-Substanzen



⇒ Gleichmäßige Verteilung von FD70 und GFP in HES-P(EG)<sub>6</sub>MA-Mikropartikeln

## Einflüsse auf den Herstellungsprozess



A: PEG 12,000\_Hersteller A      MW 13,960 g/mol  
B: PEG 12,000\_Hersteller B      MW 11,830 g/mol

! Großer Einfluss des Molekulargewichts von PEG 12,000 auf den Herstellungsprozess

# Wichtige Fragen

Hydrogelstruktur



Verhalten der Einschluss-Substanzen

Hydrogelzylinder

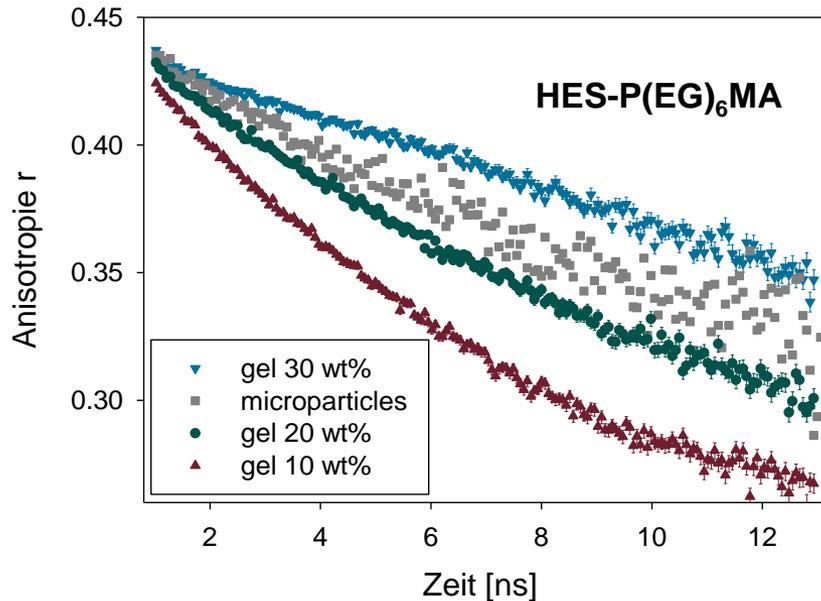


Hydrogel-Mikropartikel



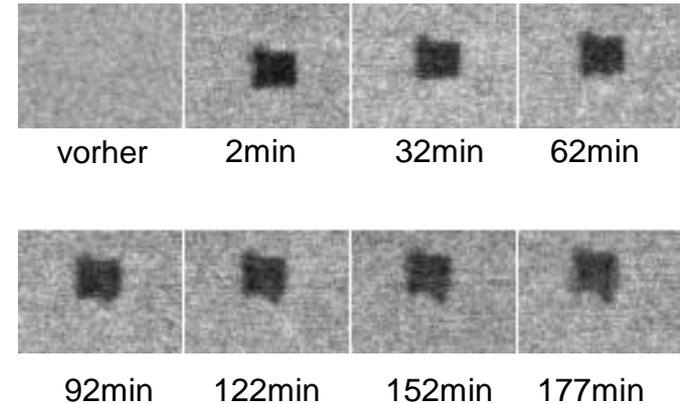
# Beweglichkeit des Proteins (mTagGFP)

## Fluoreszenzanisotropie



- ⇒ Freie Rotation des GFP
- ⇒ Beweglichkeit durch Viskosität verringert
- ⇒ Keine Bindung an die Polymermatrix
- ⇒ Mikropartikel ähnlich 20-30%ige Bulk-Systeme

