



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

Auswirkung der Stabilisatorkonzentration auf die Funktionalisierung von
Polystyren- und PLGA-Partikeln

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Naturwissenschaften (Mag. rer.nat)

Verfasserin / Verfasser:	Ursula Länger
Matrikel-Nummer:	0405177
Studienrichtung /Studienzweig (lt. Studienblatt):	Molekulare Biologie
Betreuerin / Betreuer:	Univ. Prof. Dr. Fritz Pittner

Wien, im Februar 2009

Danksagung

Ich möchte mich bei allen bedanken, die mich direkt und indirekt bei der Entstehung dieser Diplomarbeit unterstützt haben.

Zuerst danke ich Univ.-Prof. Dr. Fritz Pittner, der mir jederzeit mit seinem großen Wissen in schwierigen Situationen zur Seite gestanden ist und mir immer mit zahlreichen hilfreichen Ratschläge weiterhelfen konnte.

Außerdem bedanke ich mich bei Ao. Univ.-Prof. Dr. Franz Gabor, dem keine Diskussion zu mühsam oder kompliziert erscheint, bis eine Lösung für jedes Problem gefunden ist.

Besonderer Dank gilt auch Mag. Gerda Ratzinger. Auch in den stressigsten Zeiten hat sie sich immer Zeit für mich genommen und geholfen, Versuche zu planen und Ergebnisse zu interpretieren. Ich freue mich sehr, dass sie mir so viel Vertrauen entgegengebracht und meine Arbeit immer geschätzt hat.

Nicht zuletzt danke ich außerdem meinen Eltern Reinhard und Beate Länger, die mich während meines ganzen Studiums finanziell und persönlich unterstützt haben. Vor allem die wissenschaftlichen Erfahrungen meines Vaters waren für mich immer besonders wertvoll.

Schließlich möchte ich mich noch bei meinem Freund Albert bedanken, der vor allem in der Zeit der praktischen Arbeit eine besonders große Hilfe war.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	5
2	Grundlagen	7
2.1	Poly(D,L-laktid-co-glykolid)-Partikel.....	7
2.2	Drug Targeting	9
2.3	Die Carbodiimidmethode.....	14
2.4	Pluronic®	16
3	Material und Methoden.....	18
3.1	Material: Spezifikation und Quelle	18
3.2	Herstellung und Vorbereitung von Mikropartikeln	19
3.2.1	PLGA-Mikropartikel.....	19
3.2.1.1	Sprühtrocknung	19
3.2.1.2	Suspendieren und Größentrennung.....	19
3.2.2	Polystyren-Mikropartikel.....	20
3.3	Kovalente Kopplung fluoreszierender Liganden an Mikropartikel	21
3.4	Unspezifische Bindung fluoreszierender Liganden an Mikropartikel	22
3.5	Charakterisierung von Mikropartikeln.....	23
3.5.1	Laserdiffraktometrie	23
3.5.2	Flowcytometrie	23
3.5.3	Rasterelektronenmikroskopie (SEM).....	24
3.5.4	Quantifizierung der Kopplungseffizienz an PLGA-Partikel.....	24
4	Ergebnisse	27
4.1	Vorversuche.....	27
4.1.1	Eichgeraden	27
4.1.2	Bestimmung geeigneter Ligandenkonzentrationen	29
4.1.2.1	Oberflächenkopplung an PLGA-Partikel	29
4.1.2.2	Oberflächenkopplung an Polystyren-Partikel	36
4.2	Partikelherstellung und –vorbereitung.....	41
4.2.1	PLGA-Partikel.....	41
4.2.1.1	Herstellung der PLGA-Mikropartikel.....	41
4.2.1.2	Suspendierung und Größentrennung.....	42
4.2.1.3	Charakterisierung der Partikel	43
4.2.2	Polystyren-Partikel.....	45
4.2.3	Diskussion und Ausblick	46
4.3	Kovalente Kopplung von F-WGA an Polystyren-Partikel.....	48
4.3.1	Besonderheiten bei der Durchführung	48
4.3.2	Charakterisierung	48
4.3.2.1	Flowcytometrie	48
4.3.2.2	Rasterelektronenmikroskopie	55
4.3.3	Diskussion und Ausblick	55
4.4	Kovalente Kopplung von Liganden unterschiedlicher Größe an PLGA-Partikel.....	57
4.4.1	Besonderheiten bei der Durchführung	57
4.4.2	Charakterisierung	58
4.4.2.1	Flowcytometrie	58
4.4.2.2	Quantifizierung der Kopplungseffizienz mit HPLC und Fluoreszenzmessung	65
4.4.2.3	Rasterelektronenmikroskopie	70

4.4.3	Diskussion und Ausblick	70
4.5	Verwendung von Aceton zur Wiedergewinnung von PLGA	73
4.5.1	Rückgewinnung des PLGA	73
4.5.2	Herstellung, Suspendierung und Größentrennung der Partikel	73
4.5.3	Kovalente Kopplung von F-WGA	74
4.5.3.1	Charakterisierung	74
4.5.4	Diskussion und Ausblick	79
5	Zusammenfassung	80
6	Abstract	81
7	Literaturverzeichnis	82
8	Lebenslauf	84
9	Anhang	85

1 Einleitung

Poly(D,L-laktid-co-glykolid) (PLGA) ist ein künstliches Polymer, das aufgrund der Eigenschaften, bioabbaubar und biokompatibel zu sein, in den letzten Jahrzehnten enorm an Bedeutung als Trägersubstanz für Arzneistoffe gewonnen hat. PLGA-Partikel können besonders die Pharmakokinetik positiv beeinflussen.

Vor allem PLGA-Nanopartikel sind diesbezüglich besonders geeignet, da sie aufgrund ihrer kleinen Größe leicht Kapillaren penetrieren und von Zellen aufgenommen werden können [1], [2], [3], [4].

Mit der Anwendung von Nanotechnologie ist das Ziel des Drug Targeting, also die spezifische Abgabe eines Arzneistoffes am gewünschten Wirkort, verbunden. Dadurch wird einer Schädigung gesunder Gewebe und großen Verlusten an Wirkstoff vorgebeugt. Die Direktion an die Zielzellen wird dadurch erreicht, dass die Partikel an ihrer Oberfläche eine Substanz tragen, die spezifisch an Strukturen des Zielgewebes bindet [1], [2]. Die Funktionalisierung kann durch kovalente Kopplung des Targeters zum Beispiel mit Hilfe der Carbodiimidmethode an die freien Carboxylgruppen der Partikel erfolgen [5].

Die Herstellung von PLGA-Nanopartikeln erfolgt hauptsächlich mittels Solvent Evaporation Technik. Dabei wird eine Lösung von PLGA in einem organischen Lösungsmittel in einer wässrigen, tensidhaltigen Phase emulgiert. Durch das Abdampfen des Lösungsmittels bilden sich feste Partikel aus. Die Zugabe eines Stabilisators ist dabei unumgänglich, da dadurch die mechanische Annäherung der lipophilen Tröpfchen und in weiterer Folge die Aggregation der Partikel verhindert werden. Typische Stabilisatoren sind Poloxamere wie Pluronic® F68 und unterschiedliche Polyvinylalkohole [3], [4].

Empirische Beobachtungen haben gezeigt, dass die Oberflächenkopplung an PLGA-Partikel durch die zugesetzten Stabilisatoren beeinflusst wird. In der vorliegenden Arbeit soll dieser Effekt für Pluronic® F68 systematisch untersucht werden, das einer von wenigen Stabilisatoren ist, die bereits für die parenterale Verabreichung zugelassen sind.

Da bereits für die Herstellung von Nanosphären mittels Solvent Evaporation Technik die Zugabe eines Tensids nötig ist, ist für diese Analyse das Sprühtrocknen die Methode der Wahl. Dabei entstehen zwar Mikropartikel, die jedoch auch tensidfrei suspendiert werden können.

Die Oberflächenkopplung in Gegenwart unterschiedlicher Konzentrationen an Pluronic® soll zwecks einfacher Charakterisierung mit fluoreszierenden Liganden durchgeführt werden. Dabei handelt es sich um Substanzen sehr unterschiedlicher Größenordnungen, da Moleküle in allen Dimensionen Potential als Targeter aufweisen. Ziel dieser Arbeit war die

Untersuchung der Kopplung von Immunglobulin G (IgG), Weizenkeimagglutinin (WGA), Fluoresceinamin und Fluorescein-Cadaverin.

Um auch einen etwaigen Effekt von Pluronic® F68 auf die Kopplung an Partikel verschiedener Größen feststellen zu können, sollen außerdem Polystyrenstandards definierter Größe für die Untersuchung herangezogen werden.

Die Charakterisierung der Partikel soll mittels einer Kombination aus Flowcytometrie, Rasterelektronenmikroskopie, HPLC und Fluoreszenzmessung erfolgen.

2 Grundlagen

2.1 Poly(D,L-laktid-co-glykolid)-Partikel

Poly(D,L-laktid-co-glykolid) (PLGA) ist ein synthetischer Polyester aus Milchsäure und Glykolsäure (siehe Abbildung 1).

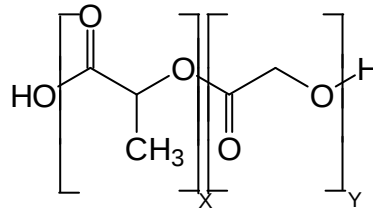


Abb. 1: Struktur von PLGA, X = Anzahl der Milchsäureeinheiten,
Y = Anzahl der Glykolsäureeinheiten

Es gehört zur Klasse der bioabbaubaren und biokompatiblen Polymere und wird unter anderem für resorbierbare medizinische Nähte eingesetzt. Aufgrund seiner günstigen Eigenschaften gilt es außerdem als besonders vielversprechend für die Herstellung von Formulierungen mit zeitlich und örtlich kontrollierter Freisetzung. Die physiko-chemischen und biologischen Eigenschaften von PLGA, wie zum Beispiel die Hydrolyserate in wässriger Umgebung, die Glasübergangstemperatur und die mechanische Festigkeit, sind stark vom molaren Verhältnis der beiden Bausteine Laktid und Glykolid abhängig [3].

In den vorliegenden Untersuchungen wurde PLGA mit einem Verhältnis von 50:50 verwendet. Wie bei allen Typen liegt auch hier die Glasübergangstemperatur über der physiologischen Temperatur von 37°C. Der genaue Wert ist vom mittleren Molekulargewicht des Polymers abhängig, das von Batch zu Batch variieren kann [3].

PLGA-Partikel eignen sich als Trägermaterial für Arzneistoffe, da ein Einbau der gewünschten Substanzen bereits bei der Herstellung der Partikel möglich ist. Das Verpacken eines Wirkstoffes in einem Arzneistoffträgersystem bietet viele Vorteile. Die umgebende Matrix schützt Arzneistoffe vor dem Abbau durch Enzyme und dem Angriff reaktiver Substanzen zum Beispiel im Magen-Darm-Trakt.

Besonders interessant ist außerdem der Einfluss auf die Verfügbarkeit des Arzneistoffes im Körper. Durch die Verwendung von bioabbaubaren Substanzen wie PLGA als Trägermaterial kann eine langsame Freisetzung des Wirkstoffes über eine längere Zeitperiode stattfinden. Dadurch ist es möglich, die Anzahl der Arzneistoffgaben zu verringern. Zum Beispiel ist eine Reduktion von täglichen Injektionen auf eine alle ein bis drei Monate möglich [1], [2], [4].

Durch die einfache Modifizierbarkeit der Oberfläche von PLGA-Partikeln spielen sie außerdem eine große Rolle im Bereich des Drug Targeting. Besonders interessant ist die Anwendung von PLGA-Partikeln zur Bereitstellung hochwirksamer Arzneistoffe am Zielort unter Vermeidung von Nebenwirkungen im gesunden Gewebe, zum Beispiel im Bereich der Krebstherapie, aber auch bei vielen anderen Krankheiten sowie für Impfstoffe mit längerfristiger Stimulierung des Immunsystems finden sie breite Anwendung (siehe dazu auch Abschnitt 2.3) [4].

Unter den vielen Methoden, PLGA-Partikel herzustellen, sind die beiden wichtigsten die Solvent Evaporation Technik und die Sprühtrocknung:

1. Solvent Evaporation:

Dies ist die Methode der Wahl zur Herstellung von Nanopartikeln aus PLGA. Man unterscheidet zwei Techniken:

Single-Emulsionstechnik: Dabei wird der Arzneistoff gemeinsam mit PLGA in einem organischen Lösungsmittel gelöst, das mit Wasser nicht mischbar ist. Diese Lösung wird, meist mit Hilfe von Ultraschall, in einer wässrigen Lösung eines Stabilisators emulgiert. Unter Rühren kommt es zum Verdunsten des organischen Lösungsmittels und das Polymer verfestigt sich zu Partikeln. Lösungsmittelreste werden unter vermindertem Druck entfernt. Bei dieser Methode können vor allem jene Arzneistoffe eingebaut werden, die schlecht in Wasser löslich sind.

Doppel-Emulsionstechnik: Diese Methode ist besser für hydrophile Substanzen geeignet. Die wässrige Arzneistofflösung wird in der organischen PLGA-Phase emulgiert und diese Emulsion wiederum in eine wässrige Lösung eines Emulgators gebracht, so dass eine w/o/w Doppelemulsion entsteht.

Typische Stabilisatoren für die Solvent Evaporation Technik sind Poloxamere und Polyvinylalkohol (PVA).

Bei der Herstellung von PLGA-Nanopartikeln mit Solvent Evaporation Technik handelt es sich um eine Batch-Verfahren. Das Gesamtsystem ist sehr fehleranfällig bei kleinsten Veränderungen, daher ist eine industrielle Herstellung in großem Maßstab nicht möglich [3], [4].

