

**Faculteit Farmaceutische, Biomedische
en Diergeneeskundige Wetenschappen**

Departement Farmaceutische Wetenschappen

**Biofarmaceutische analyse van
bioerodeerbare oculaire inserten opgeladen
met proteïnen**

Laboratorium voor Galenische en Industriële
Farmacie en Biofarmacie
Promotor: Dr. Apr. Filip Kiekens
Co-promotor: Prof. Dr. Wim Weyenberg
Begeleider: Apr. Arnout Everaert

Eindverhandeling ingediend
tot het behalen van het diploma van
Master in de Geneesmiddelenontwikkeling
door WOUTERS Yannick

Antwerpen 2014

**Faculteit Farmaceutische, Biomedische
en Diergeneeskundige Wetenschappen**

Departement Farmaceutische Wetenschappen

**Biofarmaceutische analyse van
bioerodeerbare oculaire inserten opgeladen
met proteïnen**

Laboratorium voor Galenische en Industriële
Farmacie en Biofarmacie
Promotor: Dr. Apr. Filip Kiekens
Co-promotor: Prof. Dr. Wim Weyenberg
Begeleider: Apr. Arnout Everaert

Eindverhandeling ingediend
tot het behalen van het diploma van
Master in de Geneesmiddelenontwikkeling
door WOUTERS Yannick

Antwerpen 2014

AUTEURSRECHT

De auteur en de promotor(en) geven de toelating deze eindverhandeling voor consultatie beschikbaar te stellen en delen ervan te kopiëren voor persoonlijk gebruik. Elk ander gebruik valt onder de beperkingen van het auteursrecht, in het bijzonder met betrekking tot de verplichting uitdrukkelijk de bron te vermelden bij het aanhalen van de resultaten uit deze eindverhandeling.

WOORD VOORAF

Het laatste jaar farmaceutische wetenschappen zit erop, een periode die ik niet snel zal vergeten. Het was een intensief, maar vooral bijzonder leerrijk jaar. Het gevoel om af te studeren met het apothekersdiploma geeft toch een zekere trots en voldoening.

Niets gaat zonder slag of stoot en uit elk probleem dat wordt overwonnen, kunnen nieuwe lessen worden getrokken. Een uitspraak die zeker toepasbaar is op onderzoek en het daarom allemaal zo boeiend maakt. Ik kijk hier dan ook tevreden op terug.

Graag wil ik mijn dank uiten voor mijn begeleider Arnout Everaert zonder wie dit allemaal niet mogelijk was geweest. De lange dagen die op het labo werden gespendeerd moesten nooit alleen worden doorgebracht. Tot op het einde heeft hij me steeds bijgestaan met zijn creativiteit en enthousiasme. Hij maakte de dagen vrolijker en werd naar het einde toe dan ook steeds meer een goede vriend dan een begeleider.

Graag wil ik nog Dr. Apr. Filip Kiekens bedanken voor het aanreiken van dit onderwerp en Kris Hermans voor haar input. Als laatste wil ik mijn vriendin Inge bedanken om me gedurende de hele rit te steunen. Zij was de drijfkracht achter mijn doorzettingsvermogen.

INHOUDSOPGAVE

1. INLEIDING	1
1.1. ANATOMIE VAN HET OOG.....	1
1.1.1. Cornea	2
1.1.2. Conjunctiva.....	3
1.1.3. Traanfilm	3
1.2. BIOFARMACEUTISCHE ASPECTEN	6
1.2.1. Precorneale factoren.....	6
1.2.2. Corneale factoren.....	6
1.3. PROTEÏNEN VOOR OCULAIR GEBRUIK	7
1.3.1. Opbouw en structuur	8
1.3.2. Stabiliteit van proteïnen in waterig milieu.....	10
1.4. TOPICALE FORMULATIES VOOR OCULAIR GEBRUIK	13
1.4.1. Optimalisatie van oculaire artsenvormen.....	14
1.5. OCULAIRE INSERTEN	15
1.5.1. Samenstelling van oculaire inserten	15
1.5.2. Voor- en nadelen.....	16
2. DOELSTELLINGEN	17
3. MATERIALEN EN METHODEN.....	18
3.1. MATERIALEN	18
3.1.1. Chemicaliën	18
3.1.2. Natriumfluoresceïne	18
3.1.3. Lysozyme	19
3.1.4. Albumine	19
3.1.5. Glycerol	20
3.1.6. Hydroxypropyl methylcellulose.....	20
3.2. METHODEN	22
3.2.1. Bereidingsproces van oculaire inserten	22
3.2.1.1. Probleemstelling klassieke bereidingsmethode	22
3.2.1.2. Algemeen principe nieuwe bereidingsmethode.....	22
3.2.1.3. Initieel ontwikkelde bereidingsmethode	22
3.2.1.4. Optimalisatie initiële bereidingsmethode.....	23
3.2.1.5. Praktische uitvoering.....	24
3.2.2. Reologische karakterisering	26
3.2.3. Kalibratiemodel voor de gehaltebepaling.....	27

3.2.3.1. IJklijn natriumfluoresceïne	27
3.2.3.2. IJklijn lysozyme	28
3.2.3.3. IJklijn albumine.....	29
3.2.4. Opstellen <i>Design of Experiments</i>	30
3.2.5. <i>In vitro</i> afgifte uit de inserten	31
4. RESULTATEN EN BESPREKING	33
4.1. DATA ANALYSE: <i>IN VITRO</i> AFGIFTE	33
4.1.1. Cumulatieve vrijgave van natriumfluoresceïne	33
4.1.2. Cumulatieve vrijgave van lysozyme	34
4.1.3. Cumulatieve afgifte van albumine	35
4.1.3.1. Optimalisatie van de cumulatieve vrijgave van albumine	36
4.1.4. Samenvatting van de resultaten	39
4.2. VRIJGAVEKINETIEK	41
4.2.1. Vrijgavekinetiek van natriumfluoresceïne	42
4.2.2. Vrijgavekinetiek van lysozyme	42
5. BESLUIT.....	43
6. TOEKOMSTPERSPECTIEVEN	44
7. BIJLAGEN	45
8. REFERENTIES	50

LIJST MET GEBRUIKTE AFKORTINGEN

AMD	<i>Age-related macula degeneration</i> Leeftijdsgerelateerde maculadegeneratie
HPMC	Hydroxypropyl methylcellulose
NaEDTA	Natrium ethyleendiamine tetra-azijnzuur
NAG	N-acetyl glucosamine
NAM	N-acetyl muraminezuur
NOAEL	<i>No observed adverse effect level</i>
PBS	<i>Phosphate buffer saline</i> Fosfaatgebufferde zoutoplossing
Ph. Eur.	Europese farmacopee
PVC	Polyvinylchloride
p-waarde	Waarschijnlijkheidswaarde
R	Correlatiecoëfficiënt
T _m	<i>Thermal gelation temperature</i>
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i> Vasculaire endotheliale groeifactor

ABSTRACT

Most ocular diseases are treated with conventional formulations such as eye drops or ointments. Despite their excellent acceptance by patients, they achieve low ocular availability leading to high instillation frequency and systemic absorption. Less than 5% of the drug applied on the ocular surface penetrates the cornea and reaches the intra-ocular tissue.

Novel drug delivery systems have tried to overcome these problems by prolonging the residence time on the ocular surface. Formulations resulted in only minor improvements and did not decrease the frequency of instillation required. New ocular drug formulations are nowadays based on ocular inserts to give an extended drug release profile. They are generally applied in the conjunctival sac. This research describes the development and evaluation of a new method for the production of such inserts. The inserts are loaded with thermolabile drugs such as proteins, hence will need a different production process than common methods. The new production process allows the drugs to be formulated without high thermal conditions or shearing needed, which could lead to disruption of the proteins. The ocular inserts comprise 25% (w/w) hydroxypropyl methylcellulose as a viscosity enhancer, 1% (w/w) glycerol as a plasticizer, 3% (w/w) of an active substance and water as a solvent. The preparation started by the production of an hydroxypropyl methylcellulose hydrogel with a percentage of 20% (w/w). Subsequently, the polymer solution was dehydrated up to a concentration of hydroxypropyl methylcellulose varying from 50% to 75% (w/w). A solution containing the drug was loaded onto this dehydrated polymer, allowing diffusion of the drug into the matrix.

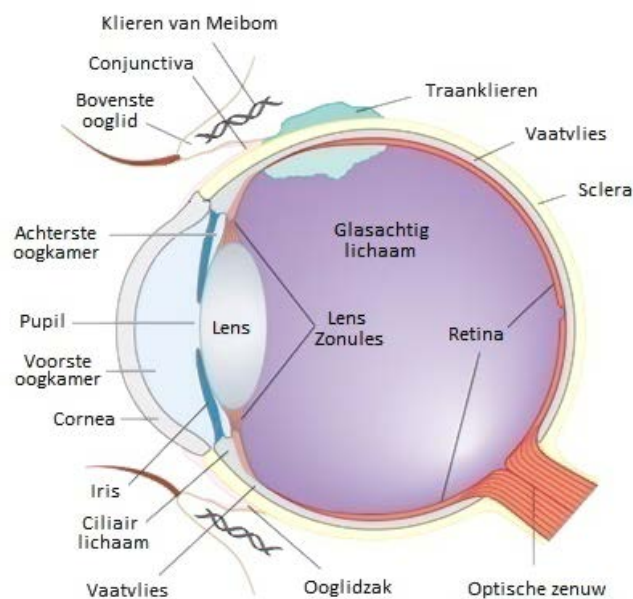
The *in vitro* release profiles of different formulations loaded with molecules with three different molecular weights, sodium fluorescein, lysozyme and albumin, were compared and evaluated, trying to find the optimal formulation process. Controlled release profiles were achieved for sodium fluorescein and lysozyme. A decrease in drug release was shown for albumin.

1. INLEIDING

Voor de behandeling van oculaire aandoeningen worden vaak klassieke oculaire preparaten zoals oogdruppels en -suspensies gebruikt. Ze worden algemeen goed verdragen door de patiënt, maar hebben een lage oculaire beschikbaarheid (1-5%). Anatomische barrières en de verdedigingsmechanismen van het oog beperken hun absorptie.^{1,2,3}

1.1. ANATOMIE VAN HET OOG

Het oog is een complex orgaan dat gelegen is in de oogkas en wordt ondersteund door een aantal structuren zoals de oogleden, het traanapparaat en de spieren. De lens verdeelt het oog in twee grote segmenten: het voorste segment tussen cornea en lens, en het achterste segment achter de lens. Het voorste segment omvat de voorste en de achterste oogkamer, de cornea, de iris, de pupil, het ciliair lichaam en het kamervocht. Het achterste segment bestaat uit de lens, de sclera, het vaatvlies, het glasachtig lichaam, de retina en de optische zenuw.⁴ Een schematisch overzicht van de opbouw van het oog wordt weergegeven in Figuur 1.1.



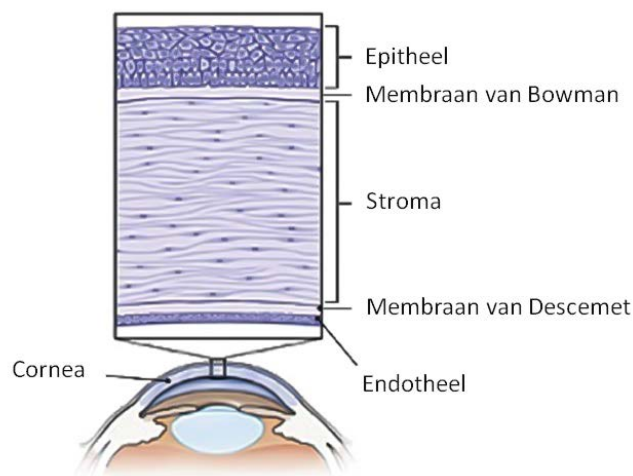
Figuur 1.1: Opbouw van het oog. Naar: Neal P.B., Ellen B. C., James L.S.. The Eye: Allergic and immunologic disease of the eye. 618-637

De meeste farmaca worden topicaal aangebracht op het oog en worden corneaal of niet-corneaal geabsorbeerd.⁵ Wegens de structuur van de cornea, het knippen van de oogleden,

de tranenvloed en de drainage via traanpunten van het oog, bedraagt de oculaire beschikbaarheid van klassieke oogpreparaten slechts 1 à 5%.^{1,2,3}

1.1.1. Cornea

De cornea is een niet-gevasculariseerd transparant weefsel dat wordt voorzien van voedingsstoffen door de omliggende weefsels, de traanvloeistof en het kamervocht. Het wordt onderverdeeld in drie lagen: het epitheel, het stroma en het endotheel. De opbouw wordt weergegeven in Figuur 1.2.



Figuur 1.2: Opbouw van de cornea. Naar: Wilson S., Last A. Management of corneal abrasions, American Family Physician [internet] [geraadpleegd op 17 mei 2014]; 70(1):123-128. Beschikbaar op:<http://www.aafp.org/afp/2004/0701/p123.html>

Het epitheel bestaat uit vier tot zes cellagen die samen voor 10% bijdragen aan de dikte van de cornea. Door zijn hydrofoob karakter is het corneaal epitheel voor 90% verantwoordelijk voor de penetratieweerstand die wordt geboden aan de passieve opname van hydrofiele farmaca en voor minder dan 10% aan de passieve diffusie van lipofiele farmaca.

De buitenste laag van de epitheelcellen zijn onderling verbonden via *tight junctions* en hinderen paracellulair transport. De epitheelcellen vertonen microvilli en zijn bedekt met een glycocalix. Deze structuren dragen bij tot de stabilisatie van de traanfilm aan het oogoppervlak.^{4,6,7}

De substantia propria of het stroma bestaat uit een extracellulaire matrix, opgebouwd uit lamellaire lagen collageenvezels en overspant ongeveer 90% van de dikte van de cornea. De lamellaire lagen collageenvezels bevatten een grote hoeveelheid water (~70% (V/V) van het stroma) water. In tegenstelling tot het lipofiele epitheel, vormt de hydrofiele substantia propria voornamelijk een barrière voor lipofiele farmaca.^{4,7}

De laatste laag van de cornea bestaat uit het endotheel, dewelke één cellaag dik is. De cellen zijn hier van elkaar gescheiden door *gap junctions* die een gemakkelijke passieve diffusie van farmaca toelaten.^{4,6}

De cornea bevat de hoogste densiteit aan gevoelszenuwen in het menselijk lichaam. Geprikkeld door externe stimuli veroorzaken ze een tranenvloed en een stijging van de knipperfrequentie.⁷

1.1.2. Conjunctiva

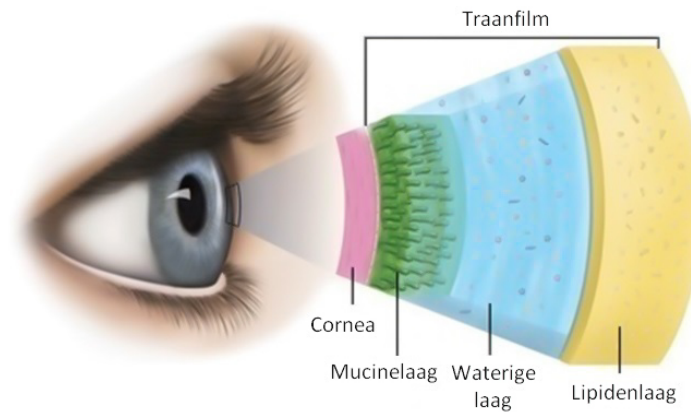
De conjunctiva is een transparante bindweefsellaag die de binnenzijde van de oogleden en het gehele oppervlak van het oog bedekt, met uitzondering van de cornea. Het bindvlies vormt ter hoogte van de oogleden de ooglidzak of *fornix*. De conjunctiva wordt onderverdeeld in het epitheel en de substantia propria.⁸

De epitheelcellen van het conjunctivale epitheel zijn onderling verbonden via *tight junctions*. Ze verschillen van de *tight junctions* van het corneale epitheel in de permeabiliteit voor farmaca. Hydrofiele farmaca zoals bijvoorbeeld mannitol en inuline ondervinden weinig penetratieweerstand. Passieve diffusie van grote moleculen (tot 20 000 Da) is mogelijk. Een groot deel van een geïnstilleerd geneesmiddel zal via de conjunctiva worden geabsorbeerd waardoor minder activum beschikbaar is om doorheen de cornea te diffunderen. Naast epitheelcellen bevinden zich in het conjunctivale epitheel slijmbekercellen die hydrofiele mucines produceren.^{1,4,6,8}

De substantia propria van de conjunctiva is een bindweefsellaag die sterk gevasculariseerd is en lymfevaten bevat. De lymfevaten helpen bij de mobilisatie van immunocompetente cellen en antimicrobiële agentia om het oog te beschermen tegen infecties. Systemische nevenwerkingen kunnen optreden als gevolg van de absorptie van farmaca via capillairen. Ter bescherming van stofdeeltjes en vreemde lichamen komen in het bindvlies ook gevoelszenuwen voor die snel reageren op uitwendige stimuli.^{1,4,6,8}

1.1.3. Traanfilm

De traanfilm is een waterige laag die cornea en conjunctiva bedekt. Ze heeft als functies het vochtig houden en beschermen van de onderliggende structuren, het aanbrengen van voedingsstoffen, en het verbeteren van de optische eigenschappen van het corneale epitheel. De traanfilm bestaat uit drie lagen zoals weergegeven in Figuur 1.3: de buitenste lipidenlaag, de middelste waterige laag en de binnenste mucinelaag.



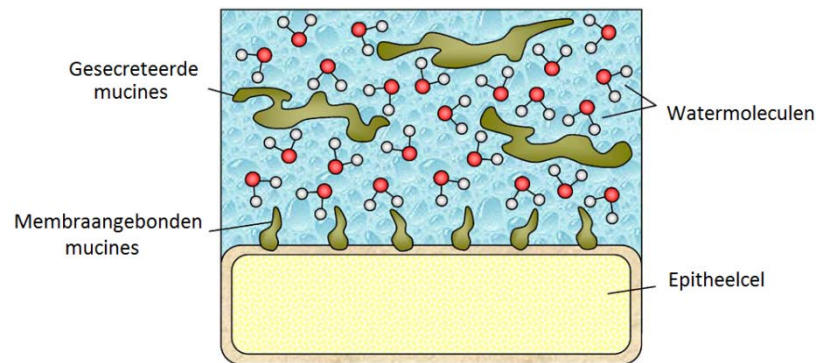
Figuur 1.3: Opbouw van de traanfilm. Naar: ©2014 Allergan, Inc. My Dry Eyes [Internet]. What is a healthy tear film? [Geraadpleegd op 03 mei 2014] Beschikbaar op http://www.mydryeyes.com/What_Is_A_Healthy_Tear_Film

De lipidenlaag is ongeveer 0,1 μm dik en wordt voornamelijk geproduceerd door de klieren van Meibom. Ze secreteren een groot aantal niet-polaire lipiden waaronder neutrale oliën, sterolesters en wassen, alsook polaire fosfolipiden.

De niet-polaire lipiden vormen de grootste fractie van de lipidenlaag en staan in contact met de lucht. De polaire fosfolipiden oriënteren zich met de hydrofiele zijde naar de waterige middelste laag. De lipidenlaag verhindert de evaporatie van water uit de middelste laag om het oogoppervlak vochtig te houden. De verhouding van de verschillende lipiden is belangrijk. Een wijziging van deze samenstelling geeft aanleiding tot droge ogen.^{1,4,9,10}

De middelste waterige laag van de traanfilm heeft een dikte van ongeveer 8 μm en wordt geproduceerd door de traanklieren. Ze bestaat voornamelijk uit water, elektrolyten en proteïnen, maar bevat ook groeifactoren, immunoglobulines, vitaminen, cytokines, antimicrobiële agentia en hormonen. De osmotische druk van de traanfilm in gezonde ogen bedraagt 311-350 mOsm/kg en is afhankelijk van de concentratie aan ionen (Na^+ , K^+ , Cl^- , HCO_3^- , ...) en proteïnen. Een hogere osmolaliteit van de traanfilm beschadigt het oog zowel direct, als indirect door het opwekken van een inflammatoire respons. De pH wordt binnen de grenzen van 6,5-7,5 gehouden doordat sommige elektrolyten (b.v. HCO_3^-)^{11,12} en proteïnen (b.v. lysozyme)¹¹ bufferende eigenschappen bezitten. Meer dan 60 verschillende proteïnen waaronder albumine, immunoglobulines, *plasminogen activator factor*, prostaglandines, proteasen en antimicrobiële peptiden, werden geïdentificeerd in de traanfilm. De belangrijkste proteïnen aanwezig in de waterige laag bij geopende ogen zijn lactoferrin en lysozyme. Ze worden gesecreteerd door de traanklieren en vertonen antibacteriële eigenschappen.^{1,4,9}

De binnenste laag van de traanfilm is de mucinelaag. De componenten worden geproduceerd door de slijmbekercellen van de conjunctiva en de epitheelcellen van de cornea en conjunctiva. Ze is ongeveer 0,8 μm dik en stabiliseert de traanfilm op het oog. De mucines aanwezig in deze laag zijn glycoproteïnen die voor 50-80% geglycosyleerd zijn. Een onderscheid wordt gemaakt tussen enerzijds de gesecreteerde mucines, en anderzijds de membraangebonden mucines zoals weergegeven in Figuur 1.4.^{1,4,9}



Figuur 1.4: Opbouw van de mucinelaag. Naar: Johnson M.E., Murphy P.J. Changes in the tear film and ocular surface from dry eye syndrome. Progress in Retinal and Eye Research 2004; 23(4):449-474

De membraangebonden mucines met een laag moleculair gewicht, gesecreteerd door de epitheelcellen, hebben een hydrofoob domein dat is verankerd in het membraan van de epitheellaag, en een hydrofiel domein dat zich in het extracellulaire milieu bevindt. Ze vormen de negatief geladen glycocalix en beschermen het oog tegen infecties.