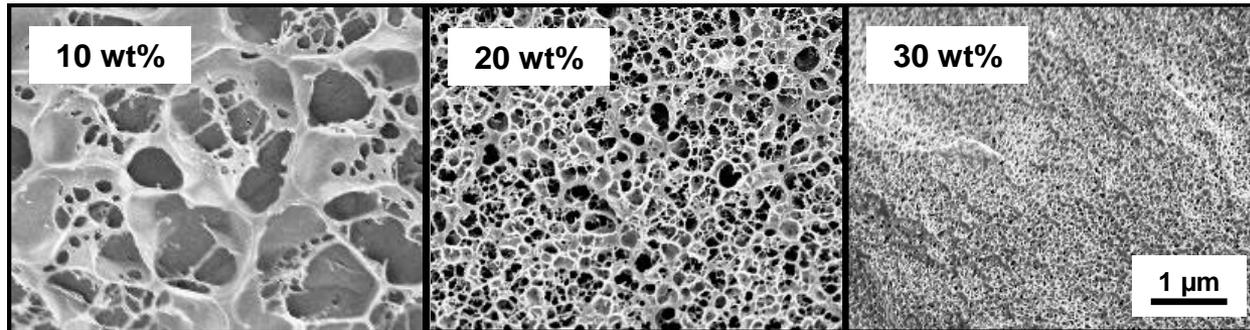
## FRAP



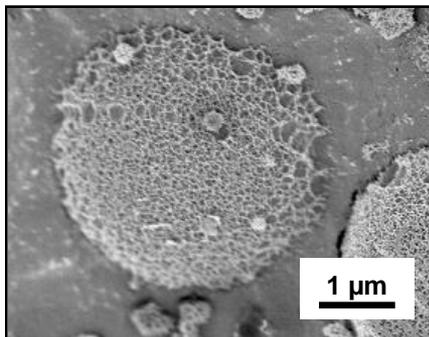
- ⇒ Translationale Diffusion stark behindert
- ⇒ Effektive Immobilisierung des eingeschlossenen GFP im Hydrogelnetzwerk

# Hydrogelstruktur (Cryo-REM)

## Hydrogelzylinder

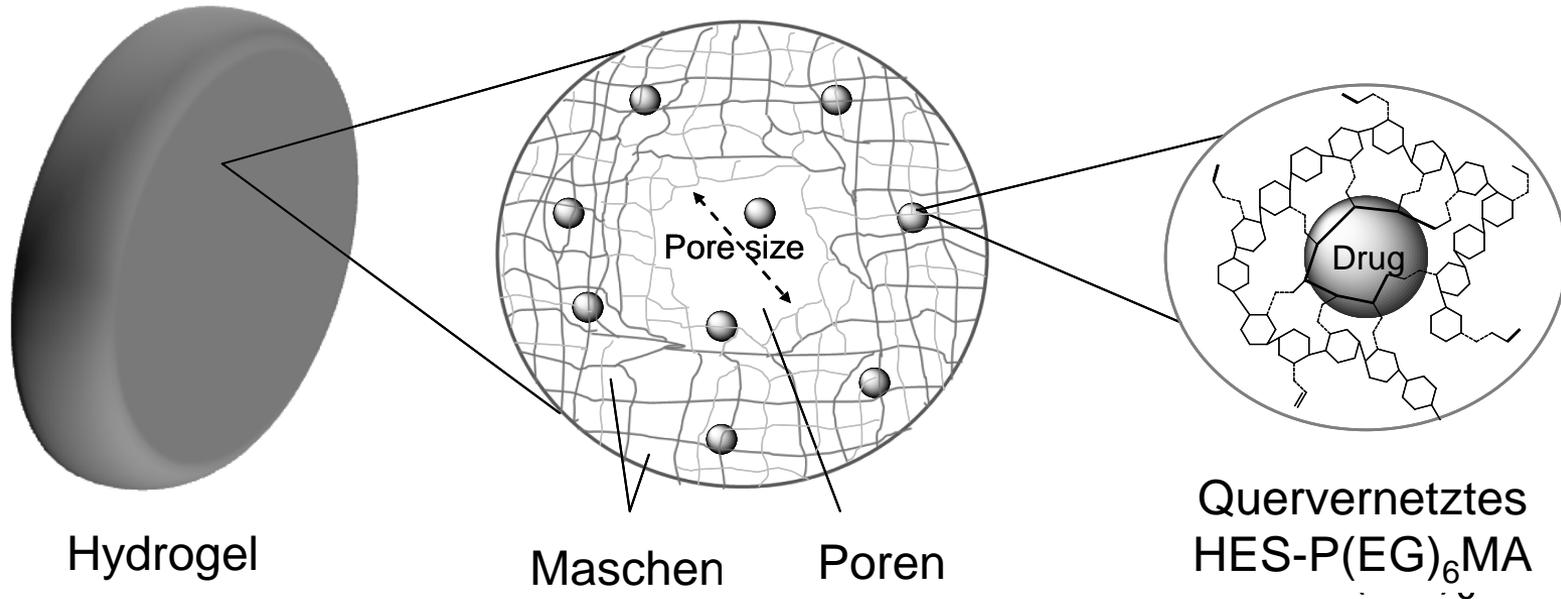


## Hydrogel-Mikropartikel



	Porengröße	Maschenweite
10 wt% Bulk	300 – 700 nm	1,9 nm
20 wt% Bulk	70 – 200 nm	0,59 nm
30 wt% Bulk	30 – 125 nm	0,53 nm
Mikropartikel	30 – 150 nm	