2. Sprühtrocknen:

Beim Sprühtrocknen handelt es sich um eine schnelle, einfache Methode, die leicht im großen Maßstab durchgeführt werden kann. Mit Hilfe von Druckluft wird die Lösung des Polymers in feine Tröpfchen zerstäubt. Die Temperatur wird dabei bei einem konstanten Wert gehalten, der ein Verdunsten des Lösungsmittels und somit ein Verhärten der

Tröpfchen zu Partikel erlaubt. Mit Hilfe des Luftstroms gelangen die Partikel in den Zyklon, in dem alle Partikel geeigneter Größe abgeschieden und im Produktbehälter gesammelt werden. Zu kleine Partikel werden mit der Abluftabsaugung entfernt.

Zur Herstellung von PLGA-Partikel mit Sprühtrocknung wird eine organische Lösung von PLGA mit dem Arzneistoff verwendet. Bei dieser Methode ist die Zugabe eines Stabilisators nicht erforderlich. Als Produkt werden Mikropartikel im Größenbereich von 1 bis 15 µm erhalten.

PLGA selbst ist relativ schwer effizient sprühzutrocknen, wenn man die Glasübergangstemperatur nicht überschreiten möchte. Auch bei sehr niedrig siedenden Lösungsmitteln reicht die dabei maximal mögliche Temperatur von etwa 38°C nicht aus, um die im Trockenturm aus den Tröpfchen entstehenden Partikel komplett von Lösungsmittelsresten zu befreien. Das führt zu einer Ablagerung der noch klebrigen Partikel an allen Glasteilen des Sprühtrockners. Auch im Zyklon, der eigentlich nur zur Abscheidung der fertigen, trockenen Partikel dient, lagern sich große Mengen PLGA ab. Trotz der dadurch entstehenden Verluste wird das Sprühtrocknen häufig angewandt. Es ist eine schonende Methode, die im Vergleich zur Solvent Evaporation Technik auch im sehr großen Maßstab reproduzierbar durchgeführt werden kann [3], [4].

Zur Herstellung unbeladener PLGA-Partikel können die selben Methoden angewandt werden, jedoch ohne den Zusatz eines Arzneistoffes.

2.2 Drug Targeting

Die Anwendung von Nanotechnologie ist mit dem Ziel des Drug Targeting verbunden. Insbesondere bei der Krebstherapie so wie auch bei der Behandlung von schweren Infektionskrankheiten wie HIV, Leishmaniose, Malaria und nosokomialen Infektionen kommt es häufig zum Auftreten von Nebenwirkungen, da die nötigen hochwirksamen Wirkstoffe für gesundes Gewebe toxisch sind. Das Ziel des Drug Targeting ist, Arzneistoffe direkt an die gewünschten Zielzellen zu dirigieren [1].

Man unterscheidet vier Targeting-Technologien.

1. Passives Targeting

Bei dieser Methode werden physiologische Besonderheiten des Zielgewebes ausgenutzt. In hypoxischen Arealen nach einem Herzinfarkt und insbesondere in schnell proliferierenden Tumoren sind die Blutgefäße durchlässiger als im gesunden Gewebe. Je nach Art des Tumors können die Löcher Größen von 100 nm bis 2 µm erreichen und ermöglichen dadurch die Penetration von Partikeln in geeigneten Größenklassen. Diese

Anreicherung bezeichnet man als EPR-Effekt (enhanced permeability and retention effect). Er wird dadurch verstärkt, dass durch den Mangel eines funktionsfähigen lymphatischen Systems der Abtransport der Partikel verlangsamt ist.

Um die Abgabe des Arzneistoffes im gewünschten Zielgewebe zu erreichen, muss die Halbwertszeit des Delivery Systems ausreichend groß sein. Diese ist von der Aufnahme durch Zellen des RES (retikuloendotheliales System) abhängig. Dazu zählen Makrophagen in Blut, Leber und Milz. Dieser Prozess wird durch die Opsonisierung des Wirkstoffträgers durch Serumproteine, Komplementfaktoren und Antikörper ausgelöst. Um die Effizienz des Delivery zu erhöhen, können hydrophile Polymere wie Poly(ethylen-glykol) in die Hülle von Wirkstoffträgern eingebaut werden. Diese erzeugen einen größeren hydrodynamischen Radius, der zu einer sterischen Stabilisierung führt und die Erkennung, Opsonisierung und Aufnahme durch das RES verringert [6], [7].

2. Aktives Targeting

Beim aktiven Targeting werden charakteristische Merkmale auf der Zelloberfläche wie Rezeptoren, Membrantransportsysteme, Adhäsionsproteine und Zucker genutzt, um über einen molekularen Erkennungsprozess die Arzneistoffträger direkt an die Zielzellen zu binden. Dadurch ist die Endocytose-Rate deutlich erhöht und damit wächst auch der therapeutische Effekt. Wird ein Epitop genutzt, das nicht internalisiert wird, so erfolgt dennoch eine Anreicherung des Wirkstoffes an der Zellmembran. Durch den großen Gradienten erfolgt eine erhöhte Resorption.

Die Art der Anwendung kann stark variieren. Eine Möglichkeit ist die Kopplung eines Wirkstoffes an einen Targeter, der für die spezifische Interaktion mit der Zielzelle zuständig ist. Um jedoch die Zahl der transportierten Effektormoleküle zu erhöhen, werden häufig größere Trägersysteme verwendet, in die der Wirkstoff eingebaut werden kann. Dabei handelt es sich vor allem um Mizellen, Liposomen und Nanopartikel, die klein genug sind, um intravenös verabreicht zu werden. Sie können an ihrer Oberfläche mit verschiedenen Targetern, wie zum Beispiel Antikörper, Antikörperfragmente, Lipoproteine, Lektine und niedermolekulare organische Substanzen wie Folat, funktionalisiert werden [6], [7].

3. Physikalisches Targeting

Das physikalische Targeting nutzt Abweichungen in Temperatur oder pH-Wert zum Beispiel im Tumorgewebe im Vergleich zu gesundem Gewebe. Wenn Wirkstoffträger für solche Stimuli empfindlich sind, so erfolgt nur hier eine Abgabe des Inhalts. Diese Methode inkludiert auch magnetisch kontrolliertes Targeting. Dabei werden Wirkstoffe an

magnetisierbare Partikel gebunden, die nach der Verabreichung durch das Anlegen eines äußeren Magnetfelds in das Zielgewebe dirigiert werden [6], [7].

4. Targeting über zelluläre Trägersysteme

Bei dieser Methode werden prokaryontische und eukaryontische Zellen oder Zellhüllen mit Wirkstoffen beladen. Im Gegensatz zu anderen Targeting-Methoden können dabei jedoch leicht Immunreaktionen auftreten [6], [7].

Die größte Bedeutung unter diesen Technologien kommt dabei dem passiven und dem aktiven Targeting zu.

Wie bereits weiter oben erwähnt, werden beim aktiven Targeting biorekognitive Moleküle in sehr verschiedenen Größenklassen verwendet. Im folgenden sollen stellvertretend für viele andere Targeter drei Substanzen vorgestellt werden.

Antikörper und Antikörperfragmente

Antikörper oder Teile von Antikörpern gehören zu den größten aller verwendeten Vektoren. Ihre Verwendung basiert auf der spezifischen Erkennung von vor allem proteinogenen Epitopen auf Zelloberflächen. Ihr Haupteinsatzgebiet liegt vorwiegend in der Krebstherapie. Es besteht die Möglichkeit, Wirkstoffe an Antikörper zu koppeln und sie somit an das Zielgewebe zu dirigieren oder die Funktion des Antikörpers alleine auszunutzen. Ein prominentes Beispiel dafür ist die Behandlung der chronisch lymphatischen Leukämie, die mit herkömmlichen Methoden nicht heilbar ist. Eine starke Verbesserung kann jedoch durch die Verwendung von Antikörpern, die spezifisch gegen das Oberflächenantigen CD 52 gerichtet sind, erzielt werden. CD 52 befindet sich in großer Zahl an der Oberfläche von B- und T-Lymphozyten, Thymozyten sowie Monozyten und Makrophagen. Erythrozyten und Thrombozyten hingegen sind frei von diesem Antigen, und es ist auch nicht auf Vorläuferzellen oder hämatopoetischen Stammzellen zu finden. Bei der Bindung dieser Antikörper gegen das Epitop kommt es zur Komplementfixierung, antikörpervermittelten Cytotoxizität und anschließender Lyse der Lymphozyten.

Als Targeter können Antikörper direkt an einen Wirkstoff gekoppelt werden. Ebenso ist eine Verwendung verschiedener Delivery Systeme möglich, die durch oberflächengekoppelte Antikörper an ihr Ziel dirigiert werden. Dabei kommen auch Antikörperfragmente zum Einsatz. Sie sind deutlich kleiner als ganze Antikörper, behalten jedoch ihre Spezifität, die durch die variablen Bereiche gegeben ist. Aufgrund ihrer Größe werden sie gerne benutzt, um sie in großen Mengen an Nanopartikel zu koppeln. Diese Konjugation kann entweder direkt oder über einen Spacer erfolgen, und wird zielgerichtet oder regellos durchgeführt. Bei

der letzteren Möglichkeit wird im Allgemeinen die Carbodiimidmethode verwendet. Dabei ist jedoch zu beachten, dass die Konjugation in jeder Richtung des Antikörpers möglich ist und somit seine Affinität zum Epitop verringert wird, da Antigenbindungsstellen verdeckt sein können.

Da Antikörper in Tieren produziert werden, sind Immunreaktionen nicht auszuschließen. Diesen kann jedoch durch die Verwendung von humanen konstanten Teilen sowie durch die Herstellung rekombinanter humaner Antikörper vorgebeugt werden.

Es werden bereits sehr viele Antikörper gegen diverse Krankheiten verwendet und getestet. Einige Beispiele dafür sind metastasierender Brustkrebs, lymphoproliferative Erkrankungen nach Organ- und Knochenmarkstransplantationen, Non-Hodgkin-Lymphome und viele andere bösartige Krankheiten [6], [7].

Lektine

Unter Lektinen werden alle Proteine und Glykoproteine zusammengefasst, die spezifisch an bestimmte Kohlenhydratreste binden können. Sie kommen ubiquitär in Mikroorganismen, Pflanzen und Tieren vor und sind dort für die Vermittlung verschiedener physiologischer Funktionen wie spezifische Zell-Zell-Interaktionen oder den Transport von Zuckern zuständig.

Ihr Einsatz im Bereich des Drug Targeting ist darauf zurückzuführen, dass im menschlichen Körper alle Zellen eine kohlenhydrathaltige Hülle besitzen, die man Glykocalyx nennt. Die Verwendung von Kohlenhydraten als Zielmolekül für Drug Targeting bietet eine enorme Vielfalt an Möglichkeiten. Zucker sind in ihrer Struktur deutlich variabler als Proteine oder Nukleinsäuren, da es neben einer großen Anzahl an unterschiedlichen Zuckern jeweils verschiedene Konformationen und Möglichkeiten der Verknüpfung gibt.

In jedem Zelltyp besitzt die Glykocalyx eine für dieses Gewebe spezifische Zusammensetzung, die sich bei maligner Transformation der Zellen verändert. Dieser Unterschied kann bei Lektin-vermitteltem Targeting ausgenutzt werden. Der zweite Angriffspunkt sind gastrointestinale Schleimhäute. Diese dienen dem darunterliegenden Gewebe als Schutz vor dem sauren Verdauungssaft, Proteasen und pathogenen Mikroorganismen. Die gelartige Struktur wird durch Glykoproteine erreicht, die man Muzine nennt. Da sie einen besonders hohen Kohlenhydratanteil besitzen, können auch sie Ziel eines Lektin-vermittelten Drug Delivery sein.

Von besonderem Interesse in diesem Bereich sind Pflanzen-Lektine wie das Tomaten-Lektin, Stechginsterlektin oder das Weizenkeimagglutinin (WGA). WGA ist ein dimeres Protein, das in Summe vier Zuckerbindungsstellen besitzt und eine sehr hohe Spezifität für N-Acetyl-D-glucosamin und N-Acetylneuraminsäure aufweist. Diese Eigenschaft ermöglicht eine Bindung des WGA an die Glykocalyx der Enterocyten des Darms. Durch die direkte

Adressierung an die resorbierende Oberfläche kann der frühzeitige Abbau eines Wirkstoffes durch luminale Enzyme vermindert werden. Durch die Bindung an die Zellmembran kann ein Lektin-gekoppelter Arzneistoff oder auch ein umhüllter Träger, der den Arzneistoff enthält, über Endocytose in die Zelle aufgenommen werden. Bei WGA ist diese Aufnahme äußerst effizient – innerhalb von drei Stunden werden bis zu 80% des gebundenen Lektins in Caco2-Zellen (enterocytenähnliche Zelllinie) aufgenommen. Von den Endosomen erfolgt ein Transport in die Lysosomen, die einen säurebeständigen Wirkstoff wiederum an das Cytosol abgeben. Dadurch wird eine sehr hohe intrazelluläre Verfügbarkeit erreicht. Ein kleiner Anteil WGA gekoppelter Wirkstoffe oder Partikel wird außerdem transzellulär transportiert.

WGA ist besonders gut für die orale Verabreichung geeignet, da es nicht von Enzymen im Magen-Darm-Trakt angegriffen wird. Außerdem sind N-Acetyl-D-glucosamin und N-Acetylneuraminsäure, an die WGA spezifisch bindet, in der Nahrung in ausreichend geringer Menge vorhanden, um keine Konkurrenz zur Glykocalyx der Enterocyten darzustellen.

Wie auch bei vielen anderen Vektoren ist es natürlich auch bei WGA möglich, einen Wirkstoff direkt an das Protein zu binden, oder aber diesen in ein Trägersystem einzubauen, das mit WGA konjugiert wird. Für die perorale Applikation bietet sich die Verwendung von Wirkstoffträgern jedoch besonders an, da durch die Verpackung in einer Matrix die Schädigung durch verschiedene Stoffe im Magen-Darm-Trakt, wie extreme pH-Werte und diverse Enzyme, verhindert wird [8].