De mucines met een hoog moleculair gewicht, gesecreteerd door de slijmbekercellen dragen bij aan de reologische eigenschappen van de traanfilm. De gesecreteerde mucines helpen bij het verwijderen van celdebris, pathogenen en lichaamsvreemde stoffen. Zowel apolaire, als licht polaire stoffen binden aan de gehydrateerde moleculen en kunnen worden verwijderd bij elke knipperbeweging.⁹

De onderste ooglidzak bevat in normale omstandigheden 7-10 μl traanvocht. Het oogoppervlak heeft een temperatuur tussen de 32-35 $^{\circ}\text{C}$ ¹³ waardoor de traanvloeistof continu verdampt. De basale traansecretie bedraagt ongeveer 1 $\mu\text{l}/\text{min}$, zodat een goede hydratatie van het oog behouden wordt. Tijdens de knipperbeweging wordt de vloeistof gedraineerd via de traanpunten in de oogleden en verder afgevoerd naar de traankanalen om vervolgens via de traanbuis tot in de neusholte terecht te komen. Door de sterke vascularisatie van de neusholte is systemische absorptie van farmaca mogelijk met toxische nevenwerkingen als gevolg.^{4,14}

1.2. BIOFARMACEUTISCHE ASPECTEN

Het oog heeft verschillende verdedigingsmechanismen om zich te beschermen tegen infecties en lichaamsvreemde stoffen. Deze verdedigingsmechanismen verhinderen echter ook de opname van topicaal toegediende farmaca. Er worden drie groepen van factoren onderscheiden die een effect hebben op de opname: de precorneale, de corneale, en postcorneale factoren.⁴ Deze laatste groep omvat voornamelijk de enzymatische metabolisatie van het farmacon in de weefsels, maar zal hier niet verder besproken worden.

1.2.1. Precorneale factoren

Een eerste factor die de absorptie van farmaca negatief beïnvloedt is de drainage van de geïnstilleerde oogpreparaten zoals oogdruppels. De onderste ooglidzak kan maximaal 20-30 µl vloeistof bevatten wanneer niet wordt geknipperd, normaliter is de hoeveelheid beperkt tot 7-10 µl. Bij de instillatie van een oogdruppel wordt deze drempel al snel overschreden aangezien het volume varieert van 20-50 µl. Een deel van de overtollige hoeveelheid vloeistof zal snel worden gedraineerd via de traanpunten van het oog, terwijl een ander deel over de wangen zal vloeien. De resterende hoeveelheid zal zich over het oogoppervlak verspreiden en de concentratie van het farmacon zal worden verdund door de aanwezige traanfilm. Indien het toegediende farmacon bovendien irriterend werkt op het oog, zullen de gevoelszenuwuiteinden van de cornea en de conjunctiva gestimuleerd worden. Er ontstaat een tranenvloed om de irriterende stof snel te elimineren. Hiernaast zal ook de knipperreflex helpen de irritantia te verwijderen.^{4,10}

De traanfilm bevat een grote diversiteit aan proteïnen. Deze proteïnen kunnen binden aan de toegediende farmaca en zo de vrije resorbeerbare fractie verminderen. Bij bepaalde oculaire aandoeningen, zoals een herpes simplex infectie of allergische conjunctivitis, kan deze afname in beschikbaarheid belangrijk worden.⁴

1.2.2. Corneale factoren

De corneale permeabiliteit wordt sterk gereguleerd door de drie lagen waaruit ze is opgebouwd: het epitheel, het stroma en het endotheel. Het epitheel is de snelheidsbepalende stap voor de penetratie via passieve diffusie van geïoniseerde en hydrofiele farmaca, terwijl het hydrofiele stroma voornamelijk een barrière vormt voor de diffusie van lipofiele farmaca doorheen de cornea. Het endotheel draagt slechts weinig bij aan de beperkte permeabiliteit van de cornea.^{4,6}

Lokaal toegediende farmaca zullen voornamelijk via paracellulair of transcellulair transport permeëren doorheen de cornea. Lipofiele farmaca zullen de transcellulaire route doorheen

de epitheelcellen verkiezen, terwijl de hydrofiele moleculen via de paracellulaire route tussen de cellen zullen diffunderen. Deze laatste manier wordt sterk belemmerd door de aanwezigheid van de *tight junctions*. De penetratie kan hier worden verhoogd door het toedienen van chelatoren zoals NaEDTA die het aanwezige calcium zullen complexeren. *Tight junctions* zijn opgebouwd uit de transmembranaire proteïnen occludine en claudine die met elkaar interageren. Ze worden gesynthetiseerd door twee naburige cellen en voor de vorming van dit hechte complex is calcium vereist.^{4,15}

Oppervlakte actieve stoffen zoals benzalkoniumchloride en kationogene surfactantia verhogen de transcellulaire absorptie wegens interactie ter hoogte van de celmembraan.^{4,16}

Voor sommige moleculen bestaat er ook nog een *carrier* gemedieerd transport. Kationogene farmaca kunnen twee tot drie maal beter doorheen de cornea penetreren dan anionogene moleculen. Een Na^+ - K^+ -ATPase gedreven transporter, die selectief is voor positief geladen moleculen, zou hier verantwoordelijk voor zijn. Ook bestaat er een transportmechanisme voor de absorptie van aminozuren over het corneale epitheel. Het mechanisme beperkt zich tot di- of tripeptides. Endocytose zou een laatste mogelijkheid zijn voor de penetratie van farmaca doorheen de eerste epitheelagen van de cornea.^{17,18,19}

Samengevat is de penetratie doorheen de cornea afhankelijk van enerzijds de hydrofobiciteit van de moleculen, de lading, en het moleculair gewicht, en anderzijds van de structuur van de *tight junctions* en de lipofiele epitheelcellen.

1.3. PROTEÏNEN VOOR OCULAIR GEBRUIK

De laatste jaren werd al heel wat onderzoek verricht naar het therapeutisch gebruik van proteïnen voor de behandeling van oculaire aandoeningen. De meeste eiwitten vinden hun toepassing als intravitreale injecties zoals ocriplasmine of aflibercept, terwijl andere topicaal worden aangewend zoals vancomycine en ciclosporine.^{20,21,22} In Tabel 1.1 wordt een overzicht gegeven van enkele proteïnen voor oculair gebruik.

De *anti-vascular endothelial growth factor* (anti-VEGF) eiwitten zijn een nieuwe groep van recombinante monoklonale antilichamen die veel gebruikt worden bij de neovasculaire variant van leeftijdsgerelateerde maculadegeneratie (AMD). Ze zijn effectief in het bekomen van regressie, maar moeten onder de vorm van maandelijkse intravitreale injecties worden toegediend. De kostprijs van een eenmalige toediening van ranibizumab (Lucentis[®]) bedraagt 970 EUR per flacon. Nevenwerkingen ten gevolge van de intravitreale toediening zijn o.a. endoftalmitis, intraoculaire ontsteking, retinale loslating, retinale scheur en iatrogene traumatische cataract.^{23,24}

Tabel 1.1: Schematisch overzicht van proteïnen voor oculair gebruik met VEGF: *vascular endothelial growth factor* en AMD: *age related macula degeneration*.

Farmacon	Klasse	Toediening	Indicatie
Ocriplasmine	Plasmine analoog	Intravitreaal	Glasvochtloslating
Aflibercept	VEGF inhibitor	Intravitreaal	AMD
Vancomycine	Antibioticum	Topicaal/ Intravitreaal	Bacteriële keratitis/ Endoftalmitis
Ciclosporine	Immunosuppressivum	Topicaal	Droge ogen
Bevacizumab	Anti-VEGF	Intravitreaal	AMD (<i>off-label</i>)
Ranibizumab	Anti-VEGF	Intravitreaal	AMD
Pegaptanib	Anti-VEGF	Intravitreaal	AMD

De formulatie van een topicaal preparaat van een anti-VEGF eiwit met verlengde afgifte zou het comfort van de patiënt ten goede komen en de nevenwerkingen als gevolg van de heelkundige ingreep vermijden. De topicale toediening van deze proteïnen zou bovendien bruikbaar zijn bij de behandeling van andere oculaire aandoeningen waaronder corneale neovascularisatie of neovasculair glaucoom.^{24,25}

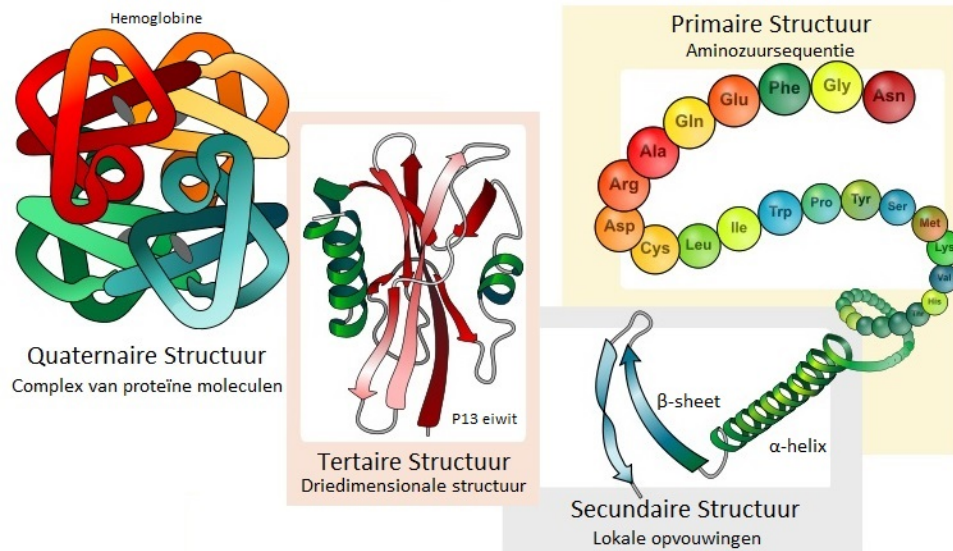
De grootte van eiwitten en hun geringe stabiliteit bij manipulatie en bewaring compliceert het formulatieproces.

1.3.1. Opbouw en structuur

Proteïnen worden opgebouwd uit peptiden die op hun beurt gevormd worden door kleinere bouwstenen, de aminozuren. Deze aminozuren bestaan uit een centraal C-atoom waaraan een carboxylgroep (-COOH), een aminegroep (-NH₂), en een H-atoom gebonden zijn. Een vierde groep, uniek voor elk van de 20 aminozuren, is aanwezig op de zijketen. Er bestaan positief of negatief geladen zijketens, en niet geladen polaire of apolaire groepen. De zijketens bepalen de specifieke eigenschap van het aminozuur en zijn belangrijk voor de uiteindelijke vorming van het proteïne.²⁶

Aminozuren vormen lange ketens door de reactie tussen de aminegroep van het ene aminozuur met de carboxylgroep van een ander aminozuur. Een nucleofiele aanval van het amine op de carboxylgroep doet een amide ontstaan, die de twee moleculen covalent aan elkaar verbindt. Een langgerekte keten van dergelijke aminozuren wordt een primaire sequentie genoemd. Deze primaire sequentie kan op zichzelf vouwen, waardoor covalente en niet-covalente interacties ontstaan tussen niet-naburige aminozuren. Deze interacties leiden tot de vorming van lokale driedimensionale structuren zoals α -helices en β -sheets, ook gekend als de secundaire structuren van een eiwit. Door de lokale opvouwingen neemt het eiwit in zijn geheel een driedimensionale structuur aan, de tertiaire structuur. Tertiaire

structuren kunnen in sommige gevallen, zoals bij hemoglobine, onderling associëren waardoor een groter complex van eiwitten ontstaat, namelijk de quaternaire structuur. Een schematisch overzicht wordt weergegeven in Figuur 1.5.²⁶



Figuur 1.5: Opbouw van een eiwit. Naar: Wikimedia Foundation, Inc. Wikipedia® [Internet]. Eiwitstructuur [Geraadpleegd op 18 mei 2014] Beschikbaar op <http://nl.wikipedia.org/wiki/Eiwitstructuur>

De vorming van deze driedimensionale structuur hangt sterk af van de zijketens aanwezig in het eiwit en de invloed van het milieu. In een waterig milieu zullen de aminozuren met hydrofiele zijketens zich aan de buitenkant van het proteïne bevinden, in contact met het water, terwijl de aminozuren met hydrofobe zijketens zich naar de kern van het proteïne zullen oriënteren. Daarnaast heeft de zuurtegraad en de zoutconcentratie een effect omdat ze de lading van het eiwit kunnen beïnvloeden.^{27,28}

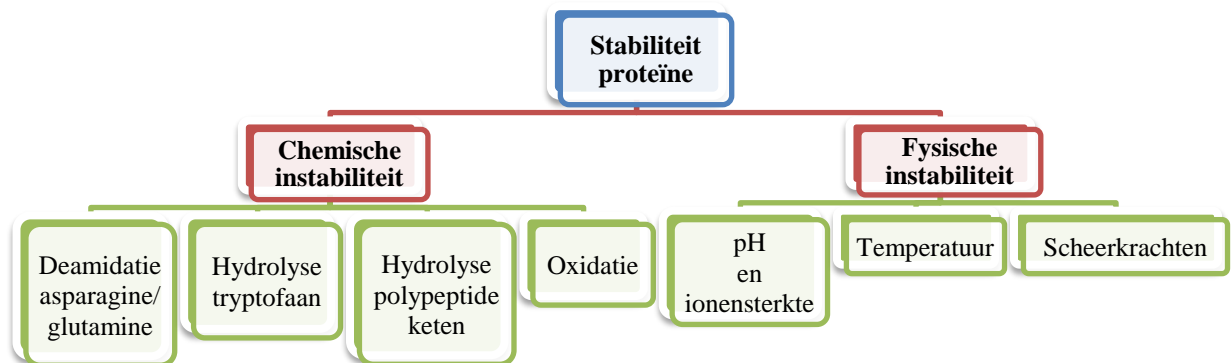
Een eiwit streeft steeds naar zijn conformatie met de laagste vrije energie. Deze conformatie is afhankelijk van de aminozuursequentie en is belangrijk voor de werking van het eiwit.²⁹ Gedenatureerde eiwitten, of foutief opgevouwen eiwitten, kunnen een gewijzigde of geen activiteit vertonen. Daarnaast bestaat het gevaar voor het optreden van aggregatie door interactie tussen hydrofobe zijketens van aminozuren die aan het eiwitoppervlak zijn blootgesteld in plaats van zich in de kern te bevinden. Grote onoplosbare aggregaten kunnen activiteitverlies van de proteïnen veroorzaken.^{27,28,29}

Er bestaat steeds een evenwicht tussen de opgevouwen en gedenatureerde conformatie van het eiwit. Dit evenwicht is afhankelijk van het milieu waarin het eiwit zich bevindt en bepaalt mede zijn activiteit.^{27,28,29}

1.3.2. Stabiliteit van proteïnen in waterig milieu

De aminozuursequentie is belangrijk voor de uiteindelijke structuur en werking van het proteïne. Dit maakt dat kleine structuurwijzigingen verlies van activiteit kunnen teweeg brengen, wat het labiel karakter van eiwitmoleculen verklaart.^{26,29}

Zowel chemische als fysische factoren bepalen de conformatie van een eiwit dat de stabiliteit van macromoleculen bepaalt. In Figuur 1.6 worden de processen die proteïnen negatief beïnvloeden schematisch weergegeven.



Figuur 1.6: Schematisch overzicht van de processen betrokken bij chemische en fysische instabiliteit van proteïnen.

1.3.2.1. Chemische instabiliteit

Een van de best bestudeerde chemische wijzigingen die proteïnen ondergaan, is de **deamidatie van asparagine**. De reactie vertoont een pH afhankelijkheid met een minimumsnelheid bij pH 3-6. Tijdens de reactie zal het stikstofatoom van de polypeptide keten gedeprotoneerd worden en via een nucleofiele aanval reageren met het partieel positief geladen koolstofatoom van de carbonyl functie van asparagine. Op deze wijze wordt een cyclische intermediaire structuur gevormd dat gehydrolyseerd kan worden en aanleiding geeft tot vorming van het aspartyl of isoaspartyl molecule. Met glutamine wordt dezelfde nucleofiele reactie waargenomen, maar leidt dit niet altijd tot hydrolyse van de intermediaire ringstructuur. Andere reacties die minder frequent voorkomen zijn bijvoorbeeld **hydrolyse van tryptofaan na oxidatie of hydrolyse van polypeptide ketens**.^{27,28,30}

Een andere belangrijke oorzaak van chemische instabiliteit van proteïnen is de **oxidatie** van aminozuren. De modificatie van de aminozuren leidt in sommige gevallen tot volledig of partieel verlies van de activiteit van het eiwit, terwijl het in andere gevallen de activiteit nauwelijks beïnvloedt.³⁰ De zijketens van de aminozuren die het meest gevoelig zijn voor deze oxidatie zijn histidine, methionine, cysteïne, tyrosine en tryptofaan.²⁸ Oxidatie van aminozuren ontstaat vooral door *reactive oxygen species* (ROS) zoals bijvoorbeeld H₂O₂,

$O_2^{\cdot-}$ of $\cdot OH$. Ze kunnen op allerlei manieren gevormd worden waarvan de reactie van moleculair zuurstof met metaalionen de belangrijkste is.^{27,28} De metaalionen kunnen aanwezig zijn als contaminanten in het solvent, of deel uitmaken van het eiwit zelf zoals Fe^{2+} en Fe^{3+} bij hemoglobine.²⁷ De reactie van zuurstof met metaalionen leidt tot de reductie van moleculair zuurstof en de vorming van een vrij zuurstofradicaal ($O_2^{\cdot-}$), weergegeven in Reactie 1.1. Dit zuurstofradicaal is chemisch onstabiel en ondergaat een dismutatie tot waterstofperoxide (H_2O_2) zoals voorgesteld in Reactie 1.2. Dit kan vervolgens op zich de aminozuren aantasten of verder de vorming van hydroxyl radicalen ($\cdot OH$) tot stand brengen. Dit is weergegeven in Reactie 1.3.³⁰



Ook licht kan verantwoordelijk zijn voor de oxidatieve modificatie van eiwitten door het ontstaan van ROS. Dit kan gebeuren door rechtstreekse absorptie van fotonen door chromoforen, of indirect via de vorming van singlet zuurstof (1O_2). De reeds vermelde aminozuren (histidine, methionine, cysteïne, tyrosine en tryptofaan), alsook fenylalanine, zijn het meest gevoelig aan deze reactie. De overige aminozuren absorberen enkel fotonen bij een golflengte lager dan 230 nm. Wanneer chromofore groepen van een eiwit fotonen absorberen, bereiken ze een geëxciteerde toestand die ze op drie manieren kunnen verlaten. Ze kunnen ofwel een radicaal waterstofatoom (H^{\cdot}) vrijstellen, ofwel fluorescentie vertonen, ofwel hun energie overdragen aan moleculair zuurstof waaruit het singlet zuurstof wordt gevormd. In het eerste geval wordt de chromofoor, b.v. van een van de aminozuren, zelf omgevormd tot een radicaal dat vervolgens kan reageren met moleculair zuurstof. In het laatste geval kan het singlet zuurstof schade berokkenen door rechtstreeks te reageren met naburige moleculen.^{27,28,30,31}

Ook hulpstoffen aanwezig in de formulatie van geneesmiddelen kunnen het ontstaan van ROS in de hand werken en zijn bijgevolg belangrijk voor de stabiliteit van eiwitten. Polyethyleenglycol en niet-ionische polyether surfactantia staan bekend voor de vorming van waterstofperoxide in functie van de tijd.^{27,32}

Voor de chemische stabiliteit van proteïnen is het van belang om de zuurstofconcentratie laag te houden en de blootstelling aan licht te vermijden. Verder kunnen chelatoren en anti-oxidantia toegevoegd worden om de oxidatie van aminozuren te verhinderen.

1.3.2.2. Fysische instabiliteit

Proteïnen bevinden zich in een bepaalde tertiaire of quaternaire structuur door het aangaan van verschillende intramoleculaire interacties waaronder zowel niet-covalente (waterstofbruggen, van der Waalskrachten, dipool-dipool interacties,...) als covalente interacties. Het in stand houden van deze interacties is afhankelijk van een aantal fysische factoren.