# Modell der Hydrogelstruktur



Hydrogel

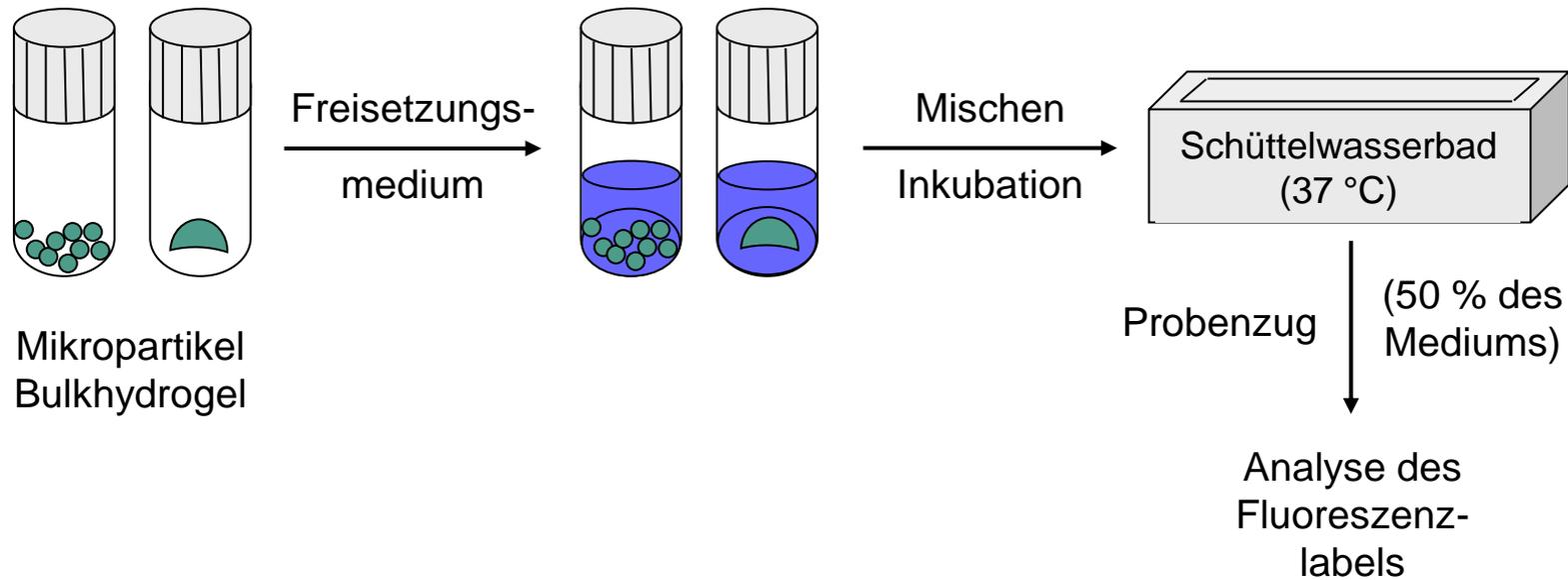
Maschen

Poren

Quervernetztes  
HES-P(EG)<sub>6</sub>MA

# Freisetzungsverhalten – *in vitro*

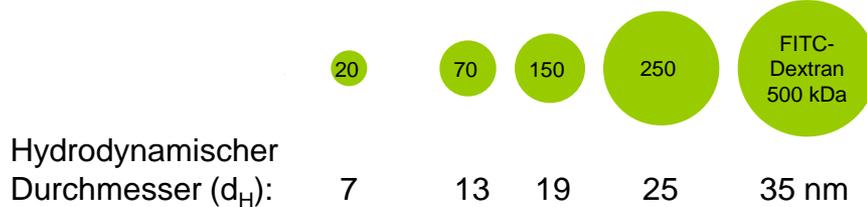
## Half-change-Methode



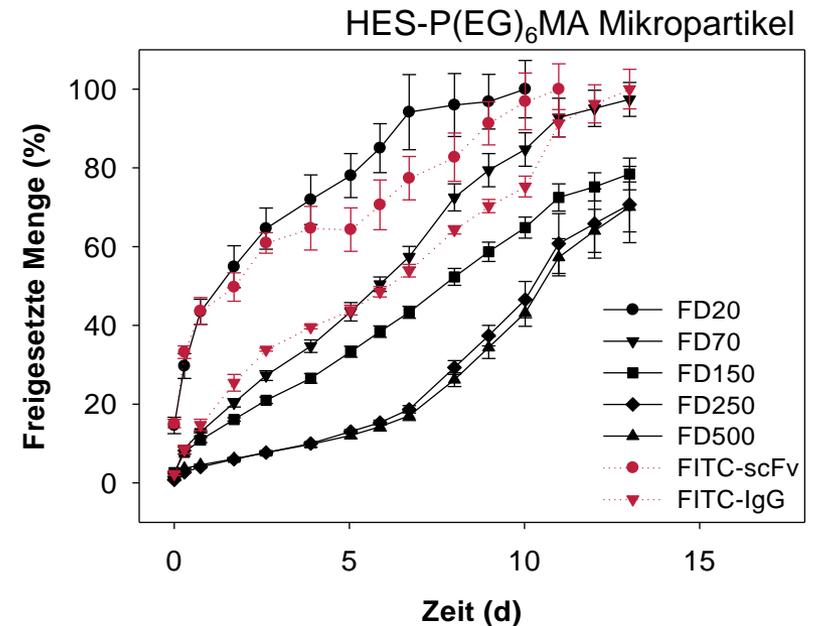
# Einfluss der Einschluss-Substanz auf die Freisetzung

## Freisetzung unterschiedlicher Einschluss-Substanzen

- Einschluss verschieden großer FITC-Dextrane (20, 70, 150, 250, 500 kDa)
- Freisetzung in humanem Serum