Folsäure

Folsäure ist ein Vitamin, das für die Synthese von Purinen und Pyrimidinen unerlässlich ist. In gesundem adultem Gewebe wird es in reduzierter Form über einen Carrier in die entsprechenden Zellen transportiert. Während der Embryonalentwicklung hingegen, an aktivierten Makrophagen und zum Rückgewinn von Folat aus dem Primärharn im proximalen Tubulus wird dafür der Folat-Rezeptor (FR) genutzt. Dieser ist ein 38 kDa großes Glykopeptid, das Folat mit einer Affinität von mehr als 10^{-9} M bindet. In Krebszellen kommt es zu einer enormen Hochregulation des FR. Daher wird er intensiv als Targeter in der Krebstherapie erforscht.

Folat ist ein sehr kleines Molekül, das über seine γ -Carboxylgruppe mit verschiedenen Wirkstoffen konjugiert werden kann, ohne seine hohe Affinität gegenüber dem FR zu verlieren. Der in gesundem Gewebe exprimierte Folat-Carrier kann keine Konjugate mit Folsäure aufnehmen, so dass ein großer Anteil spezifisch in Tumorzellen gelangt, ohne gesundes Gewebe zu beeinflussen.

Der FR kommt einerseits in der Tumorthherapie und andererseits bei der Behandlung von Rheumatoider Arthritis zum Einsatz. Prinzipiell kommen sind alle Tumore mit FR-

Überexpression als Ziel solcher Arzneiformen in Frage. Dazu zählen unter anderen Tumore der Eierstöcke, der Lunge, des Gehirns sowie Brustkrebs.

Rheumatoide Arthritis ist eine chronische Autoimmunerkrankung, die zu destruktiven Entzündungen in inneren Organen und Gelenken führt. Die Schlüssel-Effektor-Zellen dieser Erkrankung sind Makrophagen, deren Aktivität mit dem Auftreten und Symptomen korreliert. Bei der konventionellen Therapie werden Entzündungsmediatoren angegriffen, die von aktivierten Makrophagen freigesetzt werden. Da diese Zellen jedoch Folat und verschiedene Konjugate durch die Expression des FR hoch affin binden können, ist ein direkter Angriff an der Quelle der Krankheit möglich. Auch in vielen anderen Autoimmunerkrankungen spielen aktivierte Makrophagen eine große Rolle. Durch die Expression des FR ist ein möglicher Ansatzpunkt für eine Therapie gegeben [7], [9].

2.3 Die Carbodiimidmethode

Bei der Verwendung eines PLGA-Typs mit endständigen Carboxylgruppen zur Partikelherstellung erhält man Partikel mit zahlreichen Carboxylgruppen an der Oberfläche. Diese tragen zur Stabilisierung der Partikelsuspension durch elektrostatische Abstoßung der gleichsinnig geladenen Oberflächen bei. Sie können allerdings auch für die Funktionalisierung der Partikel durch die kovalente Kopplung von Targetern verwendet werden. Zu diesem Zweck kommt häufig die Carbodiimidmethode zum Einsatz. Diese vermittelt die Bildung einer Amidbindung zwischen einer Carboxylfunktion und einer primären Aminogruppe ohne das Einführen eines Spacers. Da dies unter relativ milden Bedingungen erfolgen kann, eignet sich diese Methode auch hervorragend für die Kopplung von Proteinen.

Carbodiimide

Carbodiimide besitzen die charakteristische funktionelle Gruppe $N=C=N$. Diese ermöglicht ihnen die Reaktion mit einer Carboxylgruppe, wobei ein kurzlebiger, aber hoch reaktiver O-Acylisoharnstoff entsteht. Dieser kann mit einem Nukleophil, insbesondere mit primären Aminogruppen, reagieren. Unter Bildung einer Amidbindung entsteht so ein Amid, als Nebenprodukt wird das Isoharnstoffderivat abgespalten. Dieses Reaktionsschema ist in Abbildung 2 anhand des häufig verwendeten Carbodiimids 1-Ethyl-3-(Dimethylaminopropyl) carbodiimid (EDAC) dargestellt.

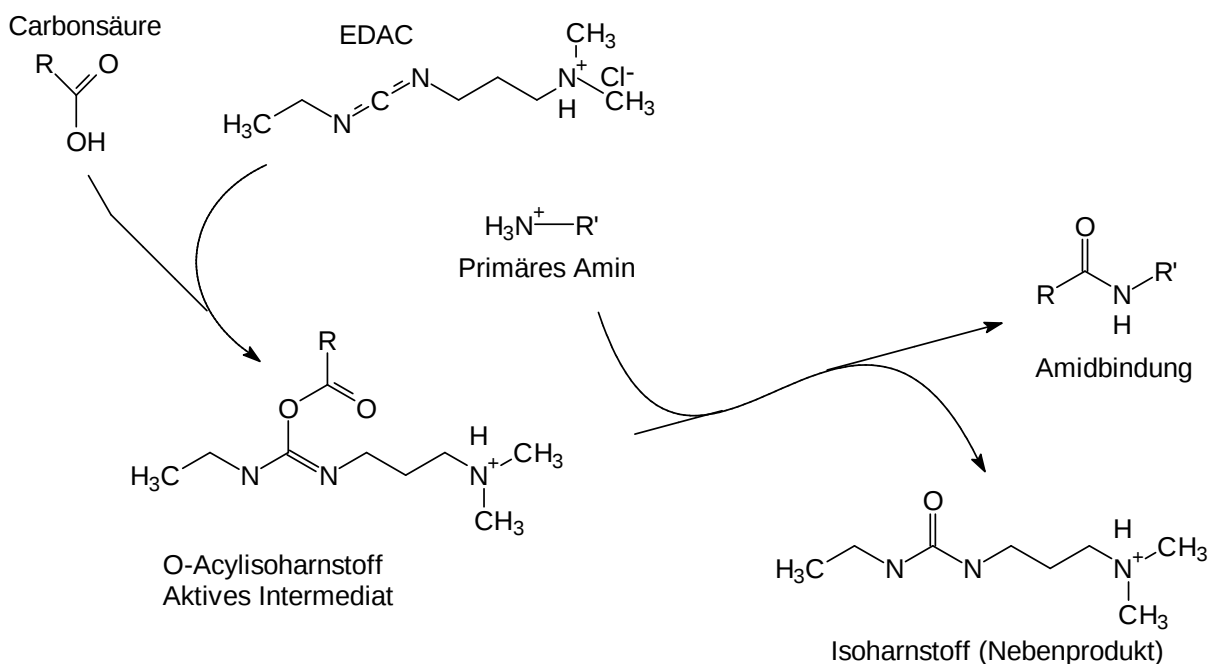


Abb. 2: EDAC reagiert mit einer Carboxylgruppe unter Bildung eines Aktivesters. In Gegenwart einer Aminogruppe (Nukleophil) wird eine Amidbindung gebildet und Isoharnstoff als Nebenprodukt frei.

Ein Problem bei der Verwendung von EDAC als Kopplungsreagens stellt die Instabilität des gebildeten aktiven Intermediats dar. Dieser Ester wird in der Gegenwart von Wasser innerhalb von Sekunden hydrolysiert. Dabei wird die Carboxylgruppe wiederhergestellt und ein entsprechender Isoharnstoff als Nebenprodukt gebildet. Diese kurze Zeit ist oft nicht ausreichend, damit das Zielmolekül den Aktivester erreichen kann. Um diese Problematik zu umgehen, wird dem Reaktionsgemisch zusätzlich NHS zugesetzt.

N-Hydroxysuccinimid (NHS)

NHS oder Sulfo-NHS werden bei der kovalenten Verknüpfung von Carboxyl- und Aminogruppen zugesetzt. Die beiden Derivate können gleichermaßen verwendet werden, jedoch ist Sulfo-NHS deutlich besser wasserlöslich und daher für die Kopplung in wässrigem Medium besser geeignet, wenn große Mengen notwendig sind.

Setzt man NHS in ausreichender Menge zur Reaktion von EDAC bei, so kommt es zur Bildung eines NHS-Esters. Die Halbwertszeit eines NHS-Esters beträgt einige Stunden und ist somit um ein Vielfaches höher als jene des Aktivesters aus EDAC und der Carboxylgruppe.

Ist nun ein Amin vorhanden, so greift es als Nukleophil die Carbonylgruppe des NHS-Esters an. Die NHS-Gruppe verlässt das Molekül und eine stabile Amidbindung verbleibt. Das entstehende Endprodukt ist ident mit jenem aus der Reaktion ohne der Zugabe von NHS, jedoch kann die Ausbeute der Reaktion um ein Vielfaches gesteigert werden. Das genaue Reaktionsschema ist in Abbildung 3 zu sehen.

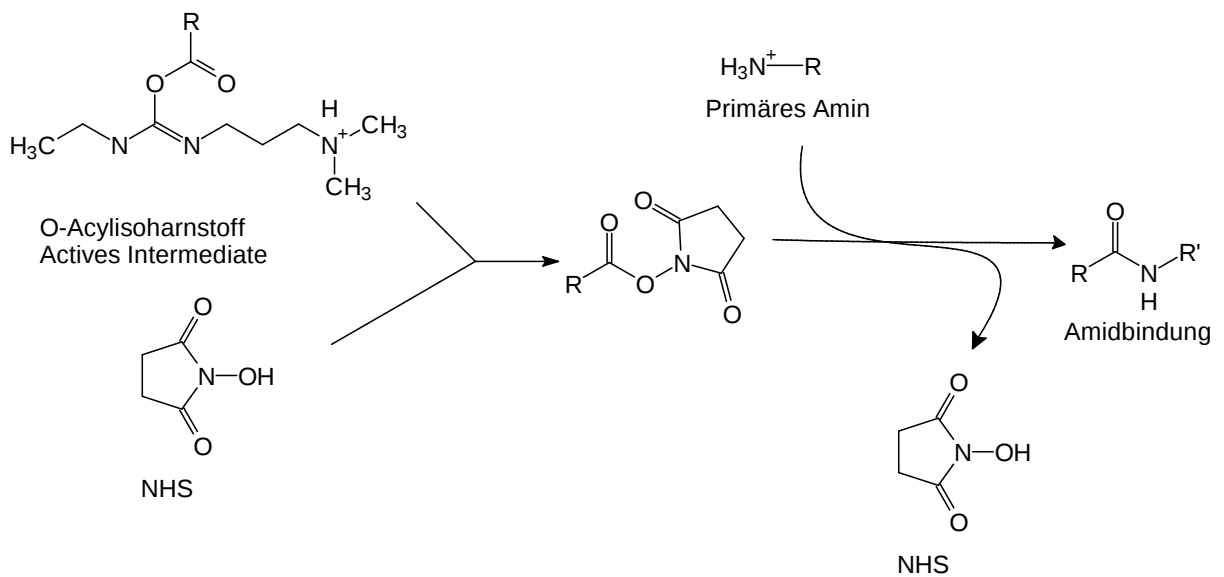


Abb. 3: Das aktive Intermediat aus Carbonsäure und EDAC reagiert mit NHS zu einem NHS-Ester. Dieser wird von einem Nukleophil (primäres Amin) angegriffen und es entstehen ein Amid sowie freies NHS.

Die Aktivierung der Carboxylgruppe läuft optimal im schwach sauren bis neutralem pH-Bereich ab. Im Gegensatz dazu ist eine optimale Kopplung nur im Basischen zu erreichen. Um eine maximale Kopplung zu erzielen, ist es bei der praktischen Durchführung sinnvoll, die Aktivierungs- und die Kopplungsreaktion in zwei Schritten hintereinander durchzuführen [10].

2.4 Pluronic®

Pluronic® ist ein Block-Copolymer vom Poloxamer-Typ. Solche Moleküle sind dreiteilig: In der Mitte befindet sich ein zentraler Polpropylenblock (PPO-Teil), der an beiden Seiten mit Polyoxyethylenblöcken (PEO-Teile) konjugiert ist. Diese Struktur ist in Abbildung 4 dargestellt.

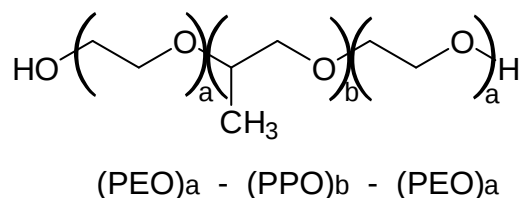


Abb. 4: Chemische Struktur von Pluronic®, a = Anzahl der PEO-Einheiten,
 b = Anzahl der PPO-Einheiten

Diese Struktur ist für die physikalischen Eigenschaften von Pluronic® verantwortlich. Der mittlere PPO-Teil ist deutlich hydrophober als die beiden PEO-Ketten an den Enden. Dadurch weist der PPO-Teil eine hohe Affinität zu hydrophoben Oberflächen, wie Polystyren-

oder PLGA-Partikeln auf. Die PEO-Schwänze sind hydrophil und ragen in das umgebende wässrige Dispersionsmedium. So bekommt ein Partikel eine hydrophile Oberfläche und ist im wässrigen Medium sterisch stabilisiert.

Die Eigenschaften von Pluronic® sind von der Länge der PPO- beziehungsweise PEO-Ketten abhängig. Bei einer Verlängerung des PPO-Teiles wird die Affinität zur Oberfläche vergrößert und die Dichte an adsorbiertem Pluronic® nimmt zu. Bei langen PEO-Ketten nimmt die Schichtdicke des umgebenden Pluronic® zu, da ein längerer Teil in das wässrige Medium hineinragt. Da dadurch auch allgemein die Hydrophilie vergrößert ist, adsorbiert weniger Pluronic® an der Partikeloberfläche.