De **pH en ionensterkte** van het solvent bepalen of eiwitten in oplossing blijven of zullen neerslaan. Een aantal aminozuren hebben zure (aspartaat en glutamaat) of basische (histidine, arginine en lysine) zijketens die zich in een geprotoneerde of gedeprotoneerde vorm kunnen bevinden. Elk eiwit bezit een pH-waarde waarbij de som van de ladingen van de aminozuren in het proteïne neutraal is, wat het iso-elektrisch punt wordt genoemd. Wanneer de zuurtegraad te veel afwijkt van dit punt, kunnen grote elektrostatistische repulsies in het eiwit ontstaan die denaturatie van het proteïne in de hand werken. Voorbeelden hiervan zijn *henn egg-white* lysozyme en insuline. Anderzijds oefenen moleculen nabij het iso-elektrisch punt weinig onderlinge repulsie uit en bestaat er een grotere kans tot het vormen van aggregaten. Vorming van aggregaten gaat doorgaans gepaard met activiteitsverlies.^{33,34}

De temperatuur heeft eveneens een invloed op de stabiliteit van proteïnen. Elk proteïne bevindt zich in zijn driedimensionale structuur door het aangaan van covalente en niet-covalente interacties. Niet-covalente interacties zijn temperatuursafhankelijk en kunnen de instabiliteit van eiwitten bij hogere temperaturen verklaren. Wanneer de temperatuur van de eiwitoplossing stijgt, worden hydrofobe interacties in de hand gewerkt en waterstofbrug interacties verbroken.³⁵

De hoeveelheid interacties van elk type bepaalt bij welke temperatuur een eiwit zijn driedimensionale structuur verliest en zal denatureren. Deze temperatuur is verschillend voor alle eiwitten en wordt de smelttemperatuur van het proteïne genoemd. De denaturatie die optreedt boven de smelttemperatuur kan zowel reversibel als irreversibel zijn, afhankelijk van het eiwit.³⁵

Hoge temperaturen versnellen het verloop van chemische reacties. Het toevoegen van warmte kan de deamidatie van asparagine of glutamine, of de hydrolyse van de polypeptide keten in de hand werken. Het bewaren van waterige eiwitoplossingen in de koelkast (2-8 °C) kan de stabiliteit van de proteïnen echter negatief beïnvloeden. Immers, door de verhoogde oplosbaarheid van zuurstof in water bij lage temperaturen, kan de oxidatie van het eiwit bevorderd worden.^{27,30,34}

Een derde factor met potentieel negatieve invloed op de structuur van eiwitten zijn **scheerkrachten**. Ze kunnen ontstaan door het schudden van een recipiënt, een vloeistofstroom, of het induceren van een draaikolk met bijvoorbeeld een mixer.^{35,36,37} De mate waarin scheerkrachten een effect hebben op de stabiliteit van het proteïne is afhankelijk van de intensiteit van de scheerkrachten, het type recipiënt en het eiwit. Scheerkrachten kunnen eiwitten fragmenteren of ze denatureren waardoor ze hydrofobe interacties met elkaar aangaan.^{35,37} Deze hydrofobe interacties kunnen vervolgens leiden tot het vormen van aggregaten en neerslag. Bovendien kunnen gedatureerde proteïnen adsorberen aan hydrofobe oppervlakken van het recipiënt en aan het lucht-vloeistofoppervlak. Adsorptiefenomenen kunnen mede aan de basis liggen van activiteitsverlies van eiwitten.³⁸

De denaturatie tijdens het mengproces leidt niet noodzakelijk tot irreversibele vorming van aggregaten en fragmentatie van eiwitten. Dit is ondermeer het geval bij lysozyme, waarbij scheerkrachten tijdens een mengproces zelf niet verantwoordelijk zijn voor de inactivatie van het eiwit. Wanneer de scheerkrachten worden opgeheven, zal het eiwit terugkeren naar diens opgevouwen structuur zonder de vorming van aggregaten of afsplitsing van aminozuren. Tijdens een mengproces wordt de inactivatie van lysozyme veroorzaakt door hydrofobe interacties met de wanden van het recipiënt of het lucht-vloeistof grensvlak. Dit impliceert niet enkel de noodzaak aan de minimalisatie van de scheerkrachten tijdens een productieproces, maar eveneens aan de juiste keuze van de recipiënten.^{38,39}

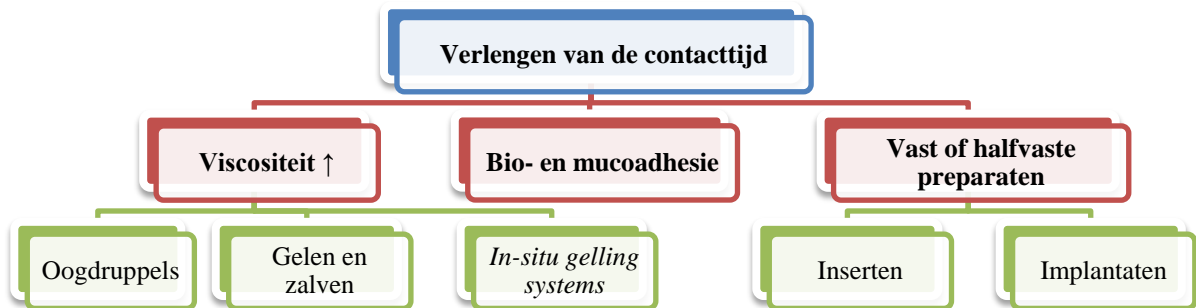
1.4. TOPICALE FORMULATIES VOOR OCULAIR GEBRUIK

De topicale toediening van oogpreparaten zoals oogdruppels en -suspensies zijn een veel gebruikte methode voor de behandeling van oculaire aandoeningen. Ze zijn eenvoudig toe te dienen en worden goed aanvaard door de patiënt. Er zijn echter een aantal precorneale en corneale factoren die de absorptie van farmaca hinderen, zodat de huidige formulaties niet optimaal zijn.

De verdedigingsmechanismen van het oog, zoals het knipperen van de oogleden, zorgen ervoor dat de klassieke oogpreparaten slechts voor een korte periode ($\pm 2-10$ min.)⁴ op het oogoppervlak verblijven. Ze worden snel gedraineerd via de traanpunten van het oog waardoor een frequente toediening noodzakelijk is om de concentratie van het farmacon in het doelwitweefsel binnen het therapeutische interval te houden. Er moet rekening gehouden worden met de hoge gevoeligheid van het oog.

Om de beschikbaarheid van oogpreparaten te verbeteren en een gereguleerde afgifte te bekomen zijn er naar nieuwe ontwikkelingsstrategieën gezocht. Zowel het verhogen van de

corneale permeabiliteit als het verlengen van de contacttijd zijn wenselijk. Het verlengen van de contacttijd wordt hier verder besproken. Een overzicht van mogelijke strategieën wordt weergegeven in Figuur 1.7.



Figuur 1.7: Strategieën voor het verlengen van de verblijftijd van oogpreparaten op het oogoppervlak.

1.4.1. Optimalisatie van oculaire artsenijvormen

Om irritatie aan het oog te vermijden moet de pH van het preparaat overeenstemmen met de pH van het oogoppervlak ($\pm 7,4$). Vanwege stabiliteitsredenen van het farmacon kan hiervan worden afwijken, maar moet het gebruik van sterke buffers worden vermeden. Het preparaat moet isotoon zijn aangezien hypotone, en vooral hypertone formulaties tranenvloed veroorzaken. Een te viskeuze oplossing irriteert het oog en veroorzaakt wazig zicht waardoor de knipperreflex een versnelde eliminatie teweeg brengt. Irritatie kan eveneens optreden wanneer de oppervlaktespanning van het preparaat sterk verschilt van deze van de traanfilm (40-46 mN/m).

Een eerste strategie om de verblijftijd op het oogoppervlak te verlengen is het verhogen van de viscositeit van het preparaat. Dit wordt gerealiseerd bij sommige traditionele preparaten, zoals oogdruppels, -gelen en -zalven, door een viskeuze formulatie in te brengen in de onderste ooglidzak. Daarnaast kan gebruik gemaakt worden van oplossingen waarvan de viscositeit stijgt na het indruppelen in het oog als gevolg van de oogtemperatuur of de samenstelling van de traanfilm. Voorbeelden van polymeren gebruikt voor dergelijke *in-situ gelling systems* zijn poloxamer 407, cellulose acetaat ftalaat latex en Gelrite[®]. De viscositeit van de polymeren zijn afhankelijk van respectievelijk de temperatuur, de pH en de ionenconcentratie.^{2,4,40,41}

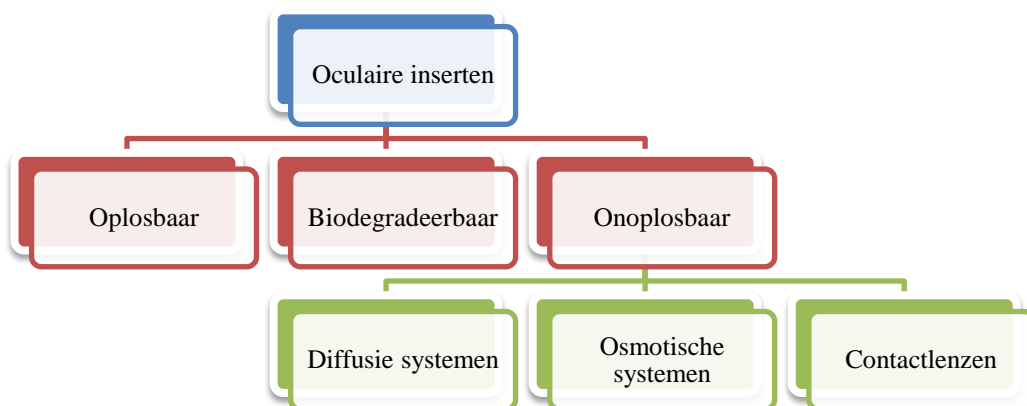
Bioadhesieve polymeren zijn moleculen die zich hechten aan de mucuslaag aanwezig op het conjunctivale en corneale epitheel. Ze verstrengelen zich fysisch met de mucineketens en vormen waterstofbruggen. Sommige polymeren, zoals kationoogeen chitosan, gaan ook elektrostatische interacties aan met de negatief geladen mucines. Door zich hieraan te

binden is hun verblijftijd afhankelijk van de mucine *turn-over* en blijven ze langer aanwezig op het oogoppervlak.^{2,4,40}

Het ontwikkelen van meer geschikte artsenvormen zoals oculaire inserten of implantaten zijn een derde manier om de oculaire beschikbaarheid van farmaca te verhogen. Oculaire inserten zijn kleine vaste of halfvaste preparaten die moeten worden ingebracht onder het bovenste ooglid, of in de onderste ooglidzak. Implantaten moeten door middel van een chirurgische ingreep in het oog worden geplaatst. De preparaten stellen een continue dosis van het opgeloste of gedispergeerde farmacon vrij in functie van de tijd.^{2,4,5,6,40,42}

1.5. OCULAIRE INSERTEN

Oculaire inserten kunnen onderverdeeld worden in drie groepen weergegeven in Figuur 1.8: oplosbare, biodegradeerbare en onoplosbare inserten. In tegenstelling tot onoplosbare preparaten dienen oplosbare en biodegradeerbare inserten niet verwijderd te worden uit het oog. De onoplosbare inserten kunnen verder onderverdeeld worden in diffusie systemen, osmotische systemen en contactlenzen.²



Figuur 1.8: Onderverdeling van oculaire inserten.

1.5.1. Samenstelling van oculaire inserten

Oplosbare of bioerodeerbare inserten vormen de oudste klasse binnen de inserten en zijn samengesteld uit oplosbare natuurlijke, semisynthetische of synthetisch polymeren. Het ingebedde farmacon wordt initieel snel vrijgesteld door middel van diffusie. Vervolgens zal het insert zwellen als gevolg van de penetratie van traanvocht in de matrix, gevolgd door een vertraagde vrijgave. Verdere hydratatie van de polymeermoleculen zal fysisch verbonden ketens van elkaar losmaken en erosie van de matrix tot stand brengen. Na verloop van tijd zal het volledige insert gedesintegreerd zijn waardoor de volledige vrijgave van het farmacon wordt bekomen.^{40,43,44}

Biodegradeerbare inserten zijn opgebouwd uit bioerodeerbare polymeren zoals polyorthocarbonaten en polyorthoesters. Ze vormen een matrix waarin het farmacon is gedispergeerd en worden soms omgeven met een hydrofobe film (b.v. ethylcellulose) die ondoorlaatbaar is voor het farmacon en andere hydrofiele componenten. Ze stellen het farmacon vrij door enzymatische degradatie en hydrolyse van de hydrofiele polymeermatrix. Dit leidt tot erosie van de matrix en een continue vrijgave van het farmacon met een nulde orde kinetiek.^{5,40,42,44,45,46,47}

De **onoplosbare inserten** kunnen onderverdeeld worden in drie groepen: diffusie systemen, osmotische systemen en contactlenzen. Bij het eerste systeem bestaat het insert uit een centraal geneesmiddelreservoir omgeven door een microporeus membraan dat de diffusie van het farmacon uit het reservoir controleert. In osmotische systemen bevat het insert ook een centraal reservoir, maar is het omgeven door een semi-impermeabel onoplosbaar polymeermembraan. In de kern kunnen zich osmotisch actieve stoffen of polymeren bevinden die door penetratie van vloeistof in het insert een druk zullen genereren. Deze druk drijft het farmacon uit het insert op vertraagde wijze. De contactlenzen zijn een derde groep opgebouwd uit hydrofiele of hydrofobe polymeren die onderling covalent verbonden zijn tot een polymeernetwerk. Het farmacon wordt geïncorporeerd tijdens het productieproces, door de contactlenzen voor toediening in een farmaconoplossing te dompelen, of door de farmaconoplossing in te druppelen na het aanbrengen van het insert.^{2,3,40,42}

1.5.2. Voor- en nadelen

Het grootste voordeel van oculaire inserten tegenover de klassieke oogpreparaten is de verminderde toedieningsfrequentie nodig om een therapeutisch effect te bekomen. Door het aantal applicaties te verminderen kan een verbeterde therapietrouw worden verwacht. De gecontroleerde en continue vrijgave van het farmacon uit een oculair insert zorgt ervoor dat bij correct gebruik de concentratie niet langer toxische waarden zal bereiken. Hierdoor vermindert de kans op systemische nevenwerkingen doordat absorptie via het nasolacrimaal systeem afneemt. Oculaire preparaten moeten volgens de Europese Farmacopee *Eye preparations* steriel zijn. In tegenstelling tot klassieke oogdruppels, moeten de oculaire inserten geen bewaarmiddelen bevatten daar steriele inserten verpakt worden in unidoses.

Het grootste nadeel van de inserten is de applicatie in het oog. Ze dienen onder het bovenste ooglid, of in de onderste conjunctivale zak te worden ingebracht. In het geval van contactlenzen worden ze over de cornea geplaatst. Indien de inserten niet oplosbaar of biodegradeerbaar zijn, moeten ze na verloop van tijd verwijderd worden. Patiënten kunnen hun aanwezigheid als vervelend of irriterend ervaren.^{40,42}

2. DOELSTELLINGEN

De meeste oculaire aandoeningen worden op de dag van vandaag behandeld met klassieke oogpreparaten zoals oogdruppels, -gelen of -zalven. Ze worden algemeen goed verdragen, maar hebben een lage oculaire beschikbaarheid wat ertoe leidt dat frequente applicatie is vereist. Het onderzoek had als doel een formulatie te ontwikkelen waarvan de oculaire beschikbaarheid verbetert en bijgevolg de doseringsfrequentie daalt. Bijzondere aandacht werd besteed aan een bereidingsmethode die de verwerking van labiele farmaca zoals eiwitten toelaat.

Bij de verwerking van proteïnen dient rekening gehouden te worden met de thermolabiele aard van de molecule, de gevoeligheid voor oxidatie en het negatief effect van scheerkrachten op de conformatie. Er werd in het onderzoek gekozen voor de productie van oplosbare oculaire inserten, waarvoor een innovatieve bereidingsmethode werd ontwikkeld. De optimalisatie van de bereidingsmethode werd geëvalueerd aan de hand van een *design of experiments* waarbij drie moleculen met een verschillende moleculaire massa werden geselecteerd: natriumfluoresceïne als fluorofoor *tracer* molecule (376,3 Da)⁴⁸, het eiwit lysozyme (14 307 Da)⁴⁹ en het eiwit albumine (66 430 Da)⁵⁰.

3. MATERIALEN EN METHODEN

3.1. MATERIALEN

3.1.1. Chemicaliën

Natriumfluoresceïne, lysozyme en albumine werden verkregen door de firma Sigma-Aldrich (Steinheim, Duitsland). Natriumfluoresceïne is een fluorescente molecule en heeft een moleculaire massa van 376,3 Da. Het product werd onder poedervorm geleverd.⁴⁸

Als modelproteïne werd lysozyme, opgezuiverd uit kippeneiwit, met een molecuulmassa van 14 307 Da aangekocht als gelyofiliseerd poeder.⁴⁹

Als tweede modelproteïne werd albumine (*bovine serum albumine*) eveneens aangekocht als lyofilisaat. De moleculair massa bedraagt 66 430 Da.⁵⁰

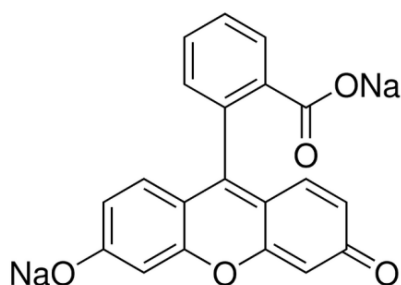
Glycerol werd verkregen bij de firma Sigma-Aldrich (Steinheim, Duitsland). Het heeft een zuiverheidsgehalte van minstens 99,5% (V/V), waardoor aan de eisen van de *American Chemical Society* wordt voldaan.⁵⁴

Via de firma Colorcon Limited (Kent, Engeland) werd hydroxypropyl methylcellulose (HPMC) aangekocht. Vanwege zijn gebruik voor gecontroleerde vrijgave werd gekozen voor het subtype MethocelTM E10M premium CR.⁵⁵

Phosphate bufferd saline (PBS) werd telkens bereid door 8,200 g NaCl van Fagron (Waregem, België), 0,300 g NaH₂PO₄·2H₂O van Merck (Darmstadt, Duitsland) en 1,540 g Na₂HPO₄·2H₂O van Merck (Darmstadt, Duitsland) op te lossen in gezuiverd water en aan te lengen tot een volume van 1000 mL.

3.1.2. Natriumfluoresceïne

Natriumfluoresceïne is een fluorofore molecule met een maximale absorptie sterk afhankelijk van de pH. Ze varieert tussen 460 nm en 493,5 nm in waterig milieu. Het wordt in de geneeskunde gebruikt als diagnosticum voor angiografische doeleinden.⁵¹ De structuur wordt weergegeven in Figuur 3.1.

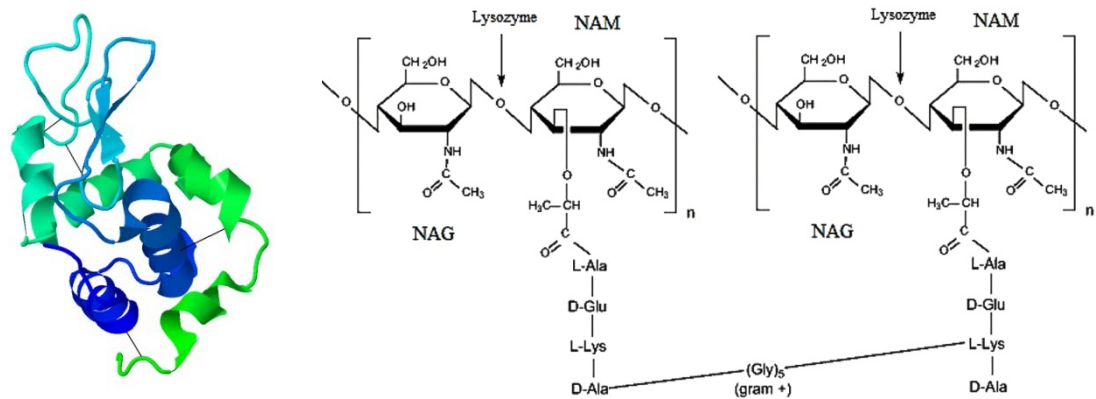


Figuur 3.1: Structuur van natriumfluoresceïne. Naar: Sigma-Aldrich® [Internet]. Fluoresceïn sodium salt [Geraadpleegd op 18 mei 2014] Beschikbaar op: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/f6377?lang=en®ion=BE>

3.1.3. Lysozyme

Lysozyme wordt opgebouwd uit een polypeptide keten van 129 aminozuren met vier gecrosslinkte disulfide bindingen. Het komt voor in verschillende menselijke secreties zoals traanvocht, speeksel en moedermelk. Het proteïne kan gram positieve bacteriën zoals Clostrida en melkzuurbacteriën lyseren door hydrolyse van de $\beta(1-4)$ glycoside bindingen tussen N-acetyl glucosamine (NAG) en N-acetyl muraminezuur (NAM).^{49,52} In Figuur 3.2 wordt de driedimensionale structuur van lysozyme en zijn enzymatische activiteit weergegeven.

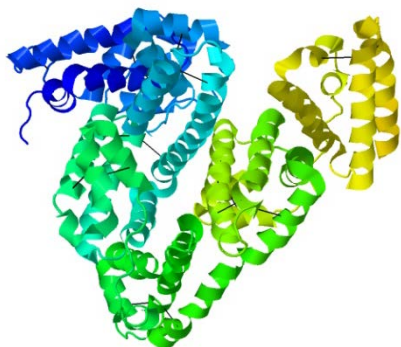
Lysozyme is werkzaam in een pH gebied van 6,0 tot 9,0 met een optimale activiteit bij pH 6,2. Het *chicken egg white* lyofilisaat wordt best bewaard bij een temperatuur van $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.⁴⁹



Figuur 3.2: (Links) Driedimensionale structuur van lysozyme met disulfide bindingen voorgesteld als zwarte verbindinglijnen. (Rechts) Werking van lysozyme ter hoogte van de peptidoglycaanlaag met NAG: N-acetyl glucosamine en NAM: N-acetyl muraminezuur. Naar: (Links) RSCB Protein Data Bank [internet]. The Research Collaboratory for Structural Bioinformatics (RCSB): High resolution structure of egg white lysozyme [geraadpleegd op 3 juni 2014]. Beschikbaar op: <http://www.rcsb.org/pdb/explore/jmol.do?structureId=4QEQ&bionumber=1> (L) en Sigma-Aldrich. Lysozyme and peptidoglycans. [Internet]. (Rechts) Sigma Aldrich.org. [Geraadpleegd op 18 mei 2014]. Beschikbaar op: <http://www.sigmaaldrich.com/life-science/metabolomics/enzyme-explorer/learning-center/carbohydrate-analysis/carbohydrate-analysis-iii.html#Lysozyme>.

3.1.4. Albumine

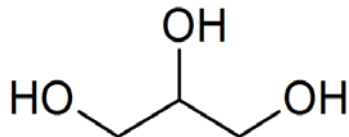
Bovine serum albumin bestaat uit een enkele polypeptide keten van 583 aminozuren met 17 gecrosslinkte disulfide bindingen. Het eiwit komt verspreid voor in lichaamsvloeistoffen zoals bloed, interstitiële vloeistof en in alle weefsels van zoogdieren. Albumine heeft als voornaamste functie het in stand houden van de oncotische druk. Boven temperaturen van $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ vormen de moleculen irreversibele aggregaten. Het product moet bewaard worden in de koelkast bij een temperatuur van 2 tot $8\text{ }^{\circ}\text{C}$.⁵⁰ De driedimensionale structuur wordt weergegeven in Figuur 3.3.