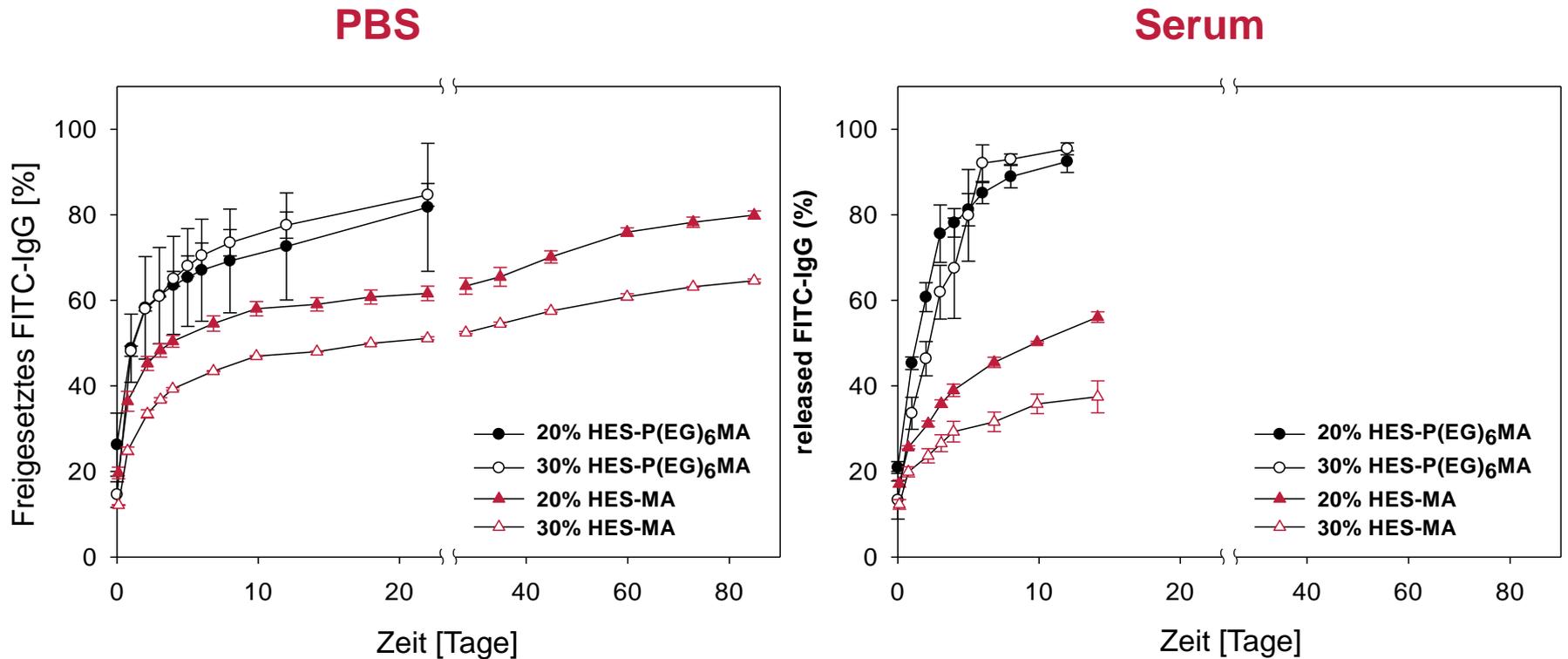


- Einschluss von FITC-IgG und FITC-scFv (HT186D11)



- ⇒ Freisetzungsprofil abhängig vom hydrodynamischen Durchmesser (d<sub>H</sub>) der Einschluss-Substanz
- ⇒ Ähnliche Freisetzungsprofile für