Ein häufiger Vertreter ist Pluronic® F68. Dabei handelt es sich um das Poloxamer 188, das ein Molekulargewicht von 8350 g/mol aufweist. Es setzt sich aus 30 PPO-Einheiten sowie an jedem Ende 75 PEO-Einheiten zusammen. Daraus ergibt sich eine Hydrophilie – Lipophilie – Balance (HLB) von 29 [11].

Pluronic® F68 kommt eine zentrale Bedeutung bei der Herstellung von PLGA-Nanopartikeln mit Solvent Evaporation Technik zu. Es verhindert dabei die Aggregation während des Aushärtens der Tröpfchen zur Partikeln. Auch in allen weiteren Schritten bleibt Pluronic® als sterischer Stabilisator vorhanden und verhindert so das Ausfallen der Partikel [3], [12].

Die Dicke der Pluronic®-Schicht, die die Partikel umgibt, ist von der Konzentration an Pluronic® abhängig. Wie bei einer hochaffinen Adsorption zu erwarten ist, ist der Anstieg im Bereich sehr kleiner Konzentrationen, also bis zu 0,5%, sehr rasch. Im Anschluss wird ein Pseudoplateau bei etwa 6 nm erreicht. Diese Schichtdicke ist unabhängig von der Partikelgröße [13]. Anderen Quellen zufolge kann diese Schicht sogar bis zu 20 nm betragen [14].

In den letzten Jahren hat sich herausgestellt, dass Pluronic® außerdem selbst biologische Aktivität aufweist. Diese wird dadurch begründet, dass es sich aufgrund seines hydrophoben Mittelteils in biologische Membranen einbauen und auch in die Zelle eindringen kann. Hier können zahlreiche Prozesse beeinflusst werden, unter anderem die ATP-Synthese, die Genexpression und die apoptotische Signaltransduktion. Bei der Injektion Pluronic®-haltiger Arzneimittel wurde außerdem die Aktivierung des Komplementsystems festgestellt [15], [16].

3 Material und Methoden

3.1 Material: Spezifikation und Quelle

- Poly(D,L-laktid-co-glykolid) (PLGA): Resomer RG502H, molares Verhältnis von Glykolid zu Laktid 50 : 50, Batch 1036003, Boehringer Ingelheim, Deutschland
- Fluorescein-Weizenkeimagglutinin (F-WGA): Verhältnis Fluorescein/ Protein 2,9, M = 36 000 g/mol, Vector Laboratories, USA
- Fluorescein- Immunglobulin (F-IgG): Anti-Maus IgG-FITC produziert in der Ziege, Verhältnis Fluorescein/ Protein 4,4, M = 155 000 g/mol, Sigma, USA
- Fluoresceinamin: M = 347,32 g/mol, Sigma, USA
- 5-((5-Aminopentyl)thioureidyl)-fluoresceindihydrobromid (F-Cadaverin): M = 653,38 g/mol, Invitrogen, California
- N-(3-Dimethylamino-propyl)-N'-ethyl-carbodiimid-hydrochlorid) (EDAC): Sigma, USA
- N-Hydroxysuccinimid (NHS): Sigma, USA
- Pluronic® F-68: Sigma, USA
- 1 µm Polystyrenpartikel: Polybead®, carboxylierte Oberfläche, mittlerer Durchmesser 0,981 µm, Standardabweichung 0,028 µm, Cat # 08226, Lot # 595116, Polysciences, USA
- 3 µm Polystyrenpartikel: Polybead®, carboxylierte Oberfläche, mittlerer Durchmesser 3,00 µm, Standardabweichung 0,144 µm, Cat # 17141, Lot # 593574, Polysciences, USA
- 6 µm Polystyrenpartikel: Polybead®, carboxylierte Oberfläche, mittlerer Durchmesser 5,54 µm, Standardabweichung 0,3732 µm, Cat # 09850, Lot # 443863, Polysciences, USA

Alle anderen Substanzen sind von analytischer Reinheit und von Sigma, St. Louis, USA.

Jede verwendete wässrige Lösung ist durch ein 0,22 µm Filter partikelfiltriert.

3.2 Herstellung und Vorbereitung von Mikropartikeln

3.2.1 PLGA-Mikropartikel

3.2.1.1 Sprühtrocknung

Die Mikropartikel werden mittels Sprühtrocknung hergestellt wie von Ertl et al. beschrieben [5]. Eine PLGA-Lösung mit einer Konzentration von 1 g PLGA je 15 ml Dichlormethan wird mit einem Buechi® Mini Spray Dryer B-191 (Buechi Laboratoriums-Technik AG, Flawil, Schweiz) sprühgetrocknet, wobei eine Düse mit 0,7 mm Durchmesser verwendet wird. Um Qualität und Ausbeute der Partikel zu gewährleisten, werden nie mehr als 4 g PLGA (60 ml Lösung) auf einmal gesprüht. Danach wird der Produktbehälter ausgekratzt und weitere 4 g PLGA können gesprüht werden. Wird zu viel PLGA ohne diese Unterbrechung gesprüht, so kleben die noch mit Lösungsmittelresten behafteten Partikel im Produktbehälter zusammen.

Die Sprühparameter werden folgendermaßen gewählt:

- Inlet-Temperatur: 35°C
- Outlet-Temperatur: 32°C
- Aspiratorleistung: 100% (Abluft 40 – 50 mbar)
- Sprütrate: 2 ml/ min
- Luftmasse: 500 NI/h
- Automatische Düsenreinigung: alle 5 sec

Lösungsmittelrückstände werden anschließend über Nacht im Vakuumexsikkator entfernt.

3.2.1.2 Suspendieren und Größentrennung

Aliquote von 100 mg PLGA werden mit 10 ml partikelfiltriertem destilliertem Wasser versetzt und durch Vortexen von Gefäßwand und -boden abgelöst. Zur Suspendierung und Auftrennung aggregierter Partikel wird Ultraschall benötigt, die Abtrennung zu großer und zu kleiner Partikel wird durch Zentrifugation erreicht.

Folgendes Schema wird dreimal durchlaufen:

- Zuerst wird die Probe für 5 sec bei 72% Leistung mit dem Bandelin Sonoplus HD70 Ultraschallstab behandelt.
- Anschließend erfolgt eine Inkubation für 5 min im Bandelin Sonorex Super 10P Ultraschallbad bei 90% Leistung. Dabei ist zu beachten, dass die Glasübergangstemperatur nicht überschritten wird. Daher muss die Temperatur durch die Zugabe von Eis zumindest unter 35°C gehalten werden.
- Zur Abtrennung von Aggregaten und großen Partikeln wird bei 400 rpm 2 min zentrifugiert.

- Die Überstände werden gesammelt und die Pellets wieder in 10 ml H₂O resuspendiert. Nach dem letzten Durchgang kann das Pellet verworfen werden.

Alle gesammelten Überstände werden bei 3200 rpm für 10 min bei 4°C zur Abtrennung zu kleiner Partikel zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, die Pellets mit Hilfe des Ultraschallbads bei 50% Leistung (keine Kühlung erforderlich) in 5 ml pro ursprünglichen 100 mg PLGA resuspendiert.

Die Kontrolle der Größentrennung erfolgt mittels Flowcytometrie und Laserdiffraktion

Die Konzentration der Mikropartikel wird durch Auswaage des Lyophilisats von 1 ml der Suspension bestimmt.

3.2.2 Polystyren-Mikropartikel

Den gekauften Polystyrenstandards ist ein Tensid zugemischt, dessen Art und Konzentration vom Hersteller nicht angegeben wird. Da ein Einfluss solcher Substanzen auf den Kopplungsvorgang nicht ausgeschlossen werden kann, müssen die Partikel vor der Verwendung gewaschen werden. Vom Hersteller werden dazu verschiedene Möglichkeiten empfohlen. Da alle verwendeten Partikel die empfohlene Mindestgröße von 0,8 µm überschreiten, ist bei den hier verwendeten kleinen Ansätzen die Zentrifugation die Methode der Wahl.

Dazu wird die notwendige Menge in einem Eppendorfgefäß mit 20 mM HEPES/NaOH pH 7,0 auf eine Konzentration von 10 mg/ml verdünnt und 10 min bei 4°C zentrifugiert. 3 µm und 6 µm Partikel können bei 3500 rpm, 1 µm Partikel bei 4500 rpm zentrifugiert werden. Nach dem Entfernen des Überstandes wird in Puffer resuspendiert, wobei wiederum die Konzentration von 10 mg/ml erhalten wird. Nach erneuter Zentrifugation wird so resuspendiert, dass 100 µl Suspension der benötigten Partikelmenge pro Kopplungsansatz, also 5 mg, entsprechen. Dann werden die Partikel zu je 100 µl aliquotiert und jeweils weitere 400 µl Puffer zugesetzt. Nach weiterer Zentrifugation können die Pellets direkt in der für den ersten Schritt der Kopplung notwendigen Lösung (20 mM HEPES/NaOH pH 7,0 mit unterschiedlichen Mengen an Pluronic®) resuspendiert werden.

3.3 Kovalente Kopplung fluoreszierender Liganden an Mikropartikel

Grundlage für die kovalente Kopplung von Liganden mit Aminogruppen ist das Protokoll von Ertl et al. [5], das die Carbodiimidmethode benutzt. Um eine Abhängigkeit der Pluronic®-Konzentration auf die Kopplungseffizienz untersuchen zu können, ist zu allen verwendeten Lösungen soviel Pluronic® zugesetzt, dass eine konstante Konzentration über den gesamten Versuch gewährleistet ist. Bei den untersuchten Konzentrationen handelt es sich um 0%, 0,01%, 0,025%, 0,05%, 0,1%, 0,5%, 1% und 5% Pluronic®. Außerdem wird die unspezifische Bindung der Liganden bei den beiden Konzentrationen 0% und 1% getestet. Jeder Ansatz wird im Triplicate untersucht.

Mit Ausnahme der 1 µm Latex-Partikel, die bei 4000 rpm zentrifugiert werden, werden alle Zentrifugationsschritte bei 3500 rpm und 4°C für 10 min durchgeführt. Die Pellets werden durch Vortexen und im Fall von PLGA-Partikeln auch im Ultraschallbad (Bandelin Sonorex Super 10P) für 1 min bei 50% Leistung wieder resuspendiert. Bei allen Inkubationsschritten werden die Proben bei 25 rpm end-over-end bei Raumtemperatur gemischt.

Für einen Ansatz mit 5 mg Mikropartikel wird folgendermaßen vorgegangen:

- Die entsprechende Menge PLGA-Partikel wird durch Zentrifugation in 2 ml Eppendorf-Gefäßen pelletiert, die Latex-Partikel sind nach dem Waschen bereits in den richtigen Mengen aliquotiert.
- Um dem Pluronic® Zeit für eine Interaktion mit den Partikeln zu geben, erfolgt eine Vorinkubation für 1 h in jeweils 500 µl 20 mM HEPES/NaOH/Pluronic® pH 7,0.
- Nach erneuter Zentrifugation werden die Partikel in einer Lösung resuspendiert, die sich aus folgenden Teilen zusammensetzt:
 - 18 mg EDAC in 100 µl 20 mM HEPES/NaOH pH 7,0
 - 0,75 mg NHS in 100 µl 20 mM HEPES/NaOH pH 7,0
 - 500 µl 20 mM HEPES/NaOH/Pluronic® pH 7,0 inklusive so viel Pluronic®, dass in dem Endvolumen von 700 µl wieder die gewünschte Konzentration erreicht ist
- Während einer Inkubation für 2 h erfolgt die Aktivierung der Carboxylgruppen.
- Um überschüssige Reaktionspartner zu entfernen, werden die Partikel nun gewaschen: Es wird 1 ml 20 mM HEPES/NaOH/Pluronic® pH 7,4 zugesetzt, zentrifugiert, die Überstände abgenommen und erneut mit 1 ml des gleichen Puffers gewaschen.
- Die Kopplung erfolgt in einem Volumen von 500 µl, daher wird das Pellet in soviel Puffer resuspendiert, dass nach der Zugabe des Liganden dieses Endvolumen erreicht wird. Insbesondere F-WGA und F-IgG dürfen erst nach dem korrekten

Resuspendieren zugesetzt werden, damit ihre Struktur nicht zerstört wird. Die Proben werden über Nacht vor Licht geschützt inkubiert.

- Die Absättigung nicht abreagierter Gruppen erfolgt über 30 min mit 10 mg Glycin, das in 100 µl 20 mM HEPES/NaOH pH 7,4 gelöst ist. Als Ausgleich müssen 100 µl Puffer mit doppelter Pluronic®-Konzentration zugesetzt werden, um die Konzentrationen weiterhin konstant zu halten.
- Danach werden die Partikel von allen überschüssigen Reagenzien in vier Waschschritten gereinigt. Dabei wird jeweils 1 ml 20 mM HEPES/NaOH/Pluronic® pH 7,4 zugesetzt, homogen suspendiert, zentrifugiert und der Überstand verworfen.
- Nach dem letzten Waschschriff werden die Partikel in 500 µl 20 mM HEPES/NaOH/Pluronic® pH 7,4 aufgenommen und für die Charakterisierung herangezogen.

Es ist auch eine Kopplung im Ansatz mit 10 mg PLGA-Mikropartikeln oder 2,5 mg Latex-Partikeln möglich. Dafür müssen alle Volumina, sowie die zugesetzten Mengen an EDAC, NHS, Ligand und Glycin im selben Verhältnis verändert werden.

Die Lagerung der PLGA-Partikel erfolgt bei –80°C. Nur ein kleiner Teil der Probe wird bei 4°C für Flowcytometrie und Rasterelektronenmikroskopie bereitgehalten. Latex-Partikel werden bei 4°C gelagert.