Figuur 3.3: Driedimensionale structuur van *bovine serum albumin* met disulfide bindingen voorgesteld als zwarte verbindingslijnen. Naar: RSCB Protein Data Bank [internet]. The Research Collaboratory for Structural Bioinformatics (RCSB): Crystal Structure of Bovine Serum Albumin [geraadpleegd op 3 juni 2014]. Beschikbaar op: <http://www.rcsb.org/pdb/explore/jmol.do?structureId=4F5S&opt=3&bionumber=2>

3.1.5. Glycerol

Glycerol of propaan-1,2,3-triol is een heldere, viskeuze vloeistof met hygroscopische eigenschappen. Om de flexibiliteit van de polymeermatrix te verhogen, werd glycerol als weekmaker toegevoegd bij de bereiding van het oculair insert.^{53,54} De structuur wordt weergegeven in Figuur 3.4.

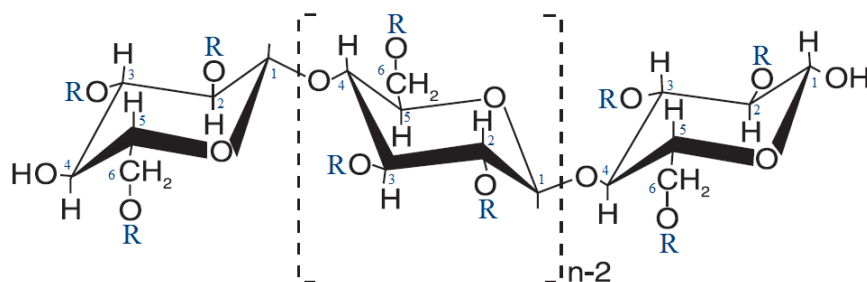


Figuur 3.4: Structuur van glycerol.

3.1.6. Hydroxypropyl methylcellulose

HPMC is een niet-ionogeen polymeer gesynthetiseerd uit natuurlijk cellulose. De β -D glucose eenheden van HPMC worden onderling verbonden via 1,4- β -glycosidische bindingen. De algemene structuur wordt weergegeven in Figuur 3.5.

De methoxy- en hydroxypropoxygroepen, gesubstitueerd op de β -D glucose eenheden, geven het polymeer unieke eigenschappen om onoplosbaar te zijn in warm water en een viscositeitstijging te vertonen bij temperaturen boven de *thermal gelation temperature* (T_m). Commercieel verkrijgbare preparaten gebaseerd op HPMC verschillen in substitutiegraad aan methoxy- en hydroxypropoxygroepen. De substitutiegraad bepaalt de oplosbaarheid en de T_m .^{53,55,56,57}



Figuur 3.5: Structuur van hydroxypropyl methylcellulose (HPMC) met R= -H, of -CH₃, of -H₂CHOCHCH₃. Naar: The Dow Chemical Company. Using METHOCEL Cellulose Ethers for Controlled Release of Drugs in Hydrophilic Matrix Systems. [Internet]. Dow Chemical Company, VS, ©2000. [Geraadpleegd op 4 mei 2014]. Beschikbaar op :http://www.colorcon.com/literature/marketing/mr/Extended%20Release/METHOCEL/English/hydroph_matrix_broch.pdf

HPMC vindt zijn toepassing als stabilisator van emulsies, als bindmiddel in voedingsmiddelen, als vertraagde afgifte preparaat bij matrixtabletten, als viscositeitsverhoger in vaste en vloeibare preparaten, en als alternatief voor gelatine capsules. Het polymeer kent een brede toepassing vanwege zijn stabiliteit in aanwezigheid van warmte, licht of lucht, zijn oplosbaarheid in gastro-intestinale vloeistoffen, zijn zwellingscapaciteit en zijn lage toxiciteit (NOAEL in ratten van 5000 mg/kg/dag).^{55,56,58}

De classificatie van de verschillende HPMC producten gebeurt door middel van vier cijfers (Eur. Ph.) of op basis van letters (Methocel™). De eerste twee cijfers stellen de gemiddelde substitutiegraad voor van de methoxygroepen, terwijl de volgende twee cijfers deze van de hydroxypropoxygroepen weergeeft. Voor elk van de combinaties bestaat er een Methocel™ product met een overeenkomstige letter. De onderverdeling wordt weergegeven in Tabel 3.1.^{53,55}

Tabel 3.1 Classificatie HPMC producten.

Substituetiype Eur. Ph.	Methocel™ classificatie	Thermal gelation point (°C) ^a	Methoxy substitutiegraad (%)		Hydroxypropoxy substitutiegraad (%)	
			Min	Max	Min	Max
2208	K	70	19	24	4	12
2906	F	54	27	30	4	7,5
2910	E	56	28	30	7	12

^a bij een concentratie van 2% (m/V) in water.

Methocel™ E10M en Methocel™ K100M zijn de meest gebruikte producten voor de formulatie van preparaten met een gecontroleerde vrijgave. In het onderzoek werd gekozen voor het product Methocel™ E10M premium CR. De letter M staat voor 1000 en CR voor *controlled-release grade*. Het product vertoont een viscositeit van 10 000 mPa.s bij 20 °C wanneer het gedispergeerd is in water bij een concentratie van 2% (m/V).⁵⁵

3.2. METHODEN

3.2.1. Bereidingsproces van oculaire inserten

3.2.1.1. Probleemstelling klassieke bereidingsmethode

Eiwitten kunnen zowel temperatuurgevoelig, oxidatiegevoelig als gevoelig aan (hoge) scheerkrachten zijn. Hoge temperaturen en mechanische agitatie zoals scheerkrachten kunnen proteïnen denatureren met aggregatie en activiteitsverlies als gevolg. Oxidatie kan leiden tot structuurveranderingen en het neerslaan van proteïnen.

De klassieke bereidingsmethode voor polymere dispersies houdt geen rekening met specifieke stabiliteitsvereisten van dergelijke moleculen. De klassieke methode vereist dat het polymeer, onder voortdurend homogeniseren, aan een verwarmde hoeveelheid oplosmiddel wordt toegevoegd opdat een homogene polymere dispersie bekomen wordt zonder vorming van klonters. Om een homogene verdeling van het farmacon in deze polymere matrix te bewerkstelligen, dient het farmacon desgelijks in deze fase te worden toegevoegd. Na het voltooiën van het polymerisatieproces is het immers niet langer mogelijk het farmacon via mechanische wijze in de hoogviskeuze matrix te verdelen zonder inclusie van luchtballen. In een volgende stap zal onder mengen de dispersie worden afgekoeld tot kamertemperatuur (20 °C) zodat een heldere hydrofiele polymeeroplossing wordt gevormd.

3.2.1.2. Algemeen principe nieuwe bereidingsmethode

Om de bereiding van oculaire inserten opgeladen met proteïnen te realiseren, werd een nieuwe bereidingsmethode ontwikkeld. Deze methode laat de productie van oculaire inserten toe zonder het farmacon bloot te stellen aan hoge temperaturen, lucht of hoge scheerkrachten. Dit kan bekomen worden door het farmacon aan de polymeermatrix toe te voegen na het voltooiën van het polymerisatieproces van HPMC in plaats van tijdens de polymerisatie zoals wel het geval is bij de klassieke methode.

3.2.1.3. Initieel ontwikkelde bereidingsmethode

Initieel werd een bereidingsmethode ontwikkeld voor de productie van oculaire inserten. Tijdens dit onderzoek werd deze bereidingsmethode geoptimaliseerd. Het bereidingsproces van de initieel ontwikkelde methode wordt hieronder beschreven.

De viskeuze polymeeroplossing wordt bereid door HPMC toe te voegen aan een verwarmde hoeveelheid gezuiverd water. Een temperatuur hoger dan de T_m is noodzakelijk opdat het polymeer niet onmiddellijk colloïdaal zou oplossen en zwellen bij contact met water. Deze zwelling werkt klontervorming in de hand. Bij een temperatuur hoger dan de T_m zijn

HPMC-partikels niet langer in staat waterstofbruggen te vormen met omringende watermoleculen. Dit verhindert de onmiddellijke hydratatie van het polymeer en laat het vormen van een homogene dispersie toe. De HPMC dispersie wordt, onder roeren, afgekoeld tot kamertemperatuur of lager. De polymeerpartikels lossen colloïdaal op in het afgekoelde water met het ontstaan van een heldere hydrofiele polymeermatrix als gevolg. Deze viskeuze polymeeroplossing wordt vervolgens gedehydrateerd door ze bloot te stellen aan lucht bij een temperatuur van 150 °C. Een temperatuur boven de T_m werd gekozen waardoor er fasescheiding tussen de polymeermoleculen en het water zou optreden door het verbreken van waterstofbruggen tussen HPMC-partikels en omringende watermoleculen. De dehydratatie zorgt voor een daling van het volume en een stijging van de concentratie HPMC in de polymeermatrix.

Vervolgens werd het gedehydrateerde polymeer in een spuit met een volume van 20 of 30 mL geplaatst. Het farmacon en de weekmaker werden als waterige oplossing toegevoegd aan de spuit om diffusie van de oplossing in de matrix toe te laten. Om de stabiliteit van het proteïne te waarborgen gebeurde de rehydratie bij een temperatuur van 2 °C. Daar de kinetiek van het diffusieproces traag is bij lage temperaturen kan het rehydratieproces tot enkele weken in beslag nemen. Onder milde extrusie werden ruim 160 oculaire inserten met een diameter van 2 mm en een massa van 150 mg geëxtrudeerd.

3.2.1.4. Optimalisatie initiële bereidingsmethode

Het rehydratieproces van de initiële bereidingsmethode nam tot zes weken in beslag om een homogene verdeling van lysozyme in de polymeermatrix te bekomen. Om deze oplaadtijd en bijgevolg het bereidingsproces te verkorten, werd de bereidingsmethode gewijzigd. De duur van het rehydratieproces wordt bepaald door de diffusie van het farmacon in de matrix. Volgens de eerste wet van Fick, weergegeven in Vergelijking 3.1, zal de diffusiesnelheid stijgen wanneer het diffusieoppervlak wordt vergroot en de diffusieafstand wordt verkleind.

$$J = -D \cdot \frac{dc}{dx} = -D \cdot A \cdot K \cdot \frac{C_0 - C_m}{x} \quad \text{Vergelijking 3.1.}$$

Eerste wet van Fick waarbij J = flux of diffusiesnelheid van het farmacon, D = diffusiecoëfficiënt en $\frac{dc}{dx}$ = concentratiegradiënt, A = diffusieoppervlak, K = verdelingscoëfficiënt, C_0 = concentratie farmacon in toegevoegde oplaadoplossing; C_m = concentratie farmacon in de polymeermatrix; x = diffusieafstand in de polymeermatrix.

Voorts beschrijft de wet van Stokes-Einstein dat de diffusiecoëfficiënt D beïnvloed wordt door de temperatuur, de viscositeit van de matrix en de hydrodynamische diameter van de molecule. De wet van Stokes-Einstein wordt weergegeven in Vergelijking 3.2.

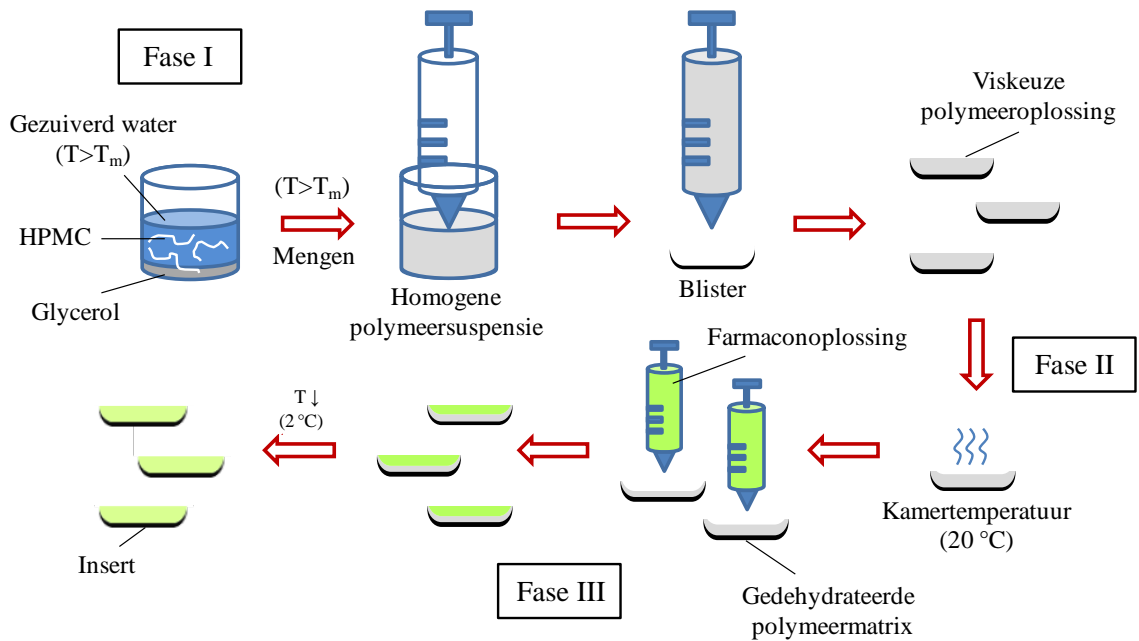
$$D = k_B \cdot T \cdot \frac{1}{6\pi\eta r} \quad \text{Vergelijking 3.2}$$

Wet van Stokes-Einstein waarbij D = diffusiecoëfficiënt, k_B = Boltzmann constante, T = absolute temperatuur (K), η = viscositeit van de matrix, r = hydrodynamische diameter molecule.

Om de rehydratietijd te beperken werd geopteerd om de oculaire inserten niet langer te extruderen uit een spuit, maar individueel te bereiden in de eindverpakking. Door de inserten in polyvinylchloride (PVC) blisters van capsule maat 4 te formuleren wordt het volume van de polymeermatrix verkleind, waardoor de diffusieafstand afneemt en het diffusieoppervlak, in verhouding tot het volume vergoot. De methode zal een snellere oplaadtijd toelaten van de polymeermatrix en vermijdt de lichte scheerkrachten die nodig waren voor de extrusie van individuele inserten uit de spuit. De dehydratatie zal bij deze methode niet meer mogelijk zijn bij hoge temperaturen, maar zal gebeuren bij kamertemperatuur omwille van de thermolabele eigenschappen van de PVC-blisters.

3.2.1.5. Praktische uitvoering

Lege PVC-blisters van capsule maat 4, verkregen door Janssen Pharmaceutica (Beerse, België), werden genummerd en gewogen. Gezuiverd water werd bekomen door gedestilleerd water te koken. Dit werd vervolgens afgekoeld tot een temperatuur van 80-90 °C. De bereidingsmethode kan verder worden onderverdeeld in drie verschillende fasen zoals weergegeven in Figuur 3.6.



Figuur 3.6: Schematische weergave van het bereidingsproces.

Fase I: Bereiding van een hoog viskeuze (20% (m/m)) HPMC oplossing

Een massa van 4,60 g HPMC en 0,18 g glycerol werd in een getarreeerde maatbeker van 100 mL afgewogen. In dezelfde maatbeker werd 18,22 g van het verwarmde water (80-90 °C) overgebracht. Door het recipiënt op een magnetische roerplaat (VWR™, VMS-C7-2, IKA, Staufen, Duitsland) te brengen, werd de dispersie gehomogeniseerd. Op regelmatige tijdstippen werd het recipiënt gewogen. De homogene suspensie werd opnieuw aangelengd tot het begingewicht met gezuiverd water om te compenseren voor de verdampte hoeveelheid water. De HPMC dispersie werd vervolgens nauwkeurig verdeeld in PVC-blisters op basis van massa waarna ze werden afgekoeld tot kamertemperatuur.

Fase II: Dehydratie van de viskeuze oplossing tot vorming van een hoog viskeuze polymere matrix

De gevulde blisters uit fase I werden blootgesteld aan de lucht bij kamertemperatuur om evaporatie van water toe te laten. Op deze manier werd de colloïdale polymere oplossing gedroogd tot een gewenste concentratie aan HPMC. Deze concentratie werd gravimetrisch bepaald, rekening houdend met het tarragewicht van de PVC-blisters. De term droogpercentage wordt verder gebruikt om de concentratie in massaprocent aan HPMC in deze fase aan te duiden.

Fase III: Rehydratatie van de polymeermatrix met farmaconoplossing

De gedehydrateerde polymeermatrix uit fase II werd aangelengd met een hoeveelheid farmaconoplossing. Deze oplossing bestaat uit gezuiverd water en een hoeveelheid farmacon opdat de concentratie aan actief bestanddeel 3% (m/m) van de totale massa van het insert zou bedragen. Met de samenstelling van de oplossing werd eveneens rekening gehouden met het beoogde eindpercentage van 25% (m/m) HPMC in het insert.

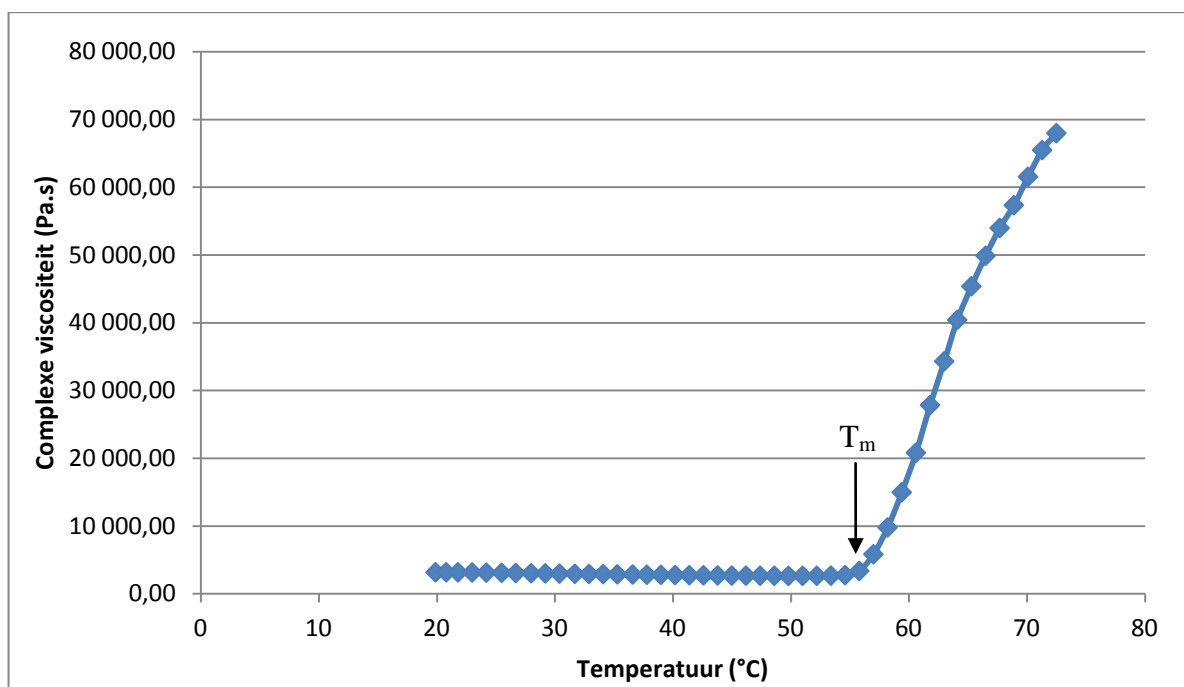
De inserten werden gedurende 24 u of 72 u, afhankelijk van het experiment, in de koelkast geplaatst bij een temperatuur van 2 °C om rehydratatie van de matrix mogelijk te maken.

3.2.2. Reologische karakterisering

Polymeermoleculen in oplossing gaan interacties aan met watermoleculen via waterstofbruggen. Deze interacties en de fysische en chemische interacties tussen de polymeermoleculen onderling geven de polymeeroplossing viskeuze eigenschappen. Bij lage temperaturen worden weinig polymeer-polymeer interacties waargenomen en worden de meeste polymeermoleculen gehydrateerd door de omringende watermoleculen. Wanneer de temperatuur verhoogt, verzwakken de waterstofbruggen tussen het polymeer en de watermoleculen. Wanneer tot boven de *thermal gelation temperature* wordt verwarmd, worden hydrofobe interacties tussen de polymeermoleculen onderling sterk bevorderd. Dit leidt tot dehydratatie van het polymeer met een sterke viscositeitstijging als gevolg. Het dehydratieproces is omkeerbaar.^{55,59}

Om de onmiddellijke hydratatie van het polymeer en klontervorming te vermijden, dient de temperatuur van het solvent bij bereiding van een viskeuze HPMC oplossing boven de T_m te liggen.

De T_m werd bepaald voor de 20% (m/m) hoog viskeuze HPMC oplossing bereid in fase II van de bereidingsmethode. Door middel van de Modular Compact Rheometer 102 van Anton Paar (Graz, Oostenrijk) werd de HPMC oplossing geanalyseerd. De temperatuur van het staal werd opgedreven van 20 °C naar 90 °C met een snelheid van 1 °C per 0,15 s. Er werd een constante *shear* van 1% amplitude op het staal uitgeoefend bij een oscillatiefrequentie van 1 Hz. Het experiment werd *in triplo* uitgevoerd. De grafische voorstelling van de gemiddelde waarden wordt weergegeven in Figuur 3.7.



Figuur 3.7: Grafische voorstelling van de *thermal gelation temperature* (T_m).