Modellsubstanzen (FITC-Dextrane), FITC-IgG und FITC-scFv bei vergleichbarem hydrodynamischen Durchmesser (d<sub>H</sub>)

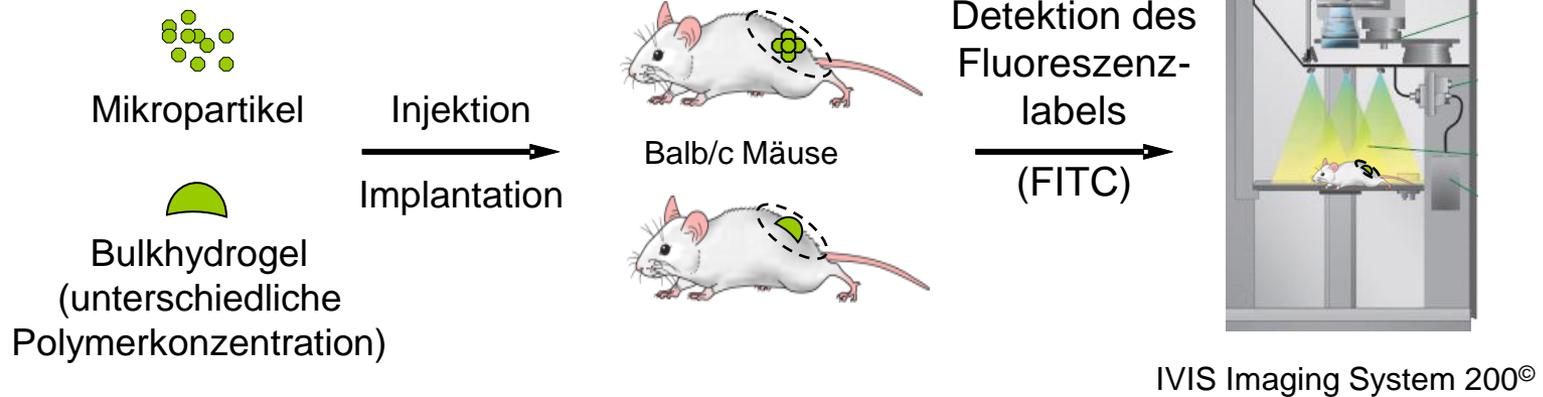
# Einfluss der Gelstruktur Freisetzung aus Hydrogel-Zylindern (FITC-IgG)