3.4 Unspezifische Bindung fluoreszierender Liganden an Mikropartikel

Die unspezifische Bindung der Liganden wird ohne und in Gegenwart von 1% Pluronic® untersucht. Dabei wird nach der gleichen Methode vorgegangen, wie bei der Untersuchung der kovalenten Kopplung. Anstelle der Kopplungsreagenzien EDAC und NHS wird jedoch nur eine entsprechende Puffer-Pluronic®-Lösung zugesetzt. Somit erfolgt keine Aktivierung der endständigen Carboxylgruppen der PLGA-Partikel. Während der Inkubation mit dem Liganden führen also ausschließlich unspezifische physikalische Wechselwirkungen zu einer Bindung an die Partikel.

Die Lagerung erfolgt gleichermaßen wie bereits für die gekoppelten Partikel beschrieben.

3.5 Charakterisierung von Mikropartikeln

3.5.1 Laserdiffraktometrie

Mit einem Shimadzu® Laser Diffraction Particle Size Analyzer SALD-1100 wird die Größenverteilung einer PLGA-Suspension ermittelt. Dabei wird die Eigenschaft der Partikel genutzt, dass sie Lichtstrahlen in Abhängigkeit ihrer Größe unterschiedlich beugen.

Da für diese Methode relativ große Mengen Suspension nötig sind, wird Laserdiffraktometrie nur direkt nach der Größentrennung, aber nicht mehr nach der Kopplung angewandt. Das Gerät wird dreimal mit 50 – 100 ml 0,2% Tween® 20 gespült. Für die Analyse wird ein 10 ml Becherglas verwendet, das nur soweit mit 0,2% Tween® 20 gefüllt ist, dass das ansaugende Rohrende gut in die Lösung eintaucht. In die Lösung, die im Ultraschallbad steht, wird solange tropfenweise die Partikelsuspension zugegeben, bis laut Gerät die optimale Messkonzentration erreicht ist. Diese ist von der Partikelkonzentration und -größe abhängig und beträgt einen bis mehrere Milliliter. Anschließend wird die Größenverteilung ermittelt. Für die Untersuchung der Suspension aus sprühgetrockneten PLGA-Partikeln hat sich die Analyse des Größenbereichs von 0,1 – 45 µm als sinnvoll erwiesen. Nach der Benutzung wird das Gerät wieder dreimal wie oben beschrieben gewaschen.

3.5.2 Flowcytometrie

Auch Flowcytometrie kann für die Charakterisierung von Mikropartikeln eingesetzt werden. Sowohl Latex- als auch PLGA-Partikel werden mit einem Coulter® EPICS® XL-MCL™ Flow Cytometer analysiert. Damit kann jedes Teilchen einzeln erfasst werden. Durch die Streuung des eingestrahnten Laserlichts können Aussagen über die Größe und die Granularität der Partikel getroffen werden. Die dafür notwendigen Messgrößen sind der Forward und der Side Scatter (FS und SS). Der FS nimmt mit der Partikelgröße linear zu. Die Oberflächeneigenschaften werden durch den SS widerspiegelt. Er ist umso kleiner, je glatter die Oberfläche der Partikel ist.

Somit kann auch die Flowcytometrie genutzt werden, um die Größenverteilung einer beliebigen Partikelsuspension zu untersuchen. Für die Eichung werden Standardpartikel bekannter Größe verwendet, anhand derer Gates im linearen FS gelegt werden, die bestimmten Größen entsprechen.

Außerdem kann mittels Flowcytometrie auch die Fluoreszenz jedes einzelnen erfassten Partikels bei einer vorgegebenen Wellenlänge bestimmt werden. Unterschiede in der Fluoreszenzintensität spiegeln Unterschiede in der Kopplungseffizienz wieder.

Der Vorteil dieser Methode ist die geringe Menge an notwendiger Partikelsuspension.

Die Geräteeinstellungen sind wie folgt gewählt:

- Anregungswellenlänge: 488 nm (Argonlaser)
- Detektion: 525 nm
- FS: 204 V, Gain 5,0
- SS: 403 V, Gain 7,5
- FL1 (bei hoher partikelassozierten Fluoreszenzintensität): 1300 V, Gain 2,0
- FL1 (bei niedriger partikelassozierten Fluoreszenzintensität): 1800 V, Gain 2,0

Alle Messungen werden in 1 ml partikelfiltriertem 0,2% Tween® 20 durchgeführt. Die notwendige Menge an Partikelsuspension ist stark von ihrer Konzentration abhängig, wird aber so gewählt, dass immer ungefähr 100 Events pro Sekunde detektiert werden. Dazu sind ungefähr 2 bis 13 µl Suspension nötig. Zwischen den Messungen wird jeweils 30 sec mit 0,2% Tween® 20 gespült.

3.5.3 Rasterelektronenmikroskopie (SEM)

Die Suspension oder trockene Partikel werden entweder direkt auf den Objekträger aufgetragen oder über einen Millipore Isopore™ Membrane Filter, Porengröße 0,1 µm, VCTP, aus Polycarbonat, mit 1 ml partikelfiltriertem destilliertem Wasser gewaschen. Vor der Verwendung müssen die Proben im Vakuumexsikkator getrocknet werden. Die Proben werden in einem PHILIPS XL-30 ESEM Rasterelektronenmikroskop im Hochvakuum bei einer Beschleunigungsspannung von 15 kV fotografiert.

3.5.4 Quantifizierung der Kopplungseffizienz an PLGA-Partikel

Um quantitative Aussagen über die Kopplungseffizienz unter unterschiedlichen Kopplungsbedingungen treffen zu können, wird die Menge an PLGA mit HPLC und die des Liganden mittels Fluorimetrie ermittelt. Da die Fluoreszenz nur nach dem Hydrolysieren von Mikropartikeln gemessen werden kann und Latex-Partikel nicht hydrolysierbar sind, ist eine quantitative Charakterisierung dieser Partikel nicht möglich.

Probenvorbereitung und HPLC-Methode zur PLGA-Quantifizierung

- In einem 2 ml Glasgefäß mit dicht verschraubbarem Deckel werden ein Aliquot von 40 µl gekoppelter Mikropartikel-Suspension mit 200 µl Acetonitril, 80 µl 1 N KOH und 680 µl destilliertem Wasser gemischt.
- Die Proben werden vor Licht geschützt 30 min mit Ultraschall im Wasserbad bei 50% Leistung behandelt. Dabei ist auf ausreichende Kühlung zu achten, da während des Ultraschallierens die Glasübergangstemperatur von PLGA nicht überschritten werden sollte. Dafür wird permanent Wasser in das Bad zufließen gelassen und gleichzeitig, um den Wasserspiegel konstant zu halten, Wasser abgelassen.

- Anschließend erfolgt eine Inkubation der Proben unter Rühren bei 100°C für 90 min im Trockenschrank zur vollständigen Hydrolyse der Partikel.
- Wenn die Proben auf Raumtemperatur abgekühlt sind, wird jeweils ein 200 µl Aliquot gezogen, das für die Fluoreszenzmessung benötigt wird.
- Anschließend wird der pH-Wert rückgestellt. Dafür werden 10 µl des Indikators Bromthymolblau zugesetzt und mit jeweils 20 µl 1 N HBr auf einen Farbumschlag von blau nach gelb titriert.
- In einem neuen Glasgefäß werden 200 µl dieser Lösung mit 800 µl Acetonitril, 500 µl 20 µM/ml Triethanolamin (TEA) und 500 µl 20 µM/ml p-Bromophenacylbromid (BPB) gemischt. Es wird unter Rühren 90 min bei 80°C inkubiert. Dabei erfolgt eine Veresterung der bei der Hydrolyse freigesetzten Milch- und Glykolsäure.
- Je 1 ml der abgekühlten Lösung wird für die Analyse in HPLC-Vials abgefüllt.

Die Analyse erfolgt mit einem Agilent HPLC-System der 1100 Serie über eine LiChrospher® 100 RP-18e Säule mit einer Korngröße von 5 µm.

Das Einspritzvolumen beträgt 20 µl.

Es erfolgt eine Gradientenelution ausgehend von 30% H₂O und 70% Acetonitril. Während der Elution wird in zwei Stufen auf 90% Acetonitril erhöht und das Wasser entsprechend auf 10% abgesenkt. Eine genaue Darstellung dieses Schemas ist in Abbildung 5 zu sehen.

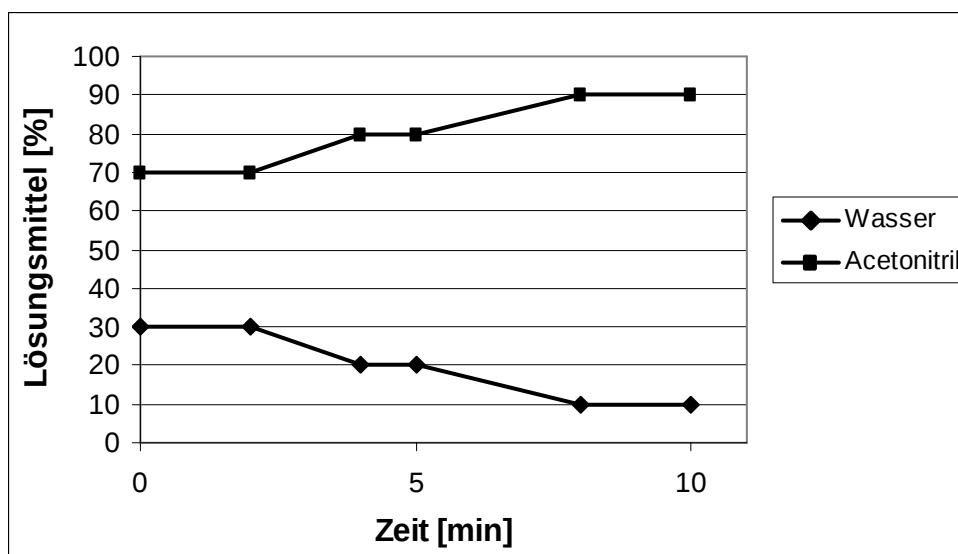


Abb. 5: Schema der Gradientenelution

Nach jeder Probe wird mit 20 µl 100% Acetonitril gespült.

Die Detektion erfolgt mit einem Diodenarraydetektor. Die Darstellung des Chromatogramms beruht dabei auf der Änderung bei 254 nm im Vergleich zur Referenzwellenlänge 360 nm, da bei dieser Wellenlänge die Ester der Glykolsäure und der Milchsäure ihr Absorptionsmaximum aufweisen. In diesem Fall wird die Konzentration der Glykolsäure mit

Hilfe von Eichgerade ermittelt und dient für der Berechnung der PLGA-Konzentration als Grundlage.

Quantifizierung des Liganden

Je Probe werden dreimal 50 µl bei 485/ 525 nm am Tecan® Infinite M200 Fluorimeter vermessen. Mit Hilfe von Eichgeraden kann die genaue Konzentration des Liganden in der Probelösung ermittelt werden.

Durch die Kombination der Ergebnisse beider Analysen kann eine genaue Angabe gemacht werden, wie viel Ligand bezogen auf die Menge an eingesetztem PLGA gebunden hat.

4 Ergebnisse

4.1 Vorversuche

4.1.1 Eichgeraden

HPLC: Glykolsäure

Wie bereits erwähnt (Abschnitt 3.5.4) wird für die Quantifizierung von PLGA in einer Probe die Menge an Glykolsäure ermittelt und davon ausgehend auf die vorhandene Menge an PLGA hochgerechnet. Dafür wird eine Eichgerade von Glykolsäure benötigt.

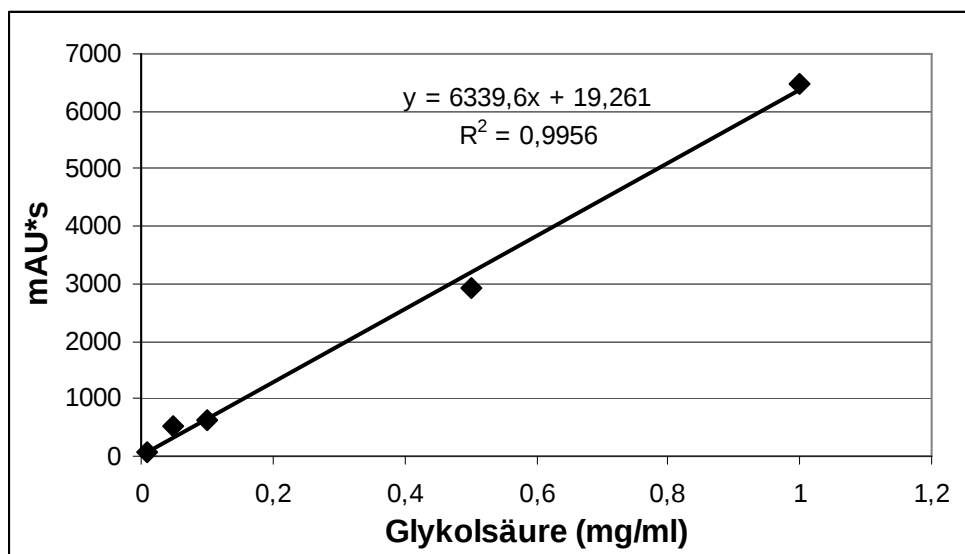


Abb. 6: Eichgerade von Glykolsäure (HPLC)

Fluoreszenzmessung: F-WGA, F-Cadaverin, F-IgG

Zur Quantifizierung des gekoppelten Liganden wird dessen Fluoreszenz gemessen. Zur Berechnung dienen die Eichgeraden in den Abbildung 7 bis 9.