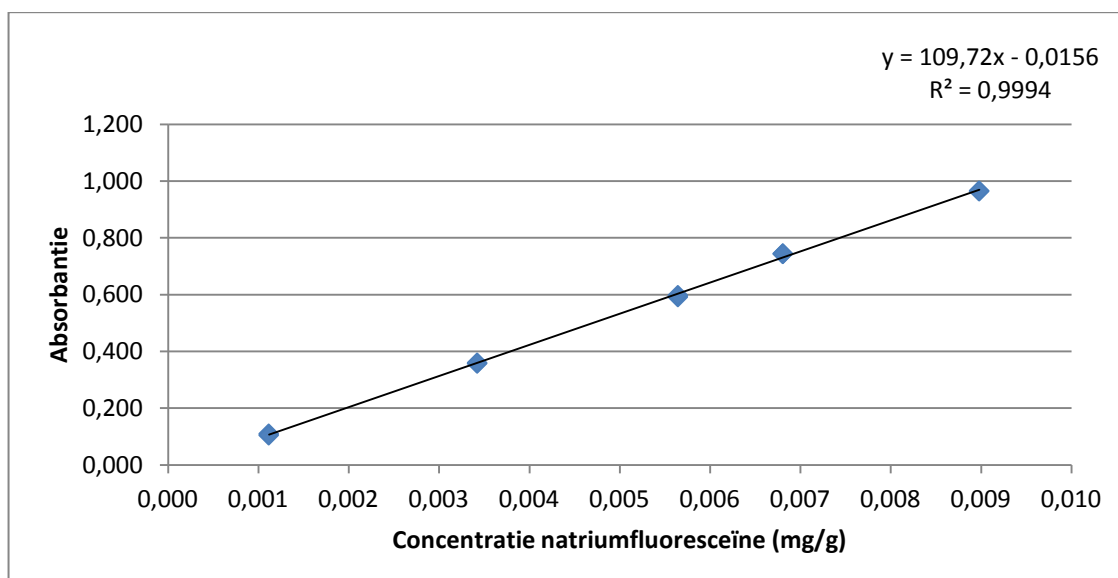
De gemiddelde waarde voor de T_m bedraagt $57 \pm 1,2$ °C.

3.2.3. Kalibratiemodel voor de gehaltebepaling

De bepaling van het gehalte aan natriumfluoresceïne, lysozyme en albumine werd spectrofotometrisch uitgevoerd met behulp van een UV/VIS-spectrofotometer (Genesys 10 UV, Thermo Electron Corporation, Madison, VS) en kwartscuvetten van het type 6030-UV van de firma Hellma (Kruibeke, België). Een verdunningsreeks werd opgesteld vanuit een stockoplossing aangemaakt in gezuiverd water. De absorbanties werden *in duplo* gemeten bij de golflengte van maximale absorbantie: 484 nm voor natriumfluoresceïne, 280 nm voor lysozyme en 278 nm voor albumine. Met behulp van het softwareprogramma Microsoft Excel® 2010 (Microsoft®, Redmond, WA, VS) werd een ijklijn opgesteld en een regressieanalyse uitgevoerd.

3.2.3.1. Ijklijn natriumfluoresceïne

Een stockoplossing met een concentratie van 0,010 mg/g natriumfluoresceïne werd aangemaakt waaruit een verdunningsreeks met vijf concentratieniveaus werd opgesteld: 0,001 mg/g, 0,003 mg/g, 0,006 mg/g, 0,007 mg/g, 0,009 mg/g. De absorbanties werden bepaald en uitgezet tegenover de respectievelijke concentraties. Een ijklijn werd opgesteld met behulp van 10 gemeten punten zoals weergegeven in Figuur 3.8.

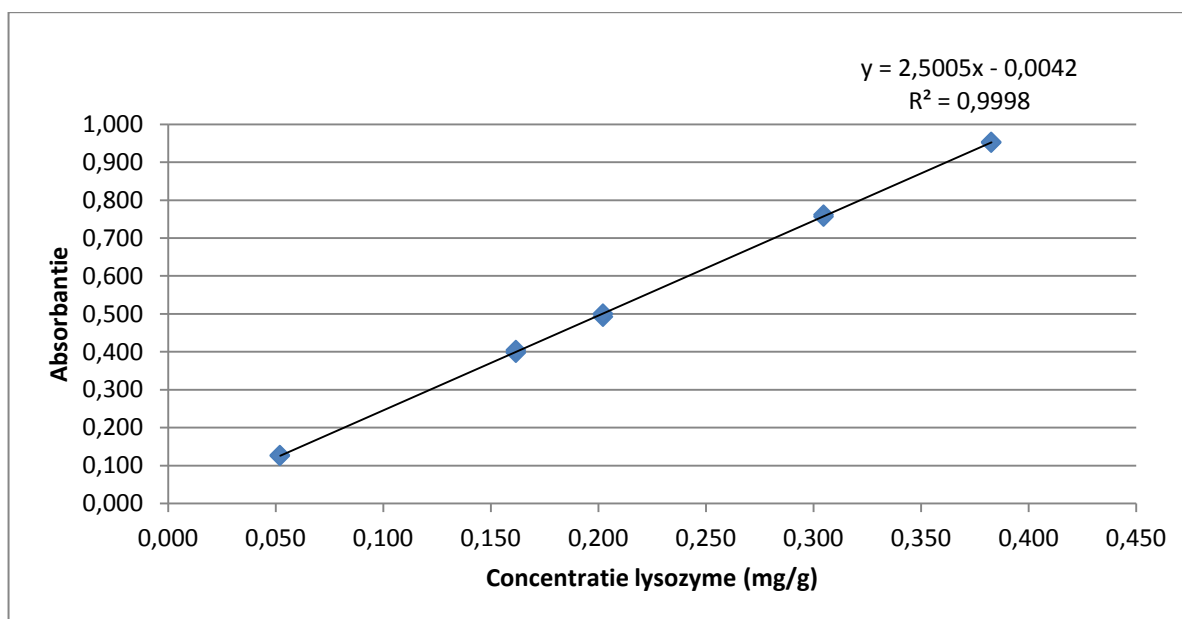


Figuur 3.8: IJklijn van natriumfluoresceïne bepaald bij golflengte 484 nm, n = 10.

De storingen zijn homoscedastisch verdeeld. Ze vertonen geen trend en zijn random verspreid. De maximale afwijking berekend als de grootste afwijking gedeeld door de absorbantie bij de middelste concentratie bedraagt 2,31%. Deze afwijking is kleiner dan de maximale afwijking van 5% die wordt toegestaan. De concentraties met overeenkomstige absorbanties werden onderworpen aan een t-test om een lineair verband na te gaan. De nulhypothese stelt dat de richtingscoëfficiënt gelijk is aan 0. Aangezien de t-waarde (111,23) groter is dan de kritische t-waarde (2,31) mag ze worden verworpen en is de richtingscoëfficiënt significant verschillend van 0. Het 95% confidentie-interval van het snijpunt met de abscis omvat het punt 0 niet, waardoor de rechte niet door de oorsprong gaat. Het uitvoeren van een eenpuntskalibratie is hierdoor niet mogelijk. Een correlatiecoëfficiënt R van 0,9997 duidt op een positieve correlatie tussen de concentratie natriumfluoresceïne en de absorbantie. Bij een stijgende concentratie wordt een hogere absorbantie waargenomen. De R^2 bedraagt 0,9994 waardoor de variabiliteit in de absorbantie voor 99,94% verklaard kan worden door de relatie die bestaat met de concentratie. De grafische voorstelling van de storingen en de gegevensanalyse worden weergegeven in Bijlage 1.

3.2.3.2. IJklijn lysozyme

Vanuit een stockoplossing met een concentratie van 0,758 mg/g lysozyme werd een verdunningsreeks aangemaakt met vijf concentratieniveaus: 0,052 mg/g, 0,162 mg/g, 0,202 mg/g, 0,305 mg/g en 0,383 mg/g. De absorbanties werden bepaald en uitgezet tegenover de respectievelijke concentratie. Een ijklijn werd opgesteld met behulp van 10 punten zoals weergegeven in Figuur 3.9.

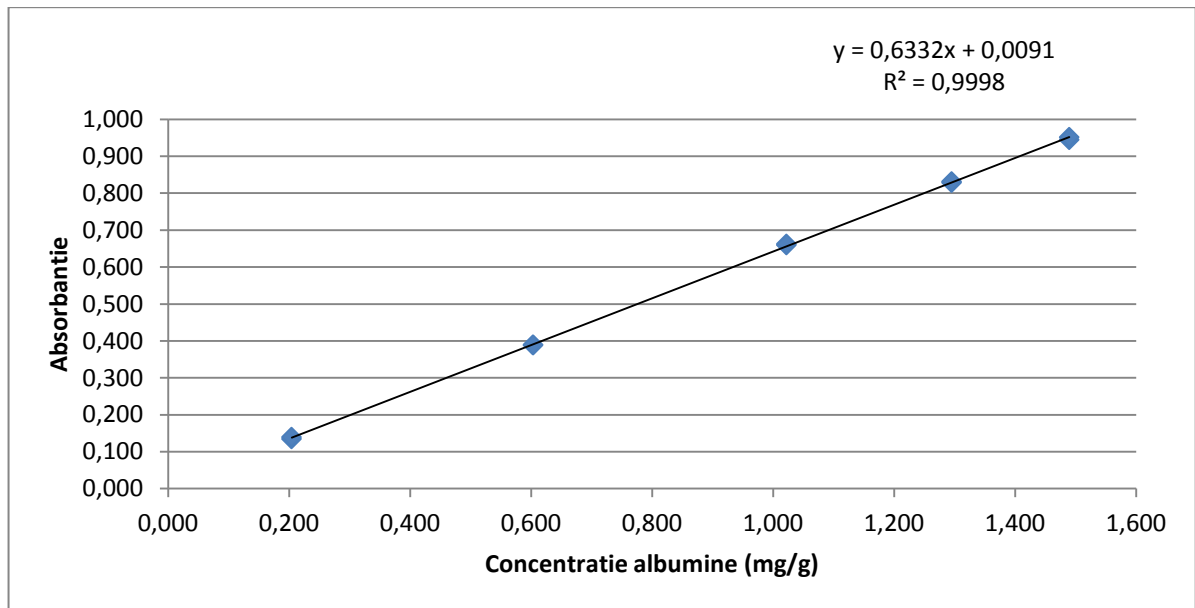


Figuur 3.9: IJklijn van lysozyme bepaald bij golflengte 280 nm, n = 10.

De afwijkingen zijn random verdeeld en vertonen geen trend, wat op homoscedasticiteit duidt. De maximale afwijking bedraagt 1,69% en is kleiner dan de maximale afwijking van 5%. Er bestaat een lineair verband tussen de concentratie en de absorbantie van lysozyme aangezien de t-waarde (230,13) groter is dan de kritische t-waarde (2,31). De richtingscoëfficiënt van de rechte is verschillend van 0. Het 95% confidentie-interval van het snijpunt met de abscis omvat het punt 0, waardoor de rechte door de oorsprong gaat. Er is een positieve correlatie tussen de concentratie lysozyme en de absorbantie aangezien R gelijk is aan 0,9999. De R^2 bedraagt 0,9998 waardoor 99,98% van de variabiliteit van de absorbantie verklaard kan worden door de relatie die met de concentratie bestaat. De grafische voorstelling van de residuen en de gegevensanalyse worden weergegeven in Bijlage 2.

3.2.3.3. IJklijn albumine

Vanuit een stockoplossing met een concentratie van 2,039 mg/g albumine werd een verdunningsreeks aangemaakt met vijf concentratieniveaus: 0,204 mg/g, 0,603 mg/g, 1,022 mg/g, 1,295 mg/g en 1,490 mg/g. De absorbanties werden bepaald en uitgezet tegenover de respectievelijke concentratie. Een ijklijn werd opgesteld met behulp van 10 punten zoals weergegeven in Figuur 3.10.



Figuur 3.10: Ijkljn van albumine bepaald bij golflengte 278 nm, n = 10.

De afwijkingen zijn homoscedastisch verdeeld aangezien ze niet opeenvolgend groter of kleiner worden bij stijgende concentraties. De maximale afwijking bedraagt 1,11% en is kleiner dan de maximale afwijking van 5%. De t-waarde (223,5361) is groter dan de kritische t-waarde (2,31) waardoor de richtingscoëfficiënt van de ijkljn verschillend is van 0. Aangezien 0 niet binnen het 95% confidentie-interval van het snijpunt met de abscis gelegen is, gaat de ijkljn niet door de oorsprong. Een correlatiecoëfficiënt van 0,9999 geeft een positieve relatie weer tussen de concentratie albumine en de absorbantie. Wanneer de concentratie aan albumine in de oplossing toeneemt, neemt ook de absorbantie hogere waarden aan. De R^2 van 0,9998 geeft weer dat 99,98% van variabiliteit van de absorbantie verklaard kan worden door de relatie die er met de concentratie bestaat. De grafische voorstelling van de residuen en de gegevensanalyse worden weergegeven in Bijlage 3.

3.2.4. Opstellen *Design of Experiments*

In het onderzoek werd gezocht naar de ideale combinatie van parameters om een gereguleerde vrijgave te bekomen van de moleculen natriumfluoresceïne, lysozyme en albumine uit een hydrofiel oculair insert. De experimenten werden opgesteld aan de hand van 2^2 *full factorial designs*. Er werden telkens vier experimenten per molecule *in duplo* uitgevoerd. Ieder experiment bestond uit vier inserten, waarbij een enkele parameter werd gevarieerd. Als variabele parameters werd gekozen voor het wijzigen van de oplaadtijd en het droogpercentage aan HPMC in fase II van het bereidingsproces. Een overzicht van alle parameters is terug te vinden in Tabel 3.2. De variabele parameters werden onderverdeeld in een *upper level* (+) en een *lower level* (-) zoals weergegeven in Tabel 3.3.

Tabel 3.2: Overzicht van de parameters.

Constate Parameters		
Eindconcentratie HPMC (% (m/m))	25	
Eindconcentratie farmacon (% (m/m))	3	
Eindconcentratie glycerol (% (m/m))	1	
Variabele parameters		
Droogpercentage HPMC (% (m/m))	50 (-)	75 (+)
Oplaadtijd (u)	24 (-)	72 (+)

Tabel 3.3: Overzicht variabele parameters *Design of Experiments*.

	Oplaadtijd	Droogpercentage
1	+	+
2	+	-
3	-	+
4	-	-

De data werd geanalyseerd aan de hand van het softwarepakket Statistica[®] 12 (Statsoft, Tulsa, OK, VS). De statistisch significante invloed van de twee parameters werd onderzocht, alsook mogelijke interactie-effecten.

3.2.5. *In vitro* afgifte uit de inserten

Om de *in vitro* afgifte te bepalen werden de inserten uit hun blisterverpakking verwijderd en telkens op dezelfde wijze in een proefbuis gebracht.

Na het plaatsten van de inserten, werd 15 g PBS-oplossing met een temperatuur van 32 °C aan elke proefbuis toegevoegd. Vervolgens werden de proefbuizen in een warmwaterbad bij een temperatuur van 32 °C geplaatst. Een staal met een massa van 2 g werd op welbepaalde tijdstippen uit de proefbuizen genomen en spectrofotometrisch geanalyseerd. Voor natriumfluoresceïne en lysozyme werden na 10, 30, 60, 90, 120, 180, 240, 300, 360, 420 en 480 minuten stalen genomen. Voor albumine gebeurde de staalname na 10, 30, 60, 90, 120, 180, 240, 300, 390 en 460 minuten. Het gepipetteerde hoeveelheid staal werd vervangen door een equivalente hoeveelheid vers PBS medium bij een temperatuur van 32 °C. Zowel voor de staalname, als na het toevoegen van vers PBS medium, werd het medium in de proefbuizen gehomogeniseerd door omzwenken. Door het medium op deze wijze continu te vernieuwen, blijft de concentratie van de moleculen steeds lager dan 10% van de verzadigingsconcentratie waardoor aan *sink* condities wordt voldaan. De concentraties van de genomen stalen werden telkens bepaald door middel van spectrofotometrische analysetechnieken.

Na de laatste staalname werd het insert losgemaakt van de proefbuiswand met behulp van een vortex (Heidolph, Reax 1R, West-Duitsland). Het insert werd overgebracht in een maatbeker en de proefbuis werd nagespoeld met 2 g PBS medium. Door de maatbeker met een magnetische roerstaaf op een roerplaat (VWR™, VMS-C7-2, IKA, Staufen, Duitsland) te brengen bij een snelheid van 130 toeren per minuut werd de resterende hoeveelheid aan farmacon vrijgesteld en vervolgens spectrofotometrisch gemeten.

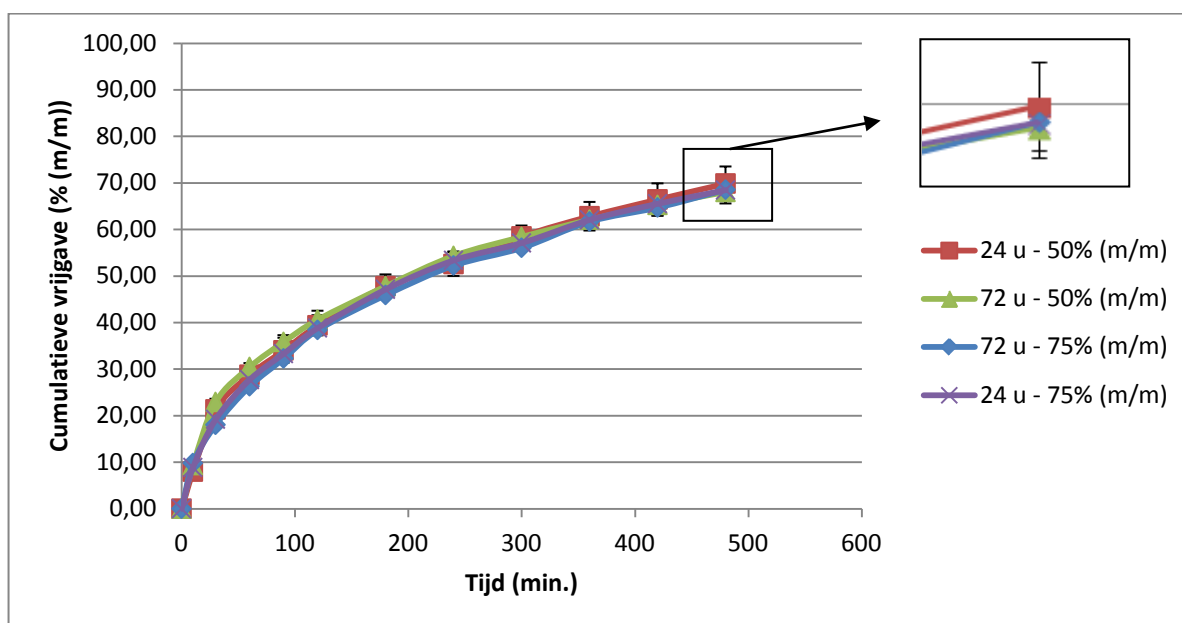
4. RESULTATEN EN BESPREKING

4.1. DATA ANALYSE: *IN VITRO* AFGIFTE

De cumulatieve vrijgave van de moleculen uit het insert werd bepaald in functie van de tijd. Grafieken werden opgesteld en het verloop onderling vergeleken. Eén curve representeert telkens de gemiddelde vrijgave van inserten met een zelfde oplaadtijd en droogpercentage. Statistisch significante verschillen ($p < 0,05$) werden gezocht tussen de totale hoeveelheid farmacon afgegeven na 480 min. (natriumfluoresceïne en lysozyme) of na 460 min. (albumine). De statistische analyses werden uitgevoerd met het softwarepakket Statistica[®] 12.

4.1.1. Cumulatieve vrijgave van natriumfluoresceïne

De verschillende formulaties van inserten opgeladen met natriumfluoresceïne vertonen een gelijkaardig afgifteprofiel. Er wordt bij elke formulatie een gereguleerde afgifte bereikt met een gemiddelde cumulatieve vrijgave van 68,82% (m/m) na 480 min. Wanneer het droogpercentage wordt gewijzigd van 50% (m/m) naar 75% (m/m) of de oplaadtijd van 24 u naar 72 u, wordt er geen significant verschil waargenomen. Natriumfluoresceïne is een kleine molecule (376,3 Da) waardoor het weinig weerstand van het polymeernetwerk ondervindt om zich homogeen in de matrix te verdelen en hieruit te diffunderen. Een grafische voorstelling van de vrijgave uit de HPMC inserten is weergegeven in Figuur 4.1. In Tabel 4.1 wordt een overzicht van de verschillende parameters en hun effect op de vrijgave van natriumfluoresceïne samengevat weergegeven.



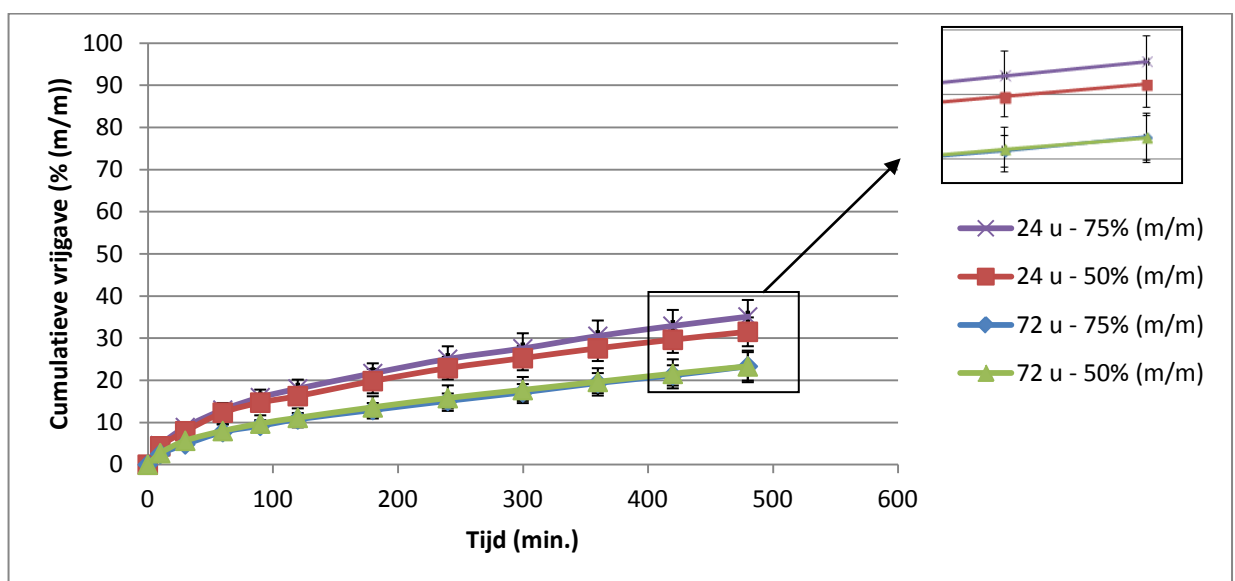
Figuur 4.1: Cumulatieve vrijgave van natriumfluoresceïne uit HPMC inserten. Het percentage in de legende duidt op het droogpercentage aan HPMC in fase II van de bereidingsmethode. De tijd aangegeven in de legende is de oplaadtijd. Per curve is $n = 8$.