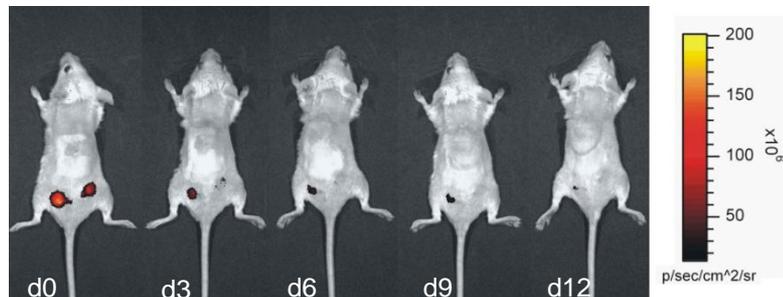
- ⇒ Freisetzung aus HES-P(EG)<sub>6</sub>MA- schneller als aus HES-MA-Hydrogelzylindern (Hydrolyse)
- ⇒ Höhere Polymerkonzentration verringert Freisetzungsgeschwindigkeit (HES-MA)
- ⇒ Wechsel des Freisetzungsmediums hat unterschiedliche Effekte auf die beiden Polymere

# Vergleichbarkeit zu *in vivo*-Bedingungen

## Hydrogelsysteme s.c. in Balb/c Mäusen



## *In vivo*-Imaging

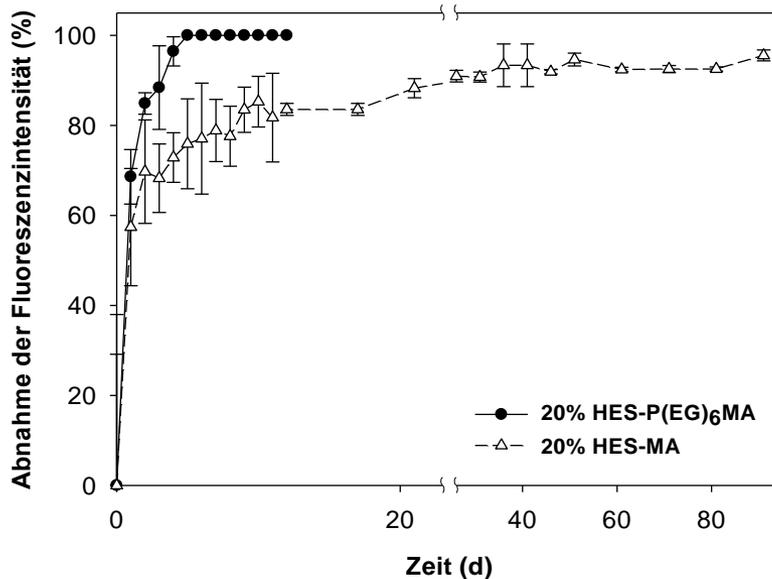


HES-P(EG)<sub>6</sub>MA Hydrogelzylinder (Maus 1: Tag 0 → Tag 12)  
links: 30 wt%, rechts: 20 wt%

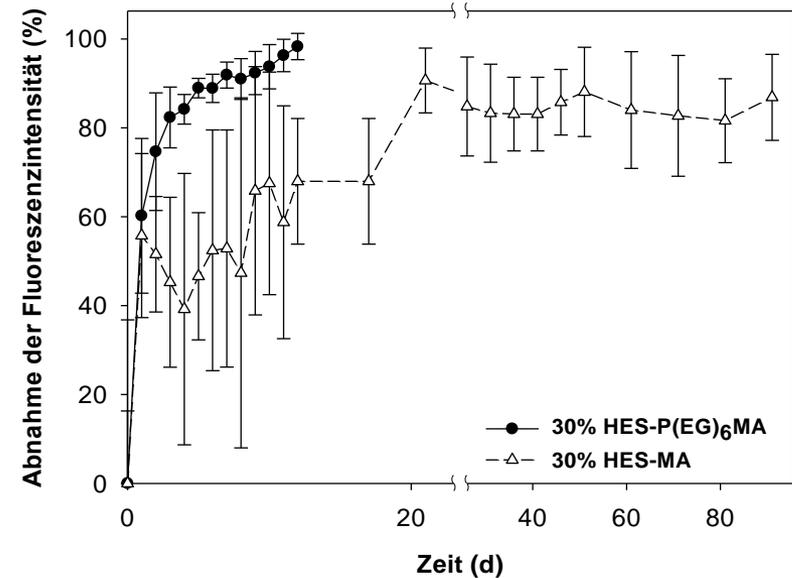
⇒ Auswertung der Abnahme an  
Fluoreszenzintensität