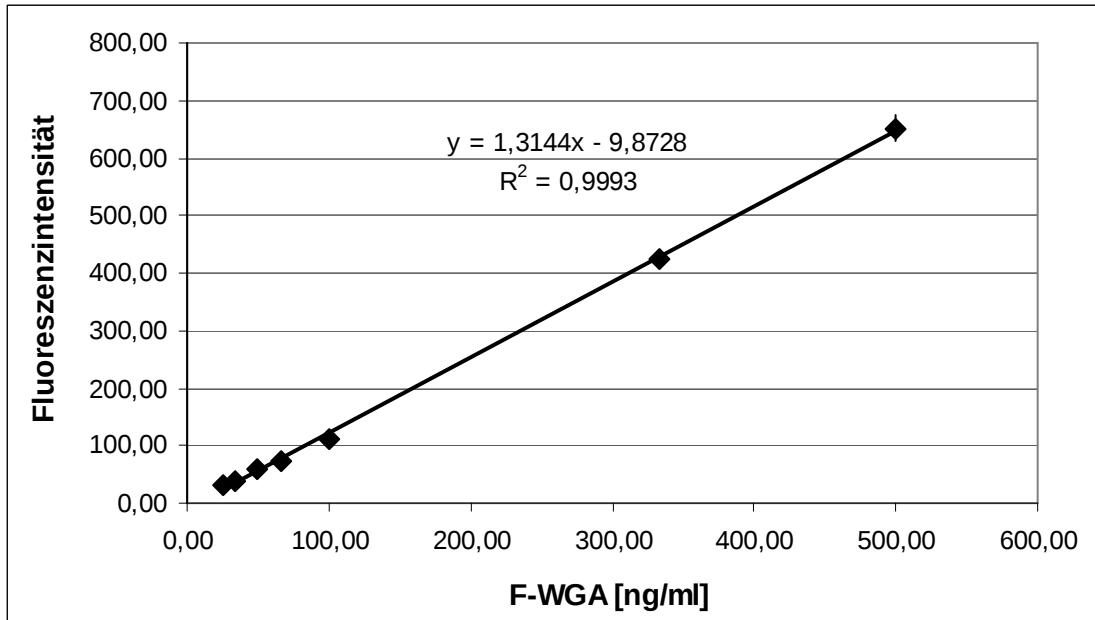


Abb. 7: Eichgerade von F-WGA, Gain 100 (Fluoreszenzmessung)

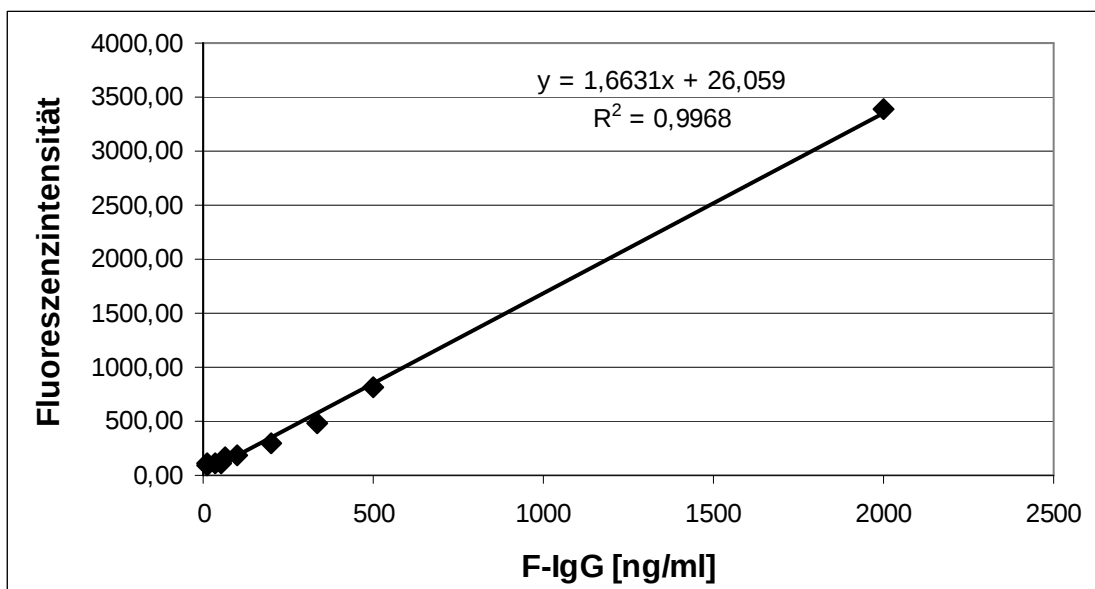


Abb. 8: Eichgerade von F-IgG, Gain 150 (Fluoreszenzmessung)

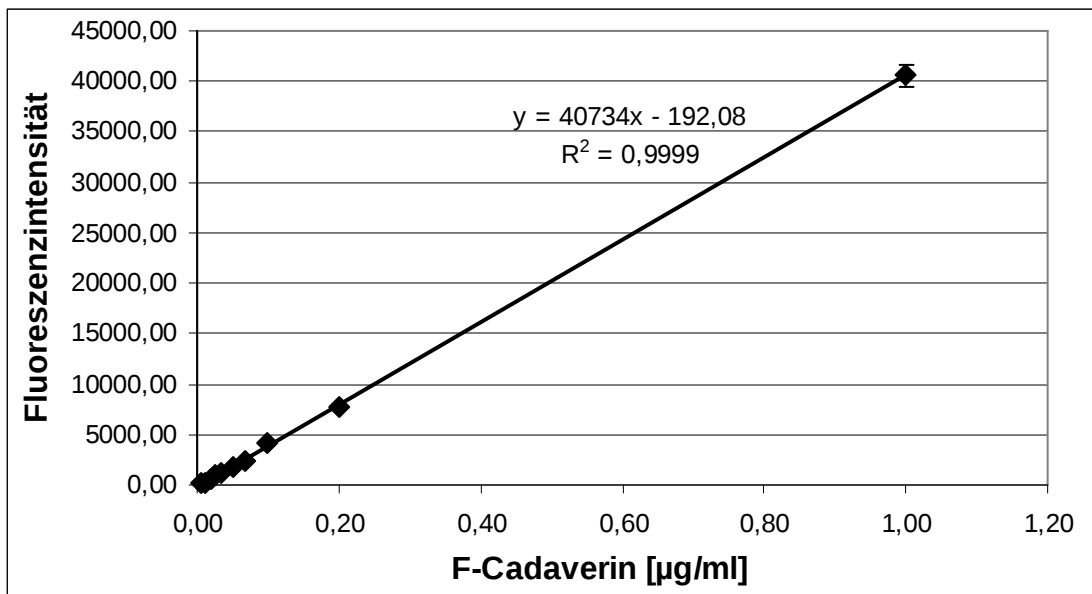


Abb. 9: Eichgerade von F-Cadaverin, Gain 100 (Fluoreszenzmessung)

4.1.2 Bestimmung geeigneter Ligandenkonzentrationen

Die Charakterisierung der in Vorversuchen gekoppelten Mikropartikel erfolgt ausschließlich mit Flowcytometrie. Dadurch ist eine rasche Analyse mit hoher Aussagekraft gewährleistet. Es ist jedoch durchwegs so, dass die detektierten Fluoreszenzintensitäten von Proben unterschiedlicher Versuche, obwohl sie exakt gleich behandelt wurden, nie übereinstimmen. Auch wenn das gleiche Ergebnis erzielt wird, also eine äquivalente Abnahme der Kopplungseffizienz bei gleichen Pluronic®-Konzentrationen, so sind die gemessenen Zahlenwerte oft um bis zu 50% unterschiedlich (vergleiche dazu die vollständigen Daten im Anhang A.1).

4.1.2.1 Oberflächenkopplung an PLGA-Partikel

Da die Oberflächenkopplung von F-WGA an PLGA-Mikropartikel bereits gut untersucht ist [5], ist dieses Lektin der Ausgangspunkt aller Untersuchungen. Darauf aufbauend werden die anderen Liganden untersucht.

Alle Vorversuche mit PLGA-Partikeln werden in 5 mg Ansätzen durchgeführt.

F-WGA

Zu Beginn wurde die bereits als sinnvoll getestete Konzentration von 1,5 nmol für einen Ansatz von 5 mg PLGA-Partikel herangezogen [5]. Damit konnte in zwei Versuchen eine Abnahme der Kopplungseffizienz auf 60% (vollständige Datenerhebung siehe Tabelle 17 im Abschnitt A.1.1), beziehungsweise 40% (Tabelle 18, A.1.1) zwischen 0% und 1% Pluronic® detektiert werden. Im Gegensatz dazu zeigen weitere Versuche keine sinnvolle und reproduzierbare Abhängigkeit der bestimmten Fluoreszenzintensität von der Pluronic®-

Konzentration. Dabei ist im kleinen Konzentrationsbereich oft eine annähernd lineare Beziehung oder eine Abnahme bei kleineren Konzentrationen zu sehen (siehe auch Tabelle 19, Abschnitt A.1.1). Da ein Quench aufgrund zu hoher Konzentration an Fluorophor an der Partikeloberfläche nicht ausgeschlossen werden kann, soll in einem Versuch mit unterschiedlichen Konzentrationen an F-WGA abgeklärt werden, mit welcher Verdünnung noch eine gute Detektion möglich ist, aber keine Quenchphänomene zu erwarten sind. Dazu wird die Kopplung bei den drei Pluronic®-Konzentrationen 0%, 0,01% und 0,1% untersucht. Bei jeder dieser drei Konzentrationen werden die Partikel in vier Einzelversuchen mit 0,15 nmol F-WGA gekoppelt. Die niedrigste Fluoreszenzintensität wird erfahrungsgemäß bei der größten Menge an Pluronic® erzielt. Daher soll diese Konzentration, also 0,1%, noch mit den zwei weiteren F-WGA Mengen 0,3 nmol und 0,075 nmol untersucht werden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 aufgelistet.

Tabelle 1: Oberflächenkopplung von F-WGA (0,3 nmol, 0,15 nmol, 0,075 nmol) an PLGA-Mikropartikel

F-WGA	0,3 nmol	0,15 nmol		0,075 nmol
Pluronic® [%]	Fluoreszenz- intensität	Fluoreszenzintensität (Mittelwert)	Standard- abweichung	Fluoreszenz- intensität
0		32,54	2,11	
0,01		26,62	2,05	
0,1	38,85	25,31	1,79	18,05

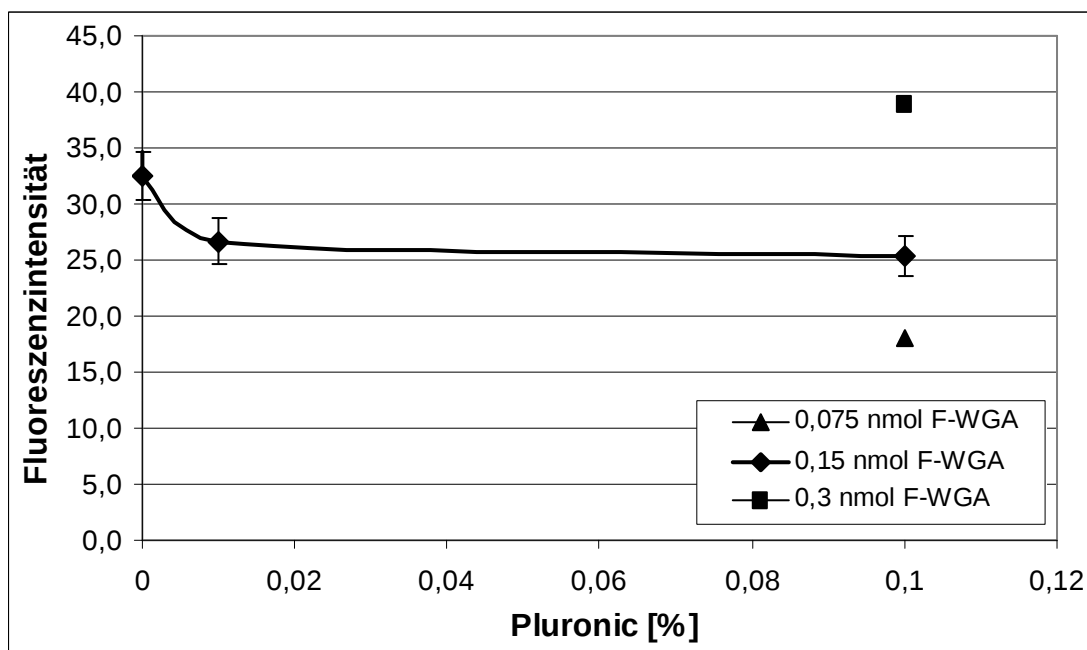


Abb. 10: Vergleiche der Fluoreszenzintensität von F-WGA gekoppelten PLGA-Mikropartikeln in Abhängigkeit der Pluronic®-Konzentration zur Ermittlung der optimalen F-WGA-Menge (0,15 nmol, 0,3 nmol, 0,075 nmol), 5 mg Partikel (Flowcytometrie)

In Abbildung 10 ist zu sehen, dass mit der mittleren F-WGA-Menge, also 0,15 nmol, eine gute Detektion möglich ist und die erwartete Abnahme messbar ist. Bei 0,3 nmol liegt der niedrigste Punkt in dieser Reihe auch noch im messbaren Bereich. Allerdings wären nur geringfügig höhere Fluoreszenzwerte bereits in der Größenordnung, die in früheren Versuchen auf einen Quench schließen ließen. Die kleinste verwendete Menge von 0,075 nmol liegt auch noch in einem sicher gut detektierbaren Bereich. Da bei 0,15 nmol deutliche Pluronic®-abhängige Unterschiede detektierbar sind und daher kein Quench aufzutreten scheint, scheint es sinnvoll, damit weiterzuarbeiten, weil größere Fluoreszenzwerte eine höhere Messgenauigkeit ermöglichen.