Tabel 4.1: Overzicht van de verschillende parameters en het effect op de vrijgave van natriumfluoresceïne uit HPMC inserten. Effect (% (m/m)) geeft het verschil weer in procentuele afgifte na 480 min. wanneer de parameter wordt veranderd van de *lower* level (-) naar de *upper* level (+). De p-waarde geeft de significantie weer van de invloed van de betreffende parameter. De invloed is significant indien $p < 0,05$.

	Effect (% (m/m))	p-waarde
Oplaadtijd	0,59758	0,642991
Droogpercentage	-1,91096	0,145201

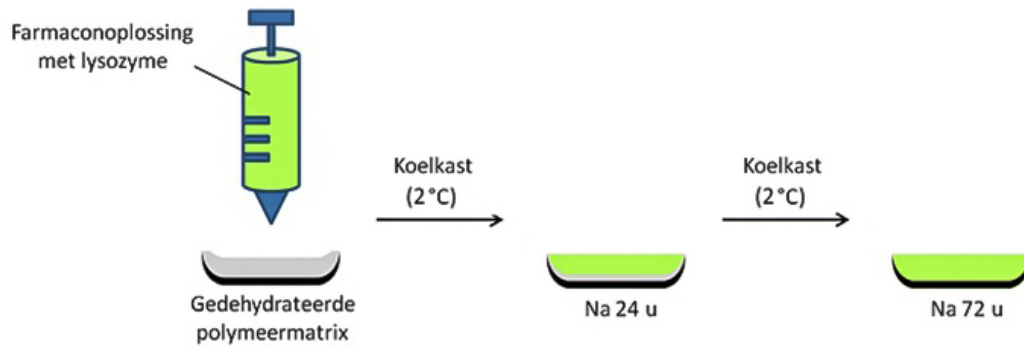
4.1.2. Cumulatieve vrijgave van lysozyme

De verschillende formulaties stellen lysozyme vertraagd vrij uit het insert volgens een gelijkaardig afgifteprofiel. Het verloop wordt grafisch weergegeven in Figuur 4.2.



Figuur 4.2: Cumulatieve vrijgave van lysozyme uit HPMC inserten. Het percentage in de legende duidt op het droogpercentage aan HPMC in fase II van de bereidingsmethode. De tijd aangegeven in de legende is de oplaadtijd. Per curve is $n = 8$.

Er wordt geen significante invloed waargenomen van het droogpercentage op de cumulatieve vrijgave van het eiwit, maar wel een invloed van de oplaadtijd. De oplaadtijd verlengen van 24 u naar 72 u leidt tot een significante daling ($p < 0,05$) van de afgifte van lysozyme met gemiddeld 9,98% (m/m) na 480 min. De diffusie in de polymeermatrix van lysozyme bleek na 24 u nog niet volledig voltooid. Het eiwit zal zich meer aan de buitenzijde van het insert bevinden dan in de kern. Het verlengen van de oplaadtijd tot 72 u heeft een gunstig effect op de penetratie van het eiwit in de matrix. Het verloop van het diffusieproces wordt weergegeven in Figuur 4.3. In Tabel 4.2 wordt een overzicht van de verschillende parameters en hun effect op de vrijgave van lysozyme samengevat weergegeven.



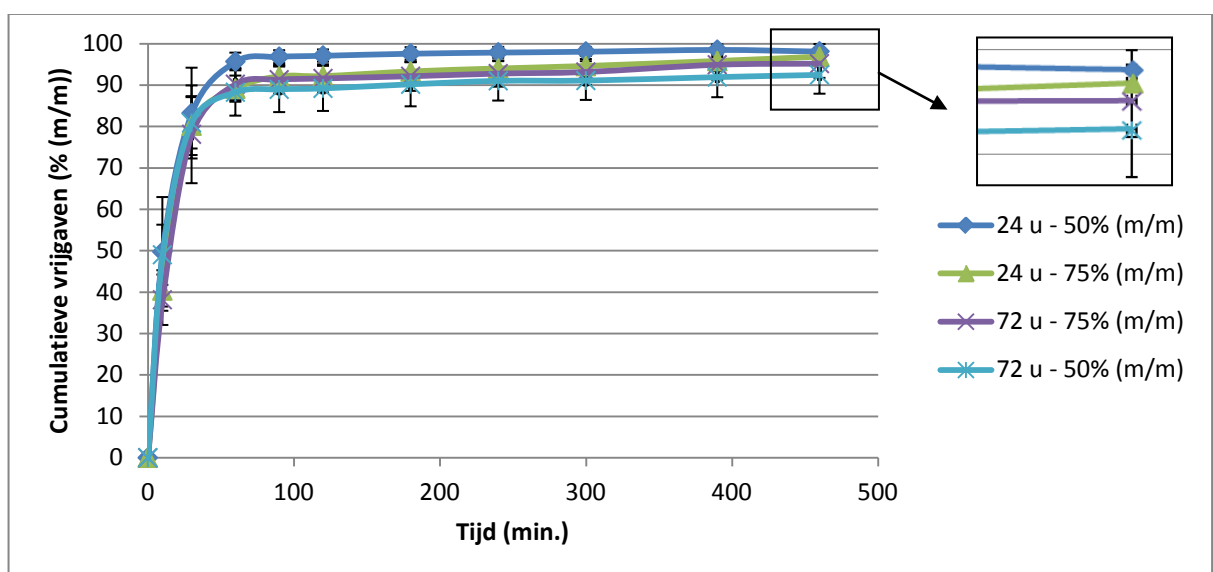
Figuur 4.3: Invloed van de oplaadtijd op het oplaadproces van lysozyme in oculaire inserten.

Tabel 4.2: Overzicht van de verschillende parameters en het effect op de vrijgave van lysozyme uit HPMC inserten. Effect (% (m/m)) geeft het verschil weer in procentuele afgifte na 480 min. wanneer de parameter wordt veranderd van de *lower level* (-) naar de *upper level* (+). De p-waarde geeft de significantie weer van de invloed van de betreffende parameter. De invloed is significant indien $p < 0,05$.

	Effect (% (m/m))	p-waarde
Oplaadtijd	-9,98642	0,000000
Droogpercentage	1,78549	0,176786

4.1.3. Cumulatieve afgifte van albumine

De cumulatieve vrijgave van albumine uit de verschillende formulaties verloopt niet volgens een gereguleerde afgifte. Na 10 min. bedraagt de cumulatieve vrijgave gemiddeld 45% (m/m). Na 60 min. is ze gestegen tot gemiddeld 80% (m/m). Deze afgiftesnelheid duidt op een *immediate release* van albumine uit het insert in plaats van een *slow-release*. De grafische weergave van de verschillende formulaties wordt weergegeven in Figuur 4.4.



Figuur 4.4: Cumulatieve vrijgave van albumine uit HPMC inserten. Het percentage in de legende duidt op het droogpercentage aan HPMC in fase II van de bereidingsmethode. De tijd aangegeven in de legende is de oplaadtijd. Per curve is $n = 8$.

Zowel de oplaadtijd verlengen van 24 u naar 72 u, als het droogpercentage verhogen van 50% (m/m) naar 75% (m/m), zorgen niet voor een vertraagde vrijstelling van albumine uit de inserten. Wel bestaat er een significante invloed van de oplaadtijd op de totale vrijgave na 460 min. Door de oplaadtijd te verlengen naar 72 u daalt de cumulatieve vrijgave met gemiddeld 3,30% (m/m) na 460 min. Een overzicht van deze resultaten wordt weergegeven in Tabel 4.3.

Tabel 4.3: Overzicht van de verschillende parameters en het effect op de vrijgave van albumine uit HPMC inserten. Effect (% (m/m)) geeft het verschil weer in procentuele afgifte na 480 min. wanneer de parameter wordt veranderd van de *lower level* (-) naar de *upper level* (+). De p-waarde geeft de significantie weer van de invloed van de betreffende parameter. De invloed is significant indien $p < 0,05$.

	Effect (% (m/m))	p-waarde
Oplaadtijd	-3,29999	0,023963
Droogpercentage	1,09899	0,431779

De grootte en structuur van het eiwit (66 430 Da) liggen aan de basis van de beperkte diffusie van albumine in het insert. Een oplaadtijd van 24 u, noch van 72 u is voldoende opdat het eiwit zich homogeen zou verspreiden in de matrix. Na 72 u is slechts een kleine hoeveelheid van het albumine gediffundeerd in het insert, terwijl de grootste hoeveelheid zich nog steeds aan het oppervlak bevindt. Wanneer het insert in PBS medium wordt gebracht, zullen de moleculen aan het oppervlak ogenblikkelijk worden vrijgesteld. Albumine dat wel in het insert is gediffundeerd en in de matrix is ingebed, kan niet binnen een tijdsperiode van 460 min. worden vrijgesteld. Het indringen van solventmoleculen in het insert leidt tot het opzwellen van de matrix met een toename van de diffusieafstand voor albuminemoleculen als gevolg.

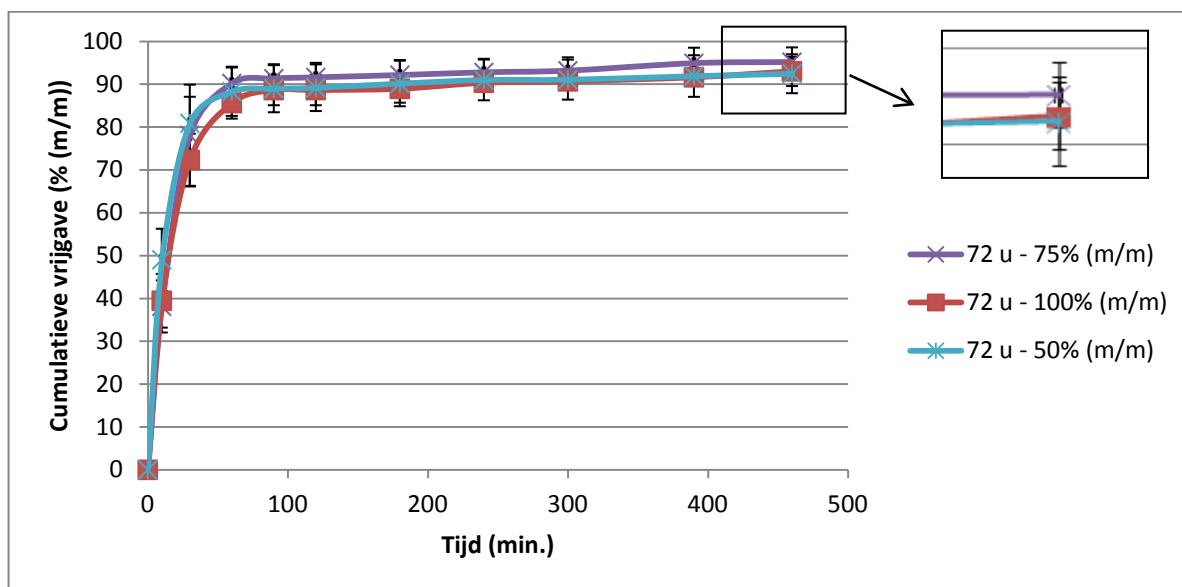
4.1.3.1. Optimalisatie van de cumulatieve vrijgave van albumine

In een eerste poging om albumine vertraagd vrij te stellen, werd de dehydratiegraad verhoogd tot een theoretisch droogpercentage van 100% (m/m) bij een oplaadtijd van 72 u. Watermoleculen in de farmaconoplossing zullen gezien hun kleine hydrodynamische diameter sneller in de matrix indringen dan het albumine, waardoor een oververzadiging van de relatief grote albuminemoleculen aan het oppervlak van de matrix zal ontstaan.

Een dehydratiegraad van 100% (m/m) vereist het toevoegen van een grotere hoeveelheid solvent om een eindpercentage van 25% (m/m) HPMC te bekomen. Hierdoor is de concentratie aan albumine in de farmaconoplossing lager dan deze bij lagere droogpercentages, wat betekent dat meer solventmoleculen beschikbaar zijn om de

albuminemoleculen in oplossing te houden. Diffusie in de matrix is immers enkel mogelijk wanneer moleculen opgelost zijn.

Een dehydratatiegraad van 100% (m/m) veroorzaakt eveneens een maximale volumedaling met een maximaal diffusieoppervlak beschikbaar voor de farmaconoplossing. Volgens de eerste wet van Fick (Vergelijking 3.1) zal de diffusie van albumine in de gedehydrateerde matrix versnellen. De resultaten worden weergegeven in Figuur 4.5.



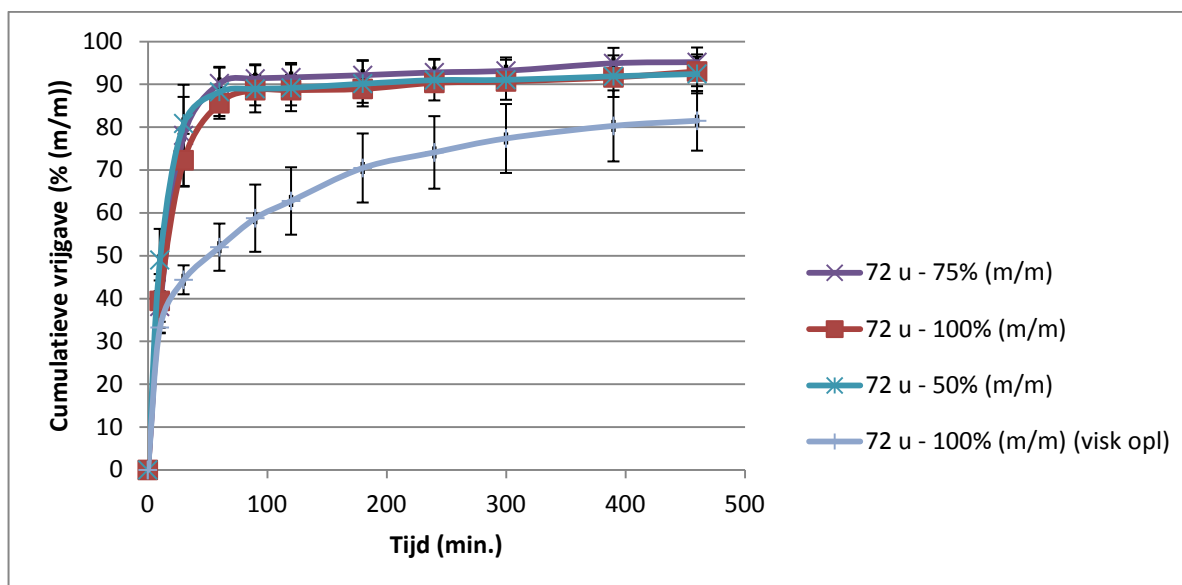
Figuur 4.5: Cumulatieve vrijgave van albumine uit HPMC inserten. Het percentage in de legende duidt op het droogpercentage aan HPMC in fase II van de bereidingsmethode. De tijd aangegeven in de legende is de oplaadtijd. Voor curve met percentage 75% (m/m) en 50% (m/m) is $n = 8$, voor curve 100% (m/m) is $n = 4$.

De wijzigingen resulteren echter niet in een verbetering van het afgifteprofiel ($p < 0,05$). De cumulatieve vrijgave van albumine verloopt op gelijkaardige wijze als de overige formulaties bij een oplaadtijd van 72 u.

In een volgende poging om albumine in de matrix te verdelen, werd de samenstelling van de farmaconoplossing gewijzigd. Door het toevoegen van HPMC in een concentratie van 1% (m/m) aan de farmaconoplossing, worden de albuminemoleculen reeds in deze oplossing omringd door HPMC moleculen. Wanneer de oplossing op de gedehydrateerde polymaatrix wordt gebracht, zal het water uit de oplossing worden onttrokken door de matrix. De concentratie van de HPMC moleculen die de albuminemoleculen omringen stijgt, waardoor de eiwitten omgeven worden door een dicht polymaernetwerk.

Een experiment werd opgesteld met de viskeuze farmaconoplossing bij een theoretische dehydratatiegraad van 100% (m/m) en een oplaadtijd van 72 u. Zoals in Figuur 4.6 wordt

weergegeven, geeft de nieuwe samenstelling van de farmaconoplossing een significante verbetering van de afgifte.



Figuur 4.6: Cumulatieve vrijgave van albumine uit HPMC inserten. Het percentage in de legende duidt op het droogpercentage aan HPMC in fase II van de bereidingsmethode. De tijd aangegeven in de legende is de oplaadtijd. Visk opl = gebruik van een viskeuze farmaconoplossing tijdens de rehydratiefase. Voor de curve met droogpercentage 75% (m/m) en 50% (m/m) is $n = 8$, voor curves met droogpercentage 100% (m/m) is $n = 4$.

De *immediate release* van albumine wordt, in de inserten bereid met de viskeuze farmaconoplossing, gehalveerd tegenover de overige formulaties. De vrijgave van de inserten wordt vertraagd na een tijdspanne van 30 min., terwijl de *immediate release* van de klassieke formulaties doorgaat tot 60 min. In deze tijdspanne wordt respectievelijk 44,37% (m/m) en 85,18% (m/m) van de totale hoeveelheid albumine vrijgesteld.

Gedurende de eerste 10 min. vertoont de afgifte van de inserten bereid met de viskeuze oplossing een gelijkaardig verloop, maar met een statistisch significant verschil in vrijgavehoeveelheid tegenover de overige formulaties. De cumulatieve vrijgave bedraagt 42,74% (m/m) na 10 min. voor inserten bereid met de klassieke farmaconoplossing, tegenover 33,24% (m/m) voor inserten bereid met de viskeuze oplossing. Statistisch significante verschillen worden eveneens waargenomen bij de overige tijdstippen. Een overzicht van de resultaten van de statistische vergelijkingen op de belangrijkste tijdstippen wordt weergegeven in Tabel 4.4.

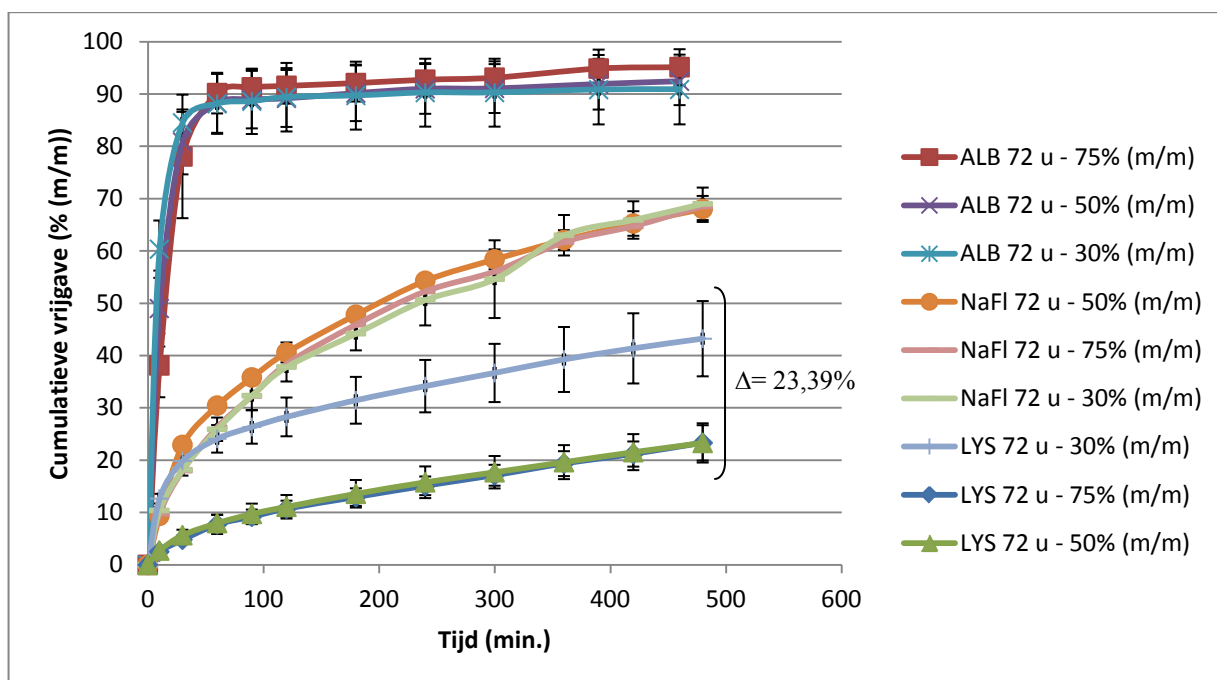
Tabel 4.4: Overzicht van de resultaten van de vergelijking tussen het bereidingsproces zonder viskeuze farmaconoplossing en het bereidingsproces met viskeuze farmaconoplossing. De p-waarde geeft de significantie weer. De gemiddelde vrijgave is significant verschillend indien de p-waarde < 0,05.