# In vivo-Freisetzung aus Hydrogelzylindern

## 20 % Polymer



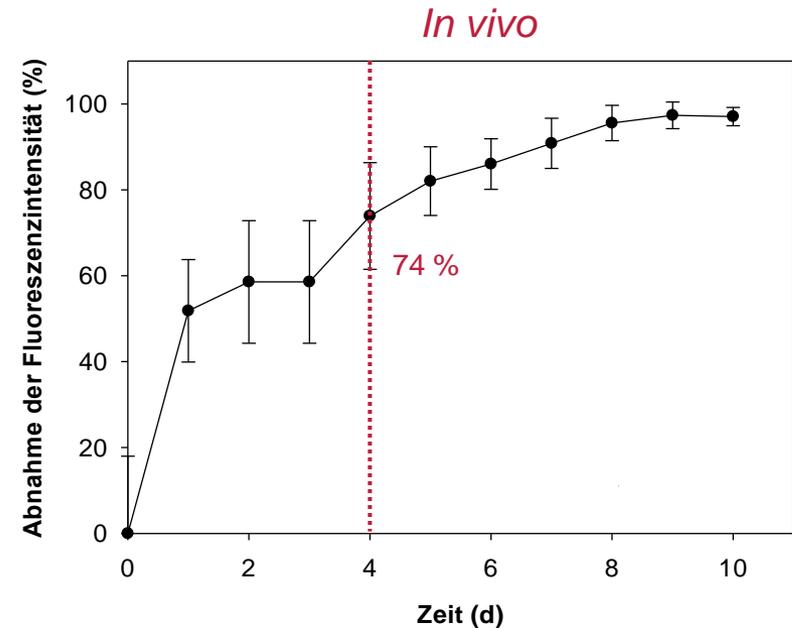
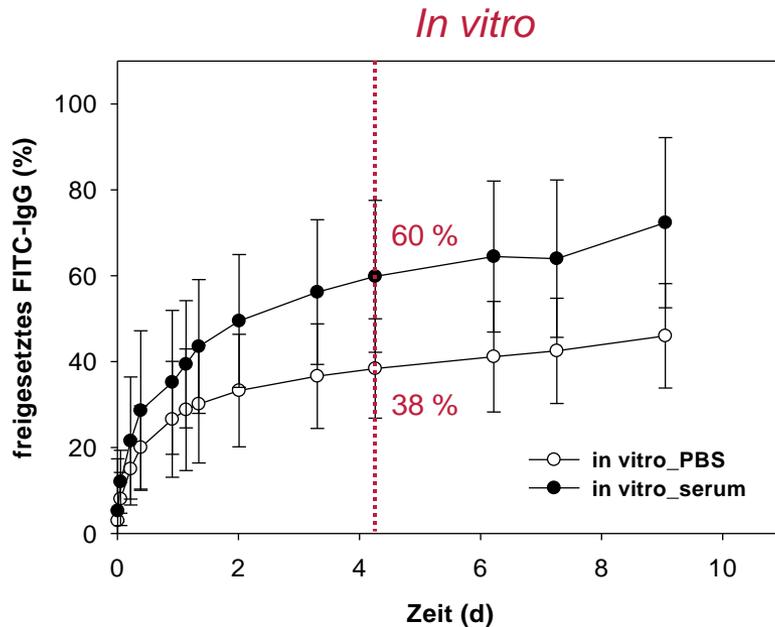
## 30 % Polymer



- ⇒ Freisetzung *in vivo* schneller als *in vitro*
- ⇒ Gute Vergleichbarkeit von *in vivo*- und *in vitro*-Daten hinsichtlich verschiedener Freisetzungssysteme (Reihung)
- ⇒ Freisetzung von FITC-IgG aus HES-MA Hydrogelzylindern-vielversprechender (langsamer) als aus HES-P(EG)<sub>6</sub>MA Hydrogelzylindern

# Freisetzung aus Mikropartikeln - *in vitro* vs. *in vivo*

## Freisetzung von FITC-IgG aus HES-P(EG)<sub>6</sub>MA Hydrogelmikropartikeln



- ⇒ Freisetzung *in vivo* schneller als *in vitro*
- ⇒ Abbau der HES-P(EG)<sub>6</sub>MA Mikropartikel *in vivo* bereits nach 10 Tagen
- ⇒ *In vitro*-Freisetzung in Serum besser vergleichbar mit *in vivo*-Verhältnissen