F-IgG

Anfangs wurde mit 1,5 nmol, also der gleichen Menge Ligand wie bei F-WGA, die Kopplung durchgeführt. Damit wird jedoch keine Abnahme, sondern eine Zunahme der partikelassoziierten Fluoreszenz detektiert (Auflistung der Daten siehe Anhang A.1.1, Tabelle 20). Dieses Phänomen ist vermutlich auf einen Quench zurückzuführen, da ohne Pluronic® die größte Menge an Ligand bindet und diese Partikel somit am stärksten fluoreszieren, sodass die Eigenlöschung hier den größten Einfluss hat. In zwei weiteren Versuchen wurden also deutlich geringere molare Mengen, nämlich ein Zehntel (0,15 nmol, siehe Tabelle 21, Anhang A.1.1) und ein Hundertstel (0,015 nmol, Tabelle 2) dieser Menge, für die Kopplung eingesetzt.

Tabelle 2: Oberflächenkopplung von IgG (0,015 nmol) an PLGA-Mikropartikel

	Pluronic® [%]	Fluoreszenzintensität (0,015 nmol F-IgG)
Spezifische Bindung	0	16,9
	0,01	14,9
	0,1	10,3
Unspezifische Bindung	0	2,9

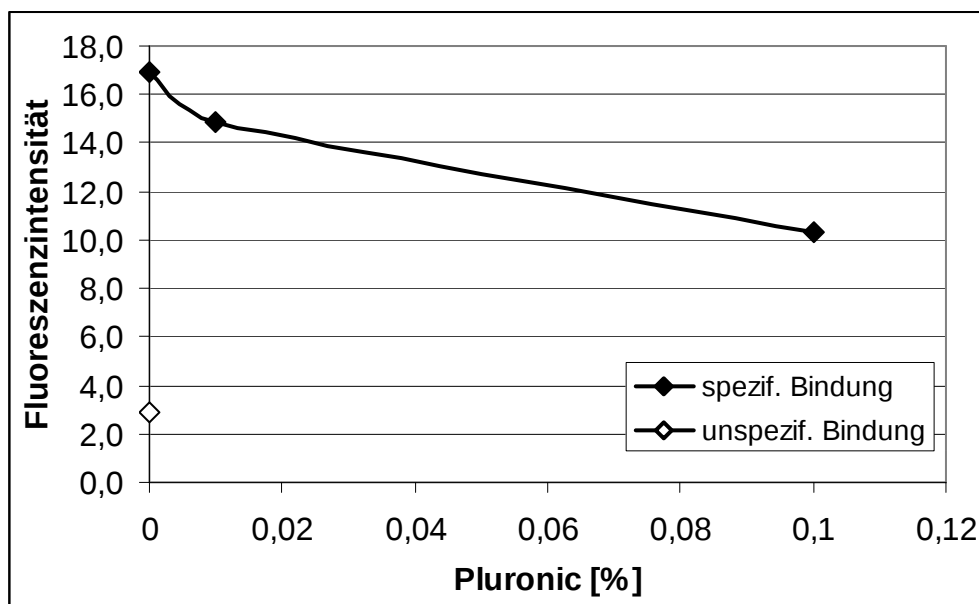


Abb. 11: Fluoreszenzintensität von F-IgG gekoppelten PLGA-Mikropartikeln in Abhängigkeit der Pluronic®-Konzentration bei 0,015 nmol F-IgG, 5 mg Partikel (Flowcytometrie)

Wie in Abbildung 11 zu sehen, kann mit der eingesetzten Menge an F-IgG von 0,015 nmol die Detektion in einer angemessenen Größenordnung erfolgen. Außerdem ist zu erkennen, dass, wie auch schon in den Vorversuchen mit F-WGA, die Kopplung eine Pluronic®-Abhängigkeit zeigt.

Fluoresceinamin

Mit der gleichen molaren Menge, die bei F-WGA als Ausgangswert genommen wurde, sind mit Fluoresceinamin nur sehr niedrige Fluoreszenzintensitäten zwischen 0,8 und 1 zu detektieren. Außerdem ist keine Abhängigkeit dieser Werte von Pluronic® festzustellen (siehe Tabelle 22, Anhang A.1.1). Nach regelmäßiger Erhöhung der Menge auf bis zu 30 nmol ist die Detektierbarkeit zwar etwas besser, aber offensichtlich nicht ausreichend (Tabelle 23, Anhang A.1.1). Da dennoch ein deutlicher Unterschied zwischen den Proben mit spezifischer Oberflächenkopplung und jenen auf unspezifische Bindung zu erkennen ist, ist es nicht auszuschließen, dass Fluoresceinamin ein geeigneter Ligand ist, um die Kopplung mittels

Carbodiimidmethode näher zu untersuchen. Daher werden die Einstellung des Flowcytometers verändert und der Laser nun mit 1800 V betrieben, um höhere Werte und somit eine höhere Genauigkeit zu erreichen. In einem neuen Versuch sollen eine hohe Ligandenkonzentration mit stärkerer Lasereinstrahlung kombiniert werden. Das Resultat ist in Tabelle 3 aufgelistet und in Abbildung 12 dargestellt.

Tabelle 3: Oberflächenkopplung von Fluoresceinamin (30 nmol) an PLGA-Mikropartikel, Argonlaser (Flowcytometrie): 1800 V

	Pluronic® [%]	Fluoreszenzintensität (Mittelwert)	Standard- abweichung
Spezifische Bindung	0	79,95	3,04
	0,01	55,83	3,50
	0,025	67,43	1,77
	0,05	60,80	5,52
	0,1	61,30	3,81
	0,5	56,33	2,22
	1	49,83	2,02
	5	64,80	2,55
Unspezifische Bindung	0	12,90	0,66
	1	13,63	1,66

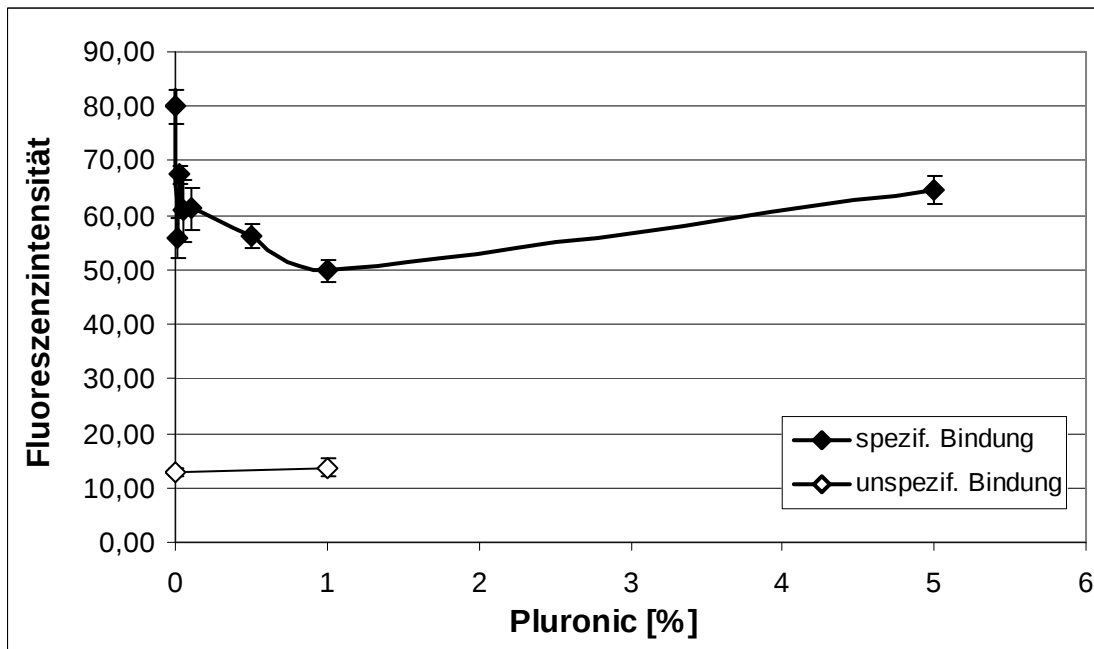


Abb. 12: Fluoreszenzintensität von Fluoresceinamin-gekoppelten PLGA-Mikropartikeln in Abhängigkeit der Pluronic®-Konzentration bei 30 nmol Fluoresceinamin, 5 mg Partikel, Detektion: Argonlaser 1800 V (Flowcytometrie)

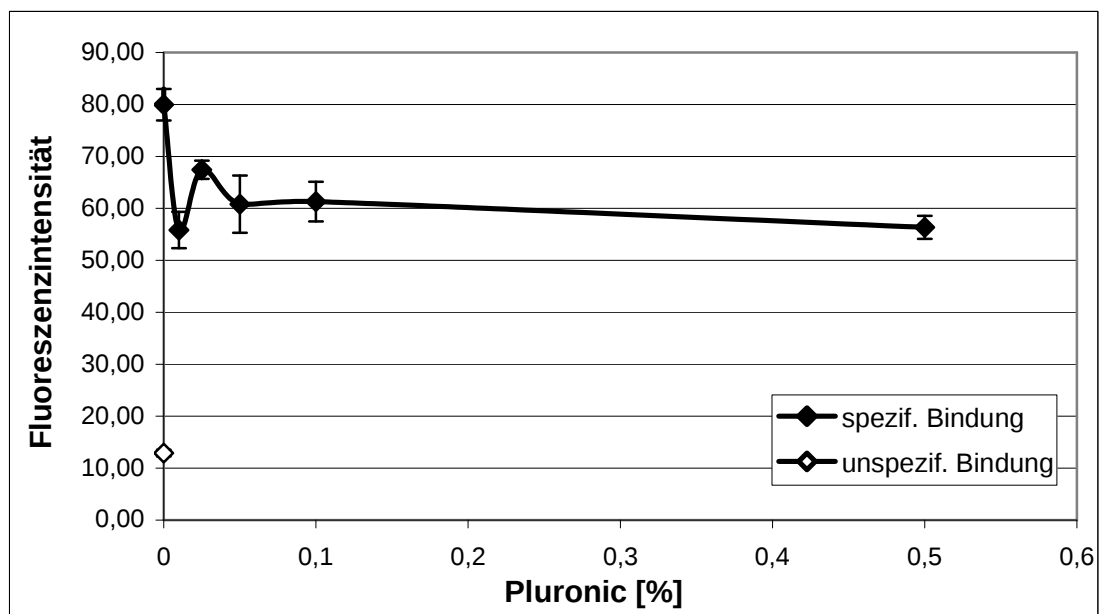


Abb. 13: Fluoreszenzintensität von Fluoresceinamin-gekoppelten PLGA-Mikropartikeln in Abhängigkeit kleiner Pluronic®-Konzentrationen bei 30 nmol Fluoresceinamin, 5 mg Partikel, Detektion: Argonlaser 1800 V (Flowcytometrie)

In den Abbildungen 12 und 13 ist zu sehen, dass die Tendenz einer stetig verminderten Kopplungseffizienz bei steigender Pluronic®-Konzentration von Fluoresceinamin wie bei F-IgG und F-WGA nicht auftritt, auch wenn die Detektion verbessert wird. Die phenolische

Aminogruppe des Fluoresceinamins reagiert also in gewissem Ausmaß mit Hilfe der Carbodiimidmethode mit den Carboxylgruppen der PLGA-Partikel, jedoch ist es ein zu schwaches Nukleophil, um eine effiziente Kopplung zu erzielen. Es soll daher in weiterer Folge stattdessen F-Cadaverin als niedermolekularer Modellligand zur Untersuchung dieses Phänomens eingesetzt werden.

F-Cadaverin

Da F-Cadaverin effizienter mittels Carbodiimidmethode gekoppelt werden sollte als Fluoresceinamin, wird wiederum wie bei F-WGA eine Menge von 1,5 nmol eingesetzt. Um sofort einen größeren Konzentrationsbereich abzudecken, wird der Versuch außerdem mit 0,15 nmol und 0,015 nmol durchgeführt. Bei der höchsten Konzentration ist bereits ohne Erhöhung der Lasereinstrahlung die erwartete Abnahme mit höherer Pluronic®-Konzentration zu sehen. Im Gegensatz dazu ist bei der Verwendung von 0,015 nmol und 0,15 nmol die partikelassoziierte Fluoreszenz zu gering für die Detektion. Die vollständige Datenerhebung ist in Tabelle 24 in Anhang A.1.1 zu sehen. Erhöht man die Lasereinstrahlung, wie es für die Detektion von Fluoresceinamin versucht wurde, so werden Werte einer ähnlichen Größenordnung wie bei F-IgG und F-WGA erreicht (siehe Tabelle 4 und Abbildung 14).