Tijd	Gemiddelde vrijgave		p-waarde	Verschil
	Zonder viskeuze farmaconoplossing	Met viskeuze farmaconoplossing		
Na 10 min.	42,74% (m/m)	33,24% (m/m)	0,002426	9,50% (m/m)
Na 30 min.	78,04% (m/m)	44,37% (m/m)	0,000000	33,66% (m/m)
Na 60 min.	85,18% (m/m)	51,99% (m/m)	0,000000	36,50% (m/m)
Na 460 min.	93,96% (m/m)	81,48% (m/m)	0,000000	15,15% (m/m)

4.1.4. Samenvatting van de resultaten

De gekozen parameters (oplaadtijd en droogpercentage) van de *design of experiments* hebben weinig invloed op de vrijgave van natriumfluoresceïne en albumine uit HPMC inserten. In het geval van natriumfluoresceïne en lysozyme wordt bij elke formulatie een gereguleerde afgifte van het molecuule bekomen. Bij albumine wordt dit niet gerealiseerd en is er een snelle vrijgave (na 60 min.) van een grote hoeveelheid eiwit ($\pm 85\%$ (m/m)). Voor dit eiwit kan een beperkte gereguleerde afgifte verwezenlijkt worden door het wijzigen van de samenstelling van de farmaconoplossing. Bij natriumfluoresceïne is geen effect op de cumulatieve vrijgave waar te nemen wanneer een van de twee parameters wordt veranderd. Bij inserten opgeladen met albumine en lysozyme wordt er enkel een invloed van de oplaadtijd waargenomen.

Een invloed van het droogpercentage (50-75% (m/m)) op het vrijgaveverloop lijkt op het eerste zicht afwezig op basis van het opgestelde *design*. Inserten met een droogpercentage van 30% (m/m) bij een oplaadtijd van 72 u werden bereid voor de drie gekozen moleculen. De resultaten worden grafisch voorgesteld in Figuur 4.7.



Figuur 4.7: Cumulatieve vrijgave van albumine, natriumfluoresceïne en lysozyme uit HPMC inserten. Het percentage in de legende duidt op het droogpercentage aan HPMC in fase II van de bereidingsmethode. De tijd aangegeven in de legende is de oplaadtijd. ALB = albumine, NaFl = natriumfluoresceïne, LYS = lysozyme, Δ = verschil in percentage lysozyme na 480 min. tussen een droogpercentage van 30% (m/m) enerzijds en 50/75% (m/m) anderzijds. Voor de curven met droogpercentage 75% (m/m) en 50% (m/m) is $n = 8$, voor curves met droogpercentage 30% (m/m) is $n = 4$.

Het droogpercentage heeft geen invloed op de vrijgave van natriumfluoresceïne of albumine na respectievelijk 480 min. en 460 min. De totale vrijgave bij een droogpercentage van 30% (m/m) is dezelfde als de totale vrijgave voor formulaties bij de overige droogpercentages (50-75% (m/m)) na een oplaadproces van 72 u. Voor natriumfluoresceïne wordt een gereguleerde afgifte verwezenlijkt bij een droogpercentage van 30% (m/m) en heeft een hogere dehydratatiegraad geen verdere invloed. De formulaties opgeladen met albumine vertonen geen gereguleerde afgifte.

Lysozyme ondervindt een invloed van de wijziging van het droogpercentage. Een stijging van het droogpercentage van 30% (m/m) naar 50/75% (m/m) geeft een gemiddelde vermindering van 23,31% (m/m) van de cumulatieve afgifte na 480 min. Een droogpercentage van 50% (m/m) bij 72 u blijkt voldoende om een preparaat met gereguleerde afgifte te bekomen van lysozyme. Lage droogpercentages (30% (m/m)) hebben een nadelige invloed op de diffusie van het eiwit in de polymeermatrix, wegens de aanwezigheid van minder solventmoleculen in de farmaconoplossing in vergelijking met de formulaties met hoge droogpercentages.

4.2. VRIJGAVEKINETIEK

De vrijgave van moleculen uit een insert kan zowel gebeuren door middel van diffusie als door middel van erosie van bioerodeerbare of biodegradeerbare polymeermatrices.⁶⁰

Moleculen volgen een eerste orde kinetiek wanneer ze worden vrijgesteld door middel van diffusie. Bij een eerste orde kinetiek, weergegeven in Vergelijking 4.1, is de wijze van vrijgave afhankelijk van de concentratie van de farmaconmoleculen in de polymere matrix. De afgiftehoeveelheid van de moleculen daalt in functie van de tijd.⁶¹

$$\text{Log}Q_t = \text{Log}Q_0 + Kt/2,303 \quad \text{Vergelijking 4.1}$$

Formule eerste orde kinetiek waarbij Q_0 = de initiële hoeveelheid farmacon in de polymeermatrix, Q_t = de cumulatieve afgifte van het molecule na tijd "t", K = de eerste orde constante en t = de tijd verstreken (in uren).

Moleculen die worden vrijgesteld door middel van erosie volgen een nulde orde model kinetiek. Bij dit model is de wijze van vrijgave onafhankelijk van de concentratie van farmaconmoleculen in de matrix. De mathematische formule is weergegeven in Vergelijking 4.2.⁶¹

$$Q_t = Q_0 + K_0t \quad \text{Vergelijking 4.2}$$

Formule nulde orde kinetiek waarbij Q_t = de cumulatieve afgifte van de molecule na tijd "t", Q_0 = de initiële hoeveelheid farmacon in de polymeermatrix, K_0 = de nulde orde constante en t = de tijd verstreken (in uren).

De meeste moleculen worden uit een insert vrijgesteld door een superpositie van beide processen. Het *power law* model is een semi-empirische vergelijking, opgesteld door Korsmeyer-Peppas om de afgiftekinetiek van de moleculen uit een polymeermatrix met een welbepaalde geometrie te beschrijven. De formule is weergegeven in Vergelijking 4.3.^{60,62}

$$F = \left(\frac{M_t}{M}\right) = K_m t^n \quad \text{Vergelijking 4.3}$$

Power Law model waarbij F = de fractie farmacon vrijgesteld na tijd "t", M_t = de hoeveelheid farmacon vrijgegeven na tijd t , M = de totale hoeveelheid farmacon opgeladen in de polymeermatrix, K_m = de kinetische constante, n = diffusie of vrijgave exponent en t = de tijd verstreken (in uren).

Uit de lineaire regressie van $\log \frac{M_t}{M}$ tegenover $\log t$ kan "n" worden bepaald als de richtingscoëfficiënt van de best passende rechte. Dit is voorgesteld in Vergelijking 4.4.

$$\text{Log} \left(\frac{M_t}{M}\right) = n \log t + \log K_m \quad \text{Vergelijking 4.4}$$

Voor cilindrische inserten zal een farmacon via diffusie worden vrijgesteld indien de n gelijk is aan 0,45. Indien de richtingscoëfficiënt gelijk is aan 0,89 duidt dit op een vrijgave door middel van erosie van de polymeermatrix. Waarden voor " n " die tussen 0,45 en 0,89 bevinden, duiden op een vrijgave die zowel door diffusie van de moleculen als door erosie van de polymeermatrix wordt gekarakteriseerd.^{60,62}

De vrijgavekinetiek van de formulaties uit het *design of experiments* werd nagegaan. Het model met de hoogste determinatiecoëfficiënt R^2 , indicatief voor rechte met de beste *fit*, werd toegepast.^{60,62}

4.2.1. Vrijgavekinetiek van natriumfluoresceïne

Inserten geformuleerd met natriumfluoresceïne werden allen gecombineerd daar geen verschil in vrijgave tussen de curves onderling werd vastgesteld. De R^2 van het wiskundig model van Korsmeyer-Peppas bedraagt 0,9836 wat de hoogste correlatie weergeeft van de modellen. De richtingscoëfficiënt is 0,5036 waardoor de vrijgave zowel via diffusie als via erosie verloopt. Echter, de waarde van n benadert 0,45 wat indicatief is voor een eerste orde kinetiek. De vrijgave van natriumfluoresceïne zal bijgevolg hoofdzakelijk verlopen volgen de diffusie van de eerste wet van Fick. De grafische weergave van de wiskundige modellen worden weergegeven in Bijlage 4.

4.2.2. Vrijgavekinetiek van lysozyme

Inserten opgeladen met lysozyme en geformuleerd met eenzelfde oplaadtijd werden gecombineerd, aangezien er geen verschil vastgesteld werd tussen de cumulatieve afgifte van deze formulaties. Het Korsmeyer-Peppas model geeft de beste *fit* weer voor zowel de inserten bereid met een oplaadtijd van 24 u als de inserten bereid met een oplaadtijd van 72 u. Hoewel de vrijgave in beide gevallen, met een n van respectievelijk 0,5086 en 0,5461, via een gecombineerd mechanisme verloopt, kan de globale reactiekinetiek als overwegend eerste orde beschouwd worden. Echter, bij een oplaadtijd van 72 u wordt lysozyme meer via een nulde orde kinetiek vrijgesteld dan bij een oplaadtijd van 24 u. Een oplaadtijd van 72 u staat de moleculen toe beter in de matrix te penetreren. Bijgevolg zal de diffusieafstand en de weerstand van het polymeernetwerk op de farmaconmoleculen vergroten en de diffusiesnelheid uit het insert dalen. De grafische weergave van de wiskundige modellen worden weergegeven in Bijlage 5.

5. BESLUIT

De innovatieve bereidingsmethode werd geëvalueerd met drie moleculen met een verschillende moleculaire massa: natriumfluoresceïne < lysozyme < albumine. Er werd gezocht naar de ideale combinatie van parameters om een gereguleerde vrijgave van deze moleculen uit oplosbare inserten te bekomen, rekening houdend met de stabiliteitsvereisten voor proteïnen. Een *design of experiments* werd opgesteld met als variabele parameters het droogpercentage (50% (m/m) en 75% (m/m)) en de oplaadtijd (24 u en 72 u) van het bereidingsproces.

De gekozen parameters hebben geen invloed op het afgifteprofiel van de inserten geformuleerd met natriumfluoresceïne. Natriumfluoresceïne kan probleemloos in de polymeermatrix diffunderen en vertraagd vrijgesteld worden uit het insert. Een experiment wees uit dat een droogpercentage van 30% (m/m) bij een oplaadtijd van 72 u reeds voldoende is om een gereguleerde afgiftepreparaat te bereiden.

De oplaadtijd heeft een statistisch significante invloed op het afgifteprofiel bij inserten geformuleerd met lysozyme. Een vermindering van de cumulatieve vrijgave werd bekomen wanneer de duur van het oplaadproces werd verlengd van 24 u naar 72 u. De droogpercentages (50-75% (m/m)) uit het *design of experiments* hebben echter geen invloed op het vrijgaveprofiel van lysozyme. Indien een laag droogpercentage (30% (m/m)) werd gebruikt, kon wel een nadelige invloed op het vrijgaveverloop van het eiwit worden aangetoond.

Albumine diffundeert slechts beperkt in de polymeermatrix. Er is een geringe invloed van de oplaadtijd op de cumulatieve vrijgave waarneembaar. Variatie van de droogpercentages heeft geen significant effect in de opgezette experimenten. Een insert met een beperkte gereguleerde afgifte kon worden bereid wanneer de samenstelling van de farmaconoplossing werd gewijzigd.

De innovatieve bereidingsprocedure laat de formulatie van inserten met een gereguleerde afgifte toe. Voor moleculen met een hoge moleculaire massa zoals albumine is verdere optimalisatie van het bereidingsproces vereist.

6. TOEKOMSTPERSPECTIEVEN

Een verdere optimalisatie van het bereidingsproces is aangewezen voor moleculen met een hoge molecuulair massa zoals albumine.

- Het gebruik van een viskeuze farmaconoplossing tijdens het bereidingsproces dient verder te worden onderzocht. Het percentage aan HPMC in de oplossing kan worden verhoogd om na te gaan hoe dit de afgifte van moleculen beïnvloedt.
- Aangezien de oplaadtijd een invloed heeft bij de inserten geformuleerd met lysozyme en albumine, kan ze verder worden verlengd al dan niet gecombineerd met het gebruik van een viskeuze farmaconoplossing.

Het bereidingsproces mag de stabiliteit van de moleculen tijdens verwerking niet nadelig beïnvloeden.

- Om de stabiliteit te onderzoeken van moleculen na het bereidingsproces, vormt lysozyme het ideale modelproteïne. Het eiwit veroorzaakt lysis van gram positieve bacteriën waardoor het uitvoeren van activiteitstudies mogelijk wordt. De kiem *Micrococcus Luteus* kan worden gebruikt bij turbidimetrie. De daling in absorbantie na het toedienen van lysozyme aan een bacteriële suspensie van de kiem kan geanalyseerd worden met een spectrofotometer.

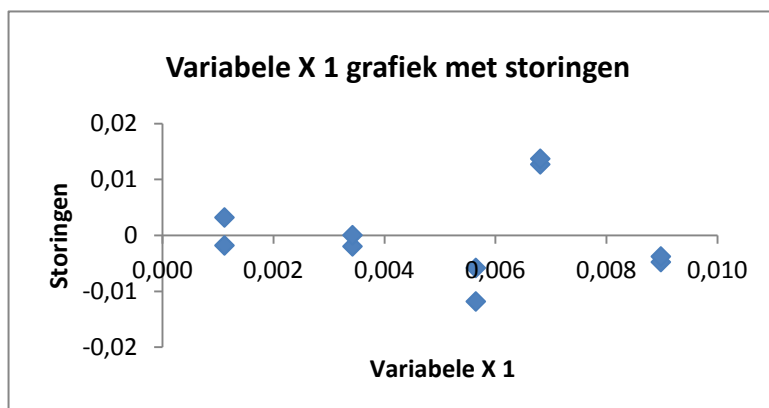
Volgens het hoofdstuk *Eye preparations* van de Europese Farmacopee moeten oculaire preparaten steriel zijn.

- Om dit te verwezenlijken kan een steriel productieproces worden opgesteld. De gebruikte sterilisatiemethode wordt gevalideerd en de invloed op het insert en de verwerkte moleculen zal worden nagegaan. De sterilisatiemethode mag de stabiliteit van het insert en de farmaca niet nadelig beïnvloeden.

Om oculair toepasbaar te zijn moeten de afmetingen van het insert geminiaturiseerd worden. Het huidige formaat van de inserten is ongeschikt voor oculair gebruik. Verder kan een formulatie van een therapeutisch bruikbaar molecule zoals het anti-VEGF eiwit ranibizumab worden opgesteld. Het effect op corneale neovascularisatie of leeftijdsafhankelijke maculadegeneratie zou met deze formulatie kunnen worden onderzocht bij een *in vivo* diermodel.

7. BIJLAGEN

Bijlage 1: Regressie-analyse van de ijklijn van natriumfluoresceïne.



Variantie-analyse						
	Coëfficiënten	Standaardfout	T- statistische gegevens	P-waarde	Laagste 95%	Hoogste 95%
Snijpunt	-0,01563	0,005793362	-2,697964468	0,02716	-0,02899	-0,00227
Variabele X 1	109,7227	0,988285085	111,0233545	4,84E-14	107,4437	112,0017

Berekening kritische t-waarde: $t_{(0,05; n-2)}$ waarbij n = aantal metingen (10) \rightarrow $t_{\text{inv}}(0,05; 8) = 2,30600413$

Storingen		
Waarneming	Voorspelde Y	Storingen
1	0,106769	0,003230969
2	0,106769	-0,001769031
3	0,359936	-0,001936072
4	0,359936	6,39275E-05
5	0,603787	-0,011786644
6	0,603787	-0,005786644
7	0,731268	0,012732214
8	0,731268	0,013732214
9	0,96974	-0,004740466
10	0,96974	-0,003740466

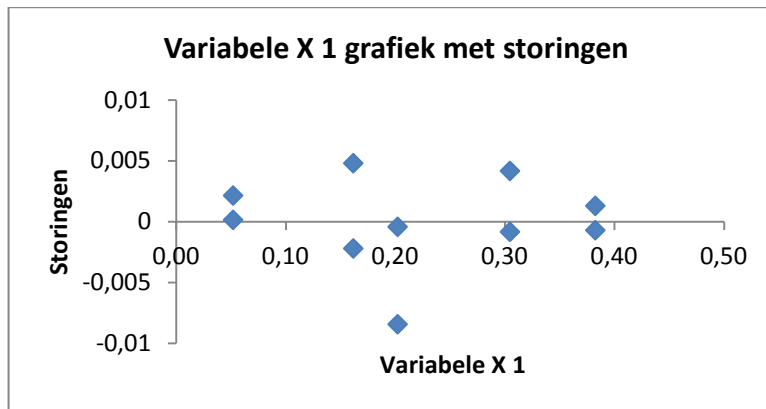
Maximale absolute afwijking = 0,0013732214

Gemiddelde absorptie middelste concentratie = 0,595

Maximale afwijking = $\frac{0,0013732214}{0,595} = 2,31\%$

Gegevens voor de regressie	
Meervoudige correlatiecoëfficiënt R	0,999676
R ²	0,999351
Aangepaste kleinste kwadraat	0,99927
Standaardfout	0,008492
Waarnemingen	10

Bijlage 2: Regressie-analyse van de ijklijn van lysozyme.



<i>Variantie-analyse</i>						
	<i>Coëfficiënten</i>	<i>Standaardfout</i>	<i>T- statistische gegevens</i>	<i>P-waarde</i>	<i>Laagste 95%</i>	<i>Hoogste 95%</i>
Snijpunt	-0,004205732	0,002701415	-1,556862512	0,158116426	-0,010435206	0,002023742
Variabele X 1	2,500548126	0,010865599	230,1343948	1,42275E-16	2,475492009	2,525604243

Berekening kritische t-waarde: $t_{(0,05; n-2)}$ waarbij $n =$ aantal metingen (10) $\rightarrow t.\text{inv}(0,05; 8) = 2,30600413$

<i>Storingen</i>		
<i>Waarneming</i>	<i>Voorspelde Y</i>	<i>Storingen</i>
1	0,125850713	0,002149287
2	0,125850713	0,000149287
3	0,400197781	-0,002197781
4	0,400197781	0,004802219
5	0,501420844	-0,008420844
6	0,501420844	-0,000420844
7	0,757830835	0,004169165
8	0,757830835	-0,000830835
9	0,952699827	0,001300173
10	0,952699827	-0,000699827

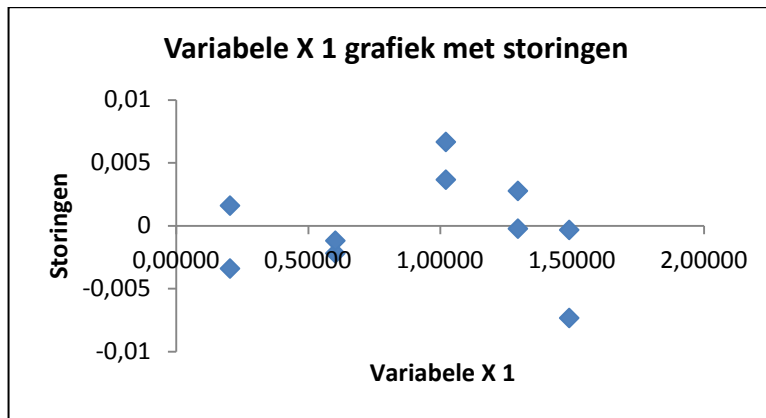
Maximale absolute afwijking = 0,008420844

Gemiddelde absorbantie middelste concentratie = 0,497

Maximale afwijking = $\frac{0,008420844}{0,497} = 1,69\%$

<i>Gegevens voor de regressie</i>	
Meervoudige correlatiecoëfficiënt R	0,999924482
R ²	0,999848971
Aangepaste kleinste kwadraat	0,999830092
Standaardfout	0,003934994
Waarnemingen	10

Bijlage 3: Regressie-analyse van de ijklijn van lysozyme.