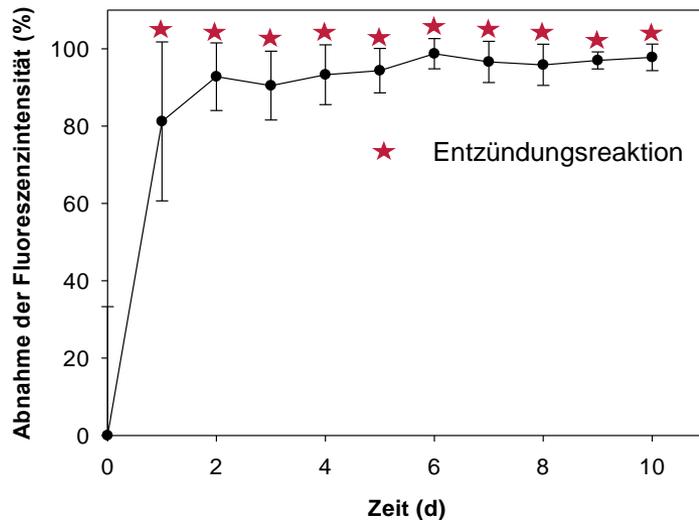
# Freisetzung aus Mikropartikeln - *in vitro* vs *in vivo*

## Freisetzung von FITC-IgG aus HES-MA-Hydrogelmikropartikeln

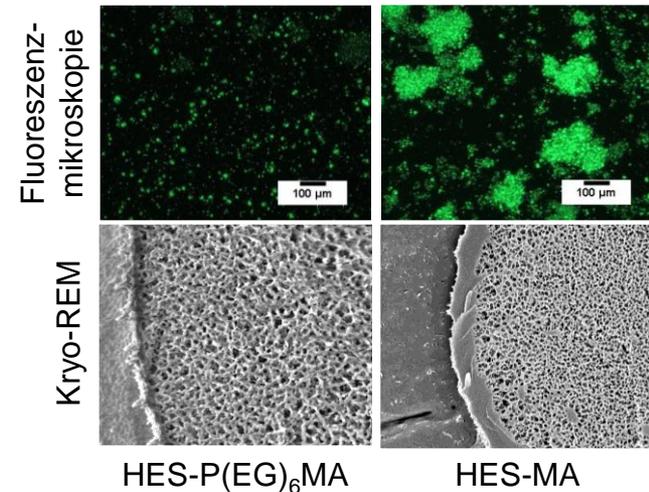
### *In vitro*

Freisetzung aus HES-MA- deutlich langsamer als aus HES-P(EG)<sub>6</sub>MA-Mikropartikeln

### *In vivo*



### Charakterisierung Mikropartikel



- ⇒ Entzündungsreaktion vermutlich ausgelöst durch Kapselhülle
- ⇒ Kapselbildung abhängig vom DS
- ⇒ Langzeit-Freisetzung aus HES-MA-Mikropartikel mit niedrigerem DS?

# Zusammenfassung

## Hydrogel-Freisetzungssysteme

- **Neue Polymere** ermöglichen Herstellung vielfältiger Freisetzungssysteme
- HES-MA und HES-P(EG)<sub>6</sub>MA zu **Mikropartikeln mit enger Partikelgrößenverteilung und hoher Einschlusseffizienz** für (Modell)Proteine zu verarbeiten
- **Struktur des PEG** hat großen Einfluss auf die Partikelbildung (Emulgierprozess)

## Hydrogelstruktur

- **Kombination verschiedener analytischer Verfahren** → Strukturverständnis
- Hydrogele aus **Poren und Maschen**
- **Netzwerkdichte** und **Größe der Einschluss-Substanz** → Einfluss auf Freisetzungsprofil
- Vergleichbares Freisetzungsverhalten von entsprechenden **Modell-Dextranen und -Antikörpern**

## Freisetzung

- **FreisetzungsmEDIUM** → großer Einfluss auf Freisetzungsprofil
- Freisetzung **in vivo schneller als in vitro**
- Beste **Korrelation** für HES-P(EG)<sub>6</sub>MA zwischen *in vitro*- (Serum) und *in vivo*-Freisetzung
- **Komplexe Einflüsse** auf das *in-vivo*-Verhalten → weitere Optimierung erforderlich  
→ *in-vivo*-Versuche unabdingbar

# Danke...

## ... allen beteiligten Kollegen!



## ... für die finanzielle Unterstützung!