Tabelle 4: Oberflächenkopplung von F-Cadaverin (1,5 nmol) an PLGA-Mikropartikel, F-Cadaverin 1,5 nmol, Argonlaser (Flowcytometrie): 1800 V

Pluronic® [%]	Fluoreszenzintensität
0	48,9
0,01	46,4
1	25

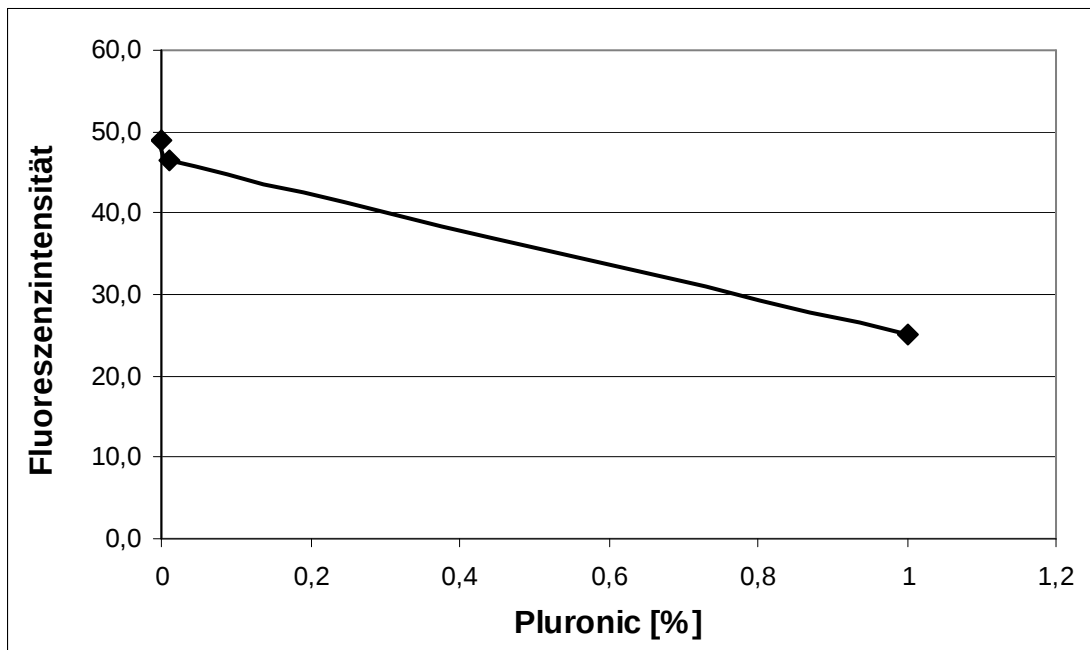


Abb. 14: Fluoreszenzintensität von F-Cadaverin-gekoppelten PLGA-Mikropartikel in Abhängigkeit der Pluronic®-Konzentration bei 1,5 nmol F-Cadaverin, 5 mg Partikel, Detektion: Argonlaser 1800 V (Flowcytometrie)

Wie in Abbildung 14 ersichtlich, ist die verwendete F-Cadaverin-Menge bei entsprechender Detektion für weitere Versuche geeignet.

4.1.2.2 Oberflächenkopplung an Polystyren-Partikel

Alle Vorversuche werden im 2,5 mg Ansatz durchgeführt. Zu Beginn wird wiederum F-WGA untersucht und mit Partikeln in allen drei Größen gekoppelt. Erst im Anschluss sollen die anderen Liganden untersucht werden.

F-WGA

3 µm Partikel:

Als Ausgangswert soll das gleiche Verhältnis von Ligand zu Partikel getestet werden, da sich bei den PLGA-Partikeln als sinnvoll erwiesen hat. Da der Versuchsansatz nur 2,5 mg Partikel enthält, werden 0,075 nmol F-WGA zugesetzt. Um einen größeren Bereich abzudecken wird außerdem gleichzeitig mit 0,75 nmol und 0,0075 nmol gearbeitet. Die niedrigste Konzentration scheint nicht ausreichend zu sein. Die beiden höheren hingegen sind beide gut detektierbar und zeigen die erwartete Tendenz. Erstaunlich ist, dass sehr hohe Fluoreszenzintensitäten von bis zu 180 mit der höchsten Konzentration erreicht werden, jedoch kein Quench aufzutreten scheint. Die entsprechenden Daten sind in Tabelle 25 (Anhang A.1.2) zu finden.

Da bisher keine so hohen Werte detektiert werden konnten und 0,075 nmol der Menge entspricht, die auch bei den PLGA-Partikeln eingesetzt wurde, ist diese Konzentration der

Favorit für die weitere Arbeit. Sie soll noch in einem weiteren Versuch bestätigt werden, in dem auch die Reproduzierbarkeit in 4 Parallelwerten untersucht wird (Tabelle 5).

Tabelle 5: Oberflächenkopplung von F-WGA (0,075 nmol) an 3 µm Latexpartikel

	Pluronic® [%]	Fluoreszenzintensität (Mittelwert)	Standard- abweichung
Spezifische Bindung	0	47,50	6,88
	1	14,13	2,29
Unspezifische Bindung	0	3,9	
	1	3,5	

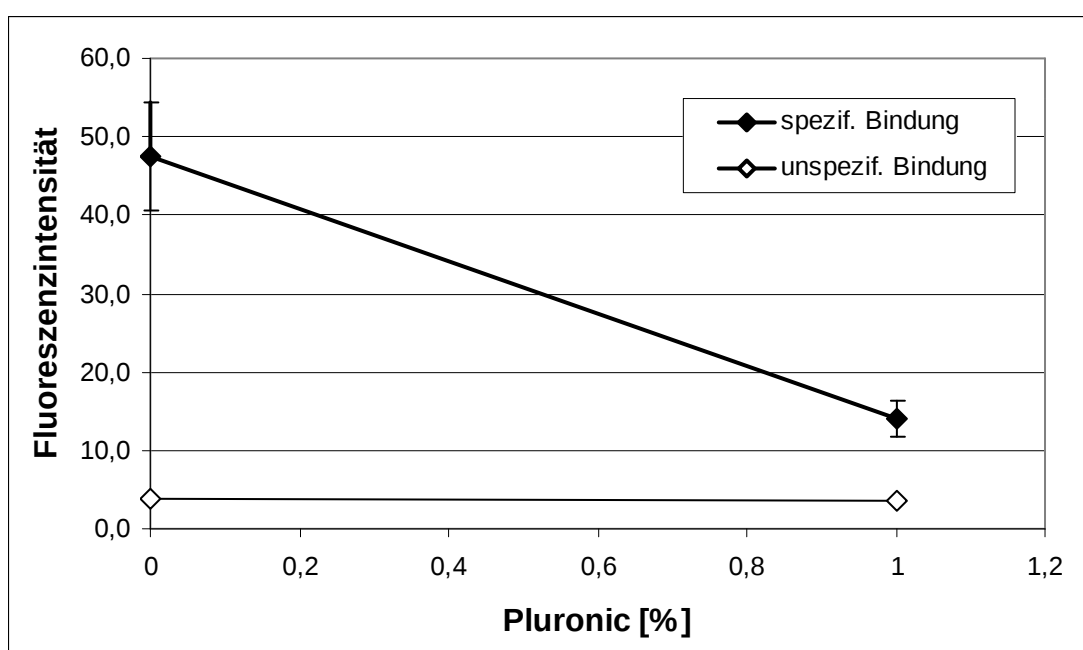


Abb. 15: Fluoreszenzintensität von F-WGA gekoppelten 3 µm Latexpartikeln in Abhängigkeit der Pluronic®-Konzentration bei 0,075 nmol F-WGA, 2,5 mg Partikel (Flowcytometrie)

In Abbildung 15 sieht man, dass die gewählte Menge an F-WGA von 0,075 nmol gut für diese Untersuchung geeignet ist. Die Reproduzierbarkeit hingegen ist zwar für diesen Versuch ausreichend, jedoch sind die Standardabweichungen insbesondere ohne Pluronic® relativ hoch dafür, dass eine genau definierte Partikelpopulation mit jeweils exakt den gleichen Reagenzien behandelt wurde.

6 µm Partikel:

Auch bei diesen Partikeln wurden die drei Mengen 0,75 nmol, 0,075 nmol und 0,0075 nmol getestet. Das Ergebnis ist in Tabelle 6 aufgelistet.

Tabelle 6: Oberflächenkopplung von F-WGA (0,75 nmol, 0,075 nmol und 0,0075 nmol) an 6 µm Latexpartikel

F-WGA	0,75 nmol	0,075 nmol	0,0075 nmol
Pluronic® [%]	Fluoreszenzintensität	Fluoreszenzintensität	Fluoreszenzintensität
0	1020,3	769,8	214,5
0,01	999,4	671,8	216,1
1	772,6	549,3	141,6

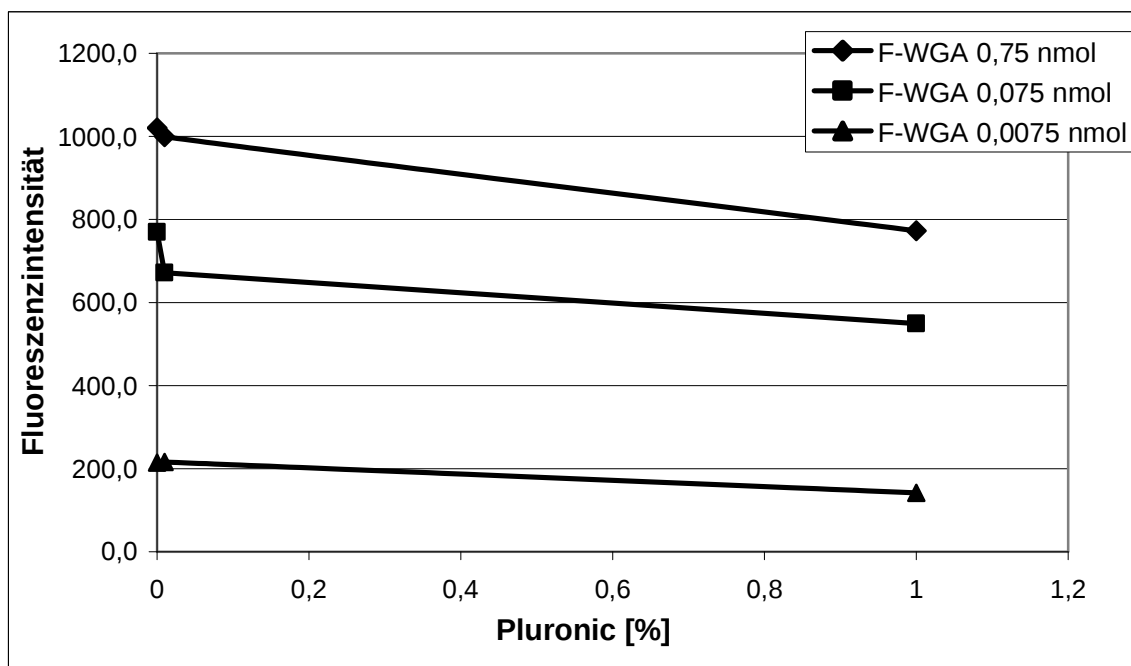


Abb. 16: Fluoreszenzintensität von F-WGA gekoppelten 6 µm Latexpartikel in Abhängigkeit der Pluronic®-Konzentration bei 0,75 nmol, 0,075 nmol und 0,0075 nmol F-WGA, 2,5 mg Partikel (Flowcytometrie)

Wie in Abbildung 16 zu sehen, liegt die gleiche Situation wie bei den 3 µm Partikel vor. Daher soll auch in diesem Fall mit 0,075 nmol F-WGA weitergearbeitet werden. Bemerkenswert ist in diesem Fall die um 16 Mal höhere Fluoreszenzintensität im Vergleich zu jener bei den 3 µm detektierten Partikel. Allein durch die um den Faktor vier größere Oberfläche der 6 µm Partikel lässt sich dieses Phänomen nicht erklären. Aufgrund des in der Flowcytometrie detektierten SS ist jedoch ersichtlich, dass die 6 µm Partikel eine deutlich größere Oberflächengranularität aufweisen als die 3 µm Partikel (siehe dazu auch Abbildungen 30 und 32 in Abschnitt 4.3.2.1). Durch die stärkere Strukturierung ist die tatsächlich für die Kopplung zur Verfügung stehende Oberfläche im Vergleich zur glatten Kugeloberfläche vergrößert und es kann mehr Ligand gebunden werden.

1 µm Partikel:

In diesem Fall wurden alle Proben jeweils mit 0,075 nmol und 0,015 nmol untersucht. Die Ergebnisse der Flowcytometrie findet man in Tabelle 7 sowie in Abbildung 17.

Tabelle 7: Oberflächenkopplung von F-WGA (0,075 nmol und 0,015 nmol) an 1 µm Latexpartikel

F-WGA	0,075 nmol	0,015 nmol
Pluronic® [%]	Fluoreszenzintensität	Fluoreszenzintensität
0	4,9	2,5
0,01	2,5	1,5
1	1,8	1,5

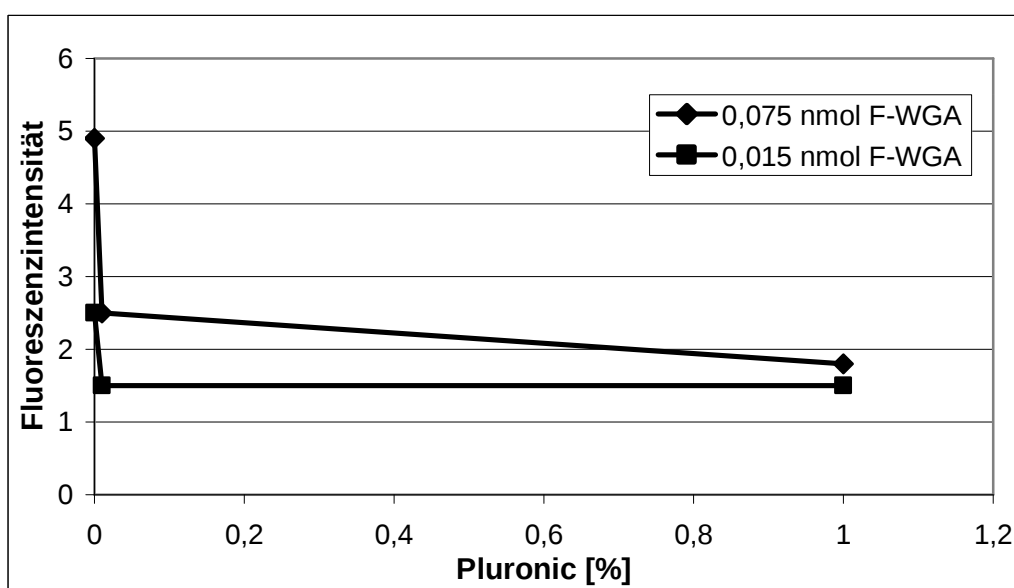


Abb. 17: Fluoreszenzintensität von F-WGA gekoppelten 1 µm Latexpartikel in Abhängigkeit der Pluronic®-Konzentration bei 0,075 nmol und 0,015 nmol F-WGA, 2,5 mg Partikel (