<i>Variantie-analyse</i>						
	<i>Coëfficiënten</i>	<i>Standaardfout</i>	<i>T- statistische gegevens</i>	<i>P-waarde</i>	<i>Laagste 95%</i>	<i>Hoogste 95%</i>
Snijpunt	0,009102	0,002929	3,107304	0,014505	0,002347	0,015858
Variabele X 1	0,633226	0,002833	223,5361	1,8E-16	0,626694	0,639759

Berekening kritische t-waarde: $t_{(0,05; n-2)}$ waarbij n = aantal metingen (10) \rightarrow $t_{\text{inv}}(0,05; 8) = 2,30600413$

<i>Storingen</i>		
<i>Waarneming</i>	<i>Voorspelde Y</i>	<i>Storingen</i>
1	0,138402	-0,0034
2	0,138402	0,001598
3	0,391192	-0,00219
4	0,391192	-0,00119
5	0,65634	0,00366
6	0,65634	0,00666
7	0,829233	-0,00023
8	0,829233	0,002767
9	0,952334	-0,00733
10	0,952334	-0,00033

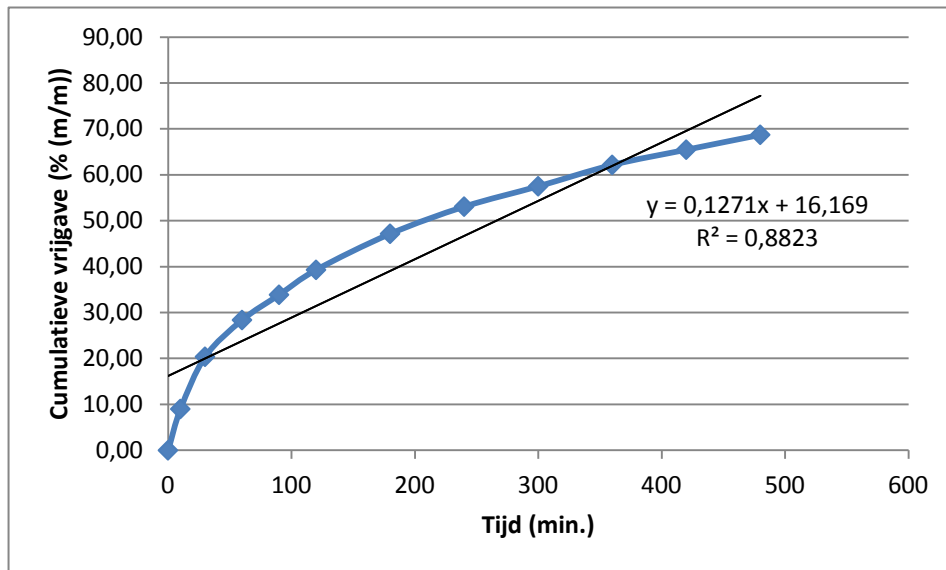
Maximale absolute afwijking = 0,007334

Gemiddelde absorbantie middelste concentratie = 0,662

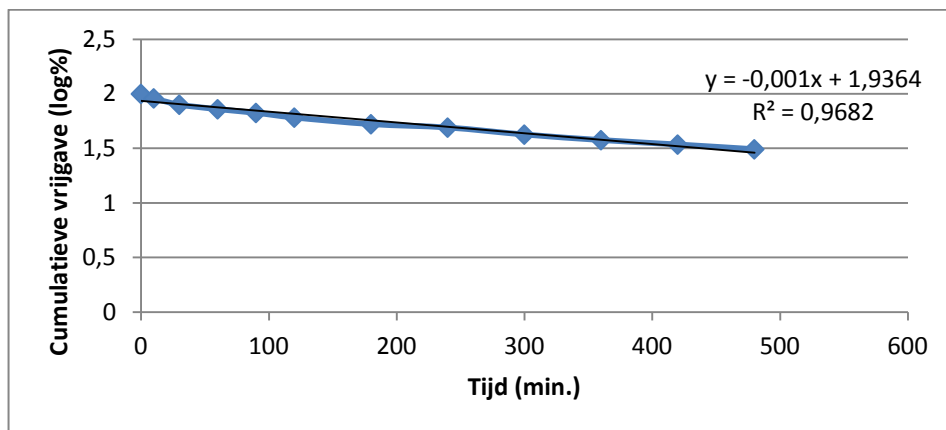
Maximale afwijking = $\frac{0,007334}{0,662} = 1,11\%$

<i>Gegevens voor de regressie</i>	
Meervoudige correlatiecoëfficiënt R	0,99992
R ²	0,99984
Aangepaste kleinste kwadraat	0,99982
Standaardfout	0,004179
Waarnemingen	10

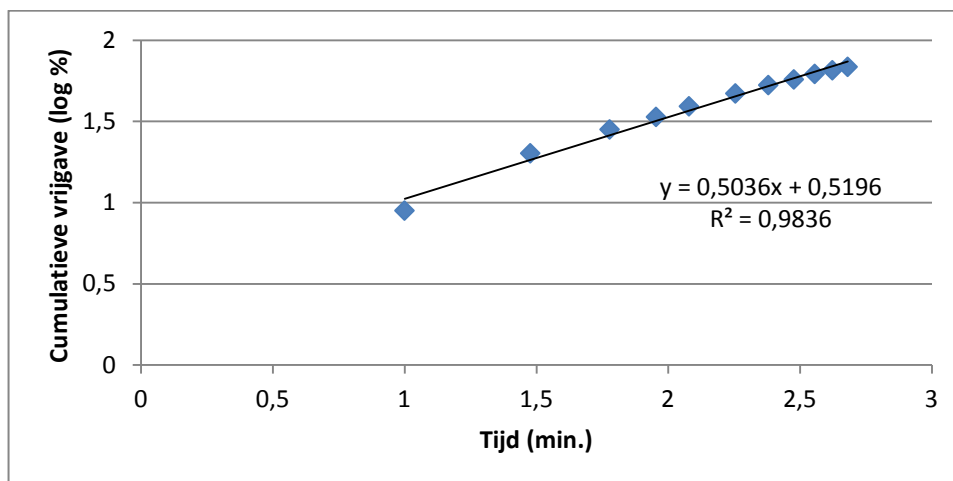
Bijlage 4: Wiskundige modellen voor de bepaling van de vrijgavekinetiek van natriumfluoresceïne. Het model met de beste *fit* wordt toegepast.



Nulde orde vrijgave van natriumfluoresceïne uit oculaire inserten.

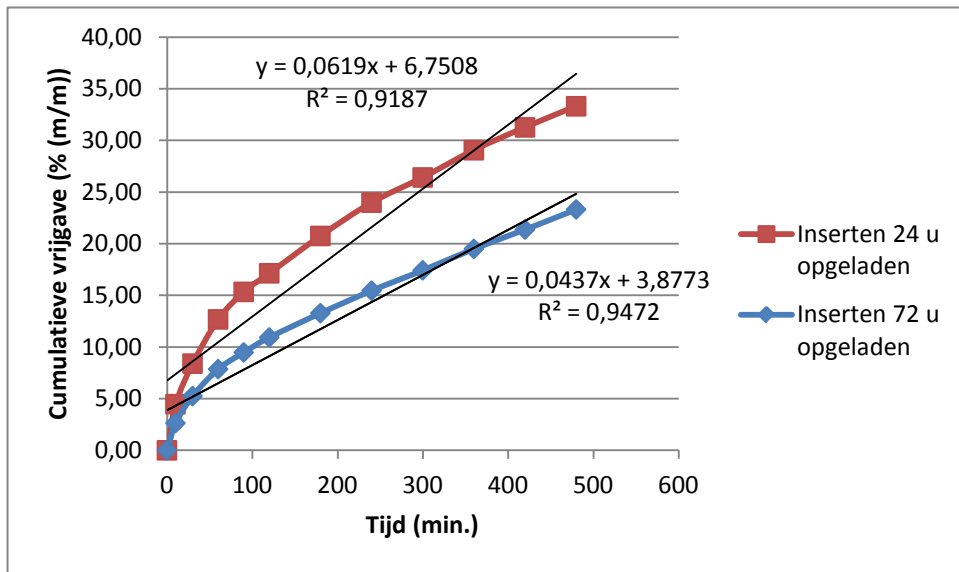


Eerste orde vrijgave van natriumfluoresceïne uit oculaire inserten.

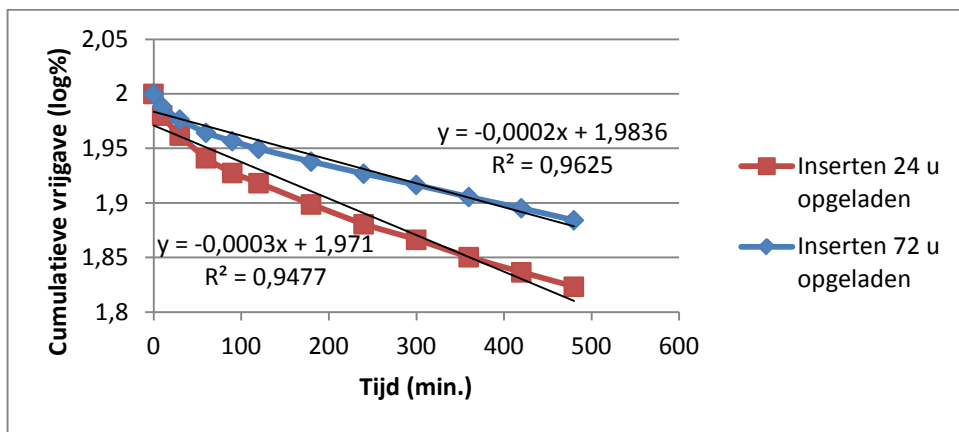


Vrijgave van natriumfluoresceïne volgens het Korsmeyer-Peppas model.

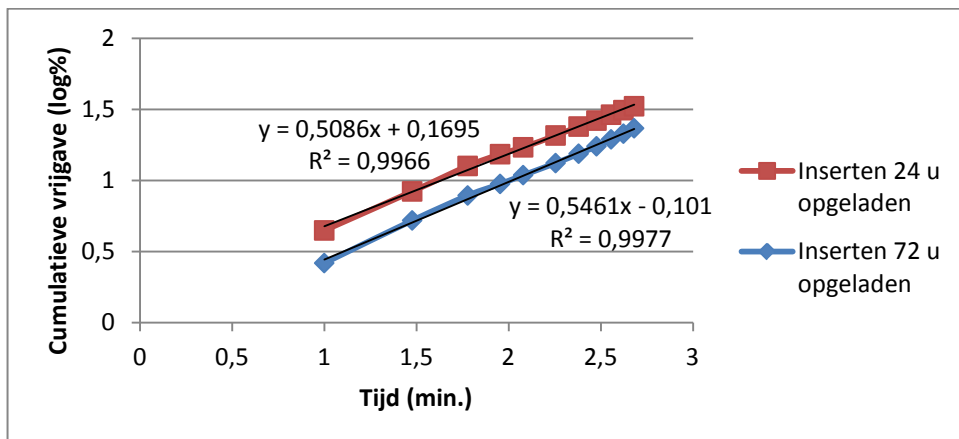
Bijlage 5: Wiskundige modellen voor de bepaling van de vrijgavekinetiek van lysozyme. Het model met de beste *fit* wordt toegepast.



Nulde orde vrijgave van lysozyme uit oculaire inserten.



Eerste orde vrijgave van lysozyme uit oculaire inserten.



Vrijgave van lysozyme volgens het Korsmeyer-Peppas model.

8. REFERENTIES

1. Stilma S., Voorn Th.B. Oogheekunde. Houten, Bohn Stafleu van Loghum 2008: 389 p.
2. Kaur IP., Kanwar M. Ocular preparations: The formulation approach. *Drug Development and Industrial Pharmacy* 2002; 28(5):473-493
3. Kesavan K., Balasubramaniam J., Kant S., Singh P.N., Pandit J.K. Newer Approaches for Optimal Bioavailability of Ocularly Delivered Drugs: Review. *Current Drug Delivery* 2011;8(2):172-193
4. Ashim K. Mithra. *Ophthalmic drug delivery systems*. New York, Marcel Dekker, Inc. 1993;58: 501 p.
5. Asija R., Dadarwal P., Asija S. Ocular Drug Delivery Systems: Ocular Inserts. *International Journal of Universal Pharmacy and Bio Sciences* 2012;1(2):30-39
6. Kuno N., Fujii S. Recent Advances in Ocular Drug Delivery Systems. *Polymers* 2011;3(1):193-221
7. Herbert E.K., Bruse A. Barron, McDonald M.B., Waltman S.R. *The Cornea*. New York, Churchill Livingstone 1988: 952 p.
8. Tasmana W., Jafer A. E. Duane's Ophthalmology [Internet] Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins [Geraadpleegd op 24 mei 2014]. Beschikbaar op: <http://www.oculist.net/downaton502/prof/ebook/duanes/pages/v8/v8c003.html>
9. Johnson M.E, Murphy P.J. Changes in the tear film and ocular surface from dry eye syndrome. *Progress in Retinal and Eye Research* 2004;23(4):449-474
10. Rolando M., Zierhut M. The ocular surface and tear film and their dysfunction in dry eye disease. *Survey of Ophthalmology* 2001;45:203-210
11. Coles W.H., Jaros P.A. Dynamics of Ocular Surface pH. *British Journal of Ophthalmology* 1984;68(8):549-552
12. Carney L.G., Mauer T.F., Hill R.M. Buffering in Human Tears - pH Responses to Acid and Base Challenge. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 1989;30(4):747-754
13. Kessel L., Johnson L., Arvidsson H., Larsen M. The Relationship between Body and Ambient Temperature and Corneal Temperature. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 2010;51(12):6593-6597
14. Stahl U., Willcox M., Stapleton F. Osmolality and tear film dynamics. *Clinical and Experimental Optometry* 2012;95(1):3-11
15. Ban Y., Dota A., Cooper L.J., Fullwood N.J., Nakamura T., Tsuzuki M., et al. Tight junction-related protein expression and distribution in human corneal epithelium. *Experimental Eye Research* 2003;76(6):663-669
16. Baudouin C., Labbe A., Liang H., Pauly A., Brignole-Baudouin F. Preservatives in eyedrops: The good, the bad and the ugly. *Progress in Retinal and Eye Research* 2010;29(4):312-334
17. Liaw J.H., Rojanasakul Y.Y., Robinson J.R. The effect of drug charge type and charge-density on corneal transport. *International Journal of Pharmaceutics* 1992;88(3):111-124
18. Jain-Vakkalagadda B., Dey S., Pal D., Mitra A.K. Identification and functional characterization of a Na⁺-independent large neutral amino acid transporter, LAT1, in human and rabbit cornea. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 2003;44(7):2919-2927
19. Anand B.S., Mitra A.K. Mechanism of corneal permeation of L-valyl ester of acyclovir: Targeting the oligopeptide transporter on the rabbit cornea. *Pharmaceutical Research* 2002;19(8):1194-1202

-
20. EyeWiki™: the Eye Encyclopedia written by Eye Physicians & Surgeons. Endofthalmitis [Internet] American Academy of Ophthalmology. [Geraadpleegd op 30 mei 2014] Beschikbaar op: <http://eyewiki.aao.org/Endophthalmitis>
 21. EyeWiki™: the Eye Encyclopedia written by Eye Physicians & Surgeons. Bacterial keratitis [Internet] American Academy of Ophthalmology [Geraadpleegd op 30 mei 2014] Beschikbaar op: http://eyewiki.aao.org/Bacterial_Keratitis
 22. ©2013 Allergan, Inc. Restasis® [Internet]. Restasis® (cyclosporin ophthalmic emulsion) 0,05% [Geraadpleegd op 24 mei 2014]. Beschikbaar op: <http://www.restasis.com/>
 23. Belgisch centrum voor Farmacotherapeutische Informatie. [Internet]. BCFI V.Z.W. [Geraadpleegd op 24 mei 2014]. Beschikbaar op: http://www.bcfi.be/GGR/MPG/MPG_PJ.cfm#MP_03316
 24. Federaal Agentschap voor Geneesmiddelen en Gezondheidsproducten: Samenvatting van de kenmerken van het product (SKP) Lucentis® [internet]. FAGG. [Geraadpleegd op 24 mei 2014] Beschikbaar op: <http://bijsluiters.fagg-afmps.be> Zoekterm: Lucentis
 25. Chen J.J., Ebmeier S.E., Sutherland W.M., Ghazi N.G. Potential penetration of topical ranibizumab (Lucentis) in the rabbit eye. *Eye* 2011;25(11):1504-1511
 26. Alberts J., Lewis R., Roberst W.. *Molecular Biology of The Cell: fifth edition*. New York, Garland Science 2008: 1268 p.
 27. Mark C.M., Danny K.C., Brian M.M., Robert W.P., and Derrick S.K. Stability of Protein Pharmaceuticals: An Update. *Pharmaceutical Research* 2010;27(4):544-575
 28. Capelle M., Gurny R., Arvinte T. High throughput screening of protein formulation stability: Practical considerations. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2007;65(2):131-148
 29. Shea J.E., Brooks C.L. From folding theories to folding proteins: A review and assessment of simulation studies of protein folding and unfolding. *Annual Review of Physical Chemistry* 2001;52:499-535
 30. Eugene J. MCN.. *Protein Formulation and Delivery*. Ridgefield, Connecticut, Marcel Dekker, Inc 2000: 262 p.
 31. Pattison D.I., Rahmanto A.S., Davies M.J. Photo-oxidation of proteins. *Photochemical & Photobiological Sciences* 2012;11(1):38-53
 32. Wasylaschuk W.R., Harmon P.A., Wagner G., Harman A.B., Templeton A.C., Xu H, et al. Evaluation of hydroperoxides in common pharmaceutical excipients. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2007;96(1):106-116
 33. Yang A.S, Honig B. On The pH-Dependence of Protein Stability. *Journal of Molecular Biology* 1993;231(2):459-474
 34. Chi E.Y., Krishnan S., Randolph T.W., Carpenter J.F. Physical stability of proteins in aqueous solution: Mechanism and driving forces in nonnative protein aggregation. *Pharmaceutical Research* 2003;20(9):1325-1336
 35. Wei W. Instability, stabilization, and formulation of liquid protein pharmaceuticals. *International Journal of Pharmaceutics* 1999;185(2):129-188
 36. Charm S.E., Wong B.L. Shear effects on enzymes. *Enzyme and Microbial Technology* 1981;3(2):111-118
 37. Di Stasio E., De Cristofaro R. The effect of shear stress on protein conformation Physical forces operating on biochemical systems: The case of von Willebrand factor. *Biophysical Chemistry* 2010;153(1): 1-8

-
38. Colombie S., Gaunand A., Lindet B. Lysozyme inactivation under mechanical stirring: effect of physical and molecular interfaces. *Enzyme and Microbial Technology* 2001;28(9-10):820-826
 39. Ashton L., Dusting J., Imomoh E., Balabani S., Blanch E.W. Shear-Induced Unfolding of Lysozyme Monitored In Situ. *Biophysical Journal* 2009;96(10):4231-4236
 40. Rathore K.S., Nema R.K. Review on Ocular Inserts. *International Journal of PharmTech Research* 2009;1(2):164-169.
 41. Kesavan K., Balasubramaniam J., Kant S., Singh P.N., Pandit J.K. Newer Approaches for Optimal Bioavailability of Ocularly Delivered Drugs: Review. *Current Drug Delivery* 2011;8(2):172-193
 42. Sahane N. K., Banarjee S. K., Gaikwad D. D., Jadhav S. L., Thorat R. M.. Ocular inserts: A Review. *Drug Invention Today* 2010;2(1):57-64
 43. Ghori M.U., Ginting G., Smith A.M., Conway B.R. Simultaneous quantification of drug release and erosion from hypromellose hydrophilic matrices. *International Journal of Pharmaceutics* 2014;465(1-2):405-412
 44. Saettone M.F., Salminen L. Ocular inserts for topical delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* 1995;16(1):95-106
 45. Maurya et al. Ocular Inserts as Drug Delivery System: An Overview. *Novel Science International Journal of Pharmaceutical Science* 2013;2(1-2):40-44
 46. Aburahma M.H., Mahmoud A.A. Biodegradable Ocular Inserts for Sustained Delivery of Brimonidine Tartarate: Preparation and In Vitro/In Vivo Evaluation. *Aaps Pharmscitech* 2011;12(4):1335-1347
 47. Von Burkersroda F., Schedl L., Gopferich A. Why degradable polymers undergo surface erosion or bulk erosion. *Biomaterials* 2002;23(21):4221-4231
 48. Sigma-Aldrich. Product Information: Fluorescein sodium salt [Internet]. Sigma-Aldrich Inc. (VS). [Geraadpleegd op 03 mei 2014] Beschikbaar op: http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma-Aldrich/Product_Information_Sheet/f6377pis.pdf
 49. Sigma-Aldrich. Product Information: Lysozyme from chicken egg white for molecular biology [Internet]. Sigma-Aldrich Inc. (VS). [Geraadpleegd op 03 mei 2014] Beschikbaar op: <http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/Datasheet/7/17651dat.Par.0001.File.tmp/17651dat.pdf>.
 50. Sigma-Aldrich. Product Information: Bovine serum albumin [Internet]. Sigma-Aldrich Inc. (VS). [Geraadpleegd op 03 mei 2014] Beschikbaar op: http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/a4919pis.pdf
 51. Scheider A., Nasemann J.E., Lund O.E. Fluorescein and Indocyanine Green Angiographies of Central Serous Choroidopathy by Scanning Laser Ophthalmoscopy. *American Journal of Ophthalmology* 1993;115(1):50-56
 52. Brasca M., Morandi S., Silvetti .T, Rosi V., Cattaneo S, Pellegrino L. Different Analytical Approaches in Assessing Antibacterial Activity and the Purity of Commercial Lysozyme Preparations for Dairy Application. *Molecules* 2013;18(5):6008-6020
 53. European Pharmacopeia. Hypromelloses [Internet]. The European Directorate for the Quality of Medicines & Health Care; 2000-2014 [geraadpleegd op 4 mei 2014]. Beschikbaar op: <http://online6.edqm.eu/ep801/>

-
54. Sigma-Aldrich. Product Information: Glycerol ACS reagent [Internet]. Sigma-Aldrich Inc. (VS). [Geraadpleegd op 04 mei 2014]. Beschikbaar op: <http://www.sigmaaldrich.com/MSDS/MSDS/DisplayMSDSPage.do?country=BE&language=NL&productNumber=G7893&brand=SIAL&PageToGoToURL=http%3A%2F%2Fwww.sigmaaldrich.com%2Fcatalog%2Fproduct%2Fsial%2Fg7893%3Flang%3Den>
 55. The Dow Chemical Company. Using METHOCEL Cellulose Ethers for Controlled Release of Drugs in Hydrophilic Matrix Systems. [Internet] Dow Chemical Company, VS, ©2000. [Geraadpleegd op 4 mei 2014]. Beschikbaar op: http://www.colorcon.com/literature/marketing/mr/Extended%20Release/METHOCEL/English/hydroph_matrix_broch.pdf
 56. Li C.L., Martini L.G., Ford J.L., Roberts M. The use of hypromellose in oral drug delivery. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 2005;57(5):533-546
 57. Ghosal K., Chakrabarty S., Nanda A. Hydroxypropyl methylcellulose in drug delivery. [Internet] *Der Pharmacia Sinica* 2011;2(2):152–168. [Geraadpleegd op 4 mei 2014]. Beschikbaar op: <http://pelagiaresearchlibrary.com/der-pharmacia-sinica/vol2-iss2/DPS-2011-2-2-152-168.pdf>
 58. Burdock G.A. Safety assessment of hydroxypropyl methylcellulose as a food ingredient. *Food and Chemical Toxicology* 2007;45(12):2341-2351
 59. Hoare T.R., Kohane D.S. Hydrogels in drug delivery: Progress and challenges. *Polymer* 2008;49(8):1993-2007
 60. Siepmann J., Peppas N.A. Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC). *Advanced Drug Delivery Reviews* 2001;48(2-3):139-157
 61. Costa P., Manuel J., Lobo S. Modeling and comparison of dissolution profiles. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 2001;13(2):123-133
 62. Korsmeyer R.W., Gurny R., Doelker E., Buri P., Peppas N.A. Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers.. *International Journal of Pharmaceutics* 1983;15(1):25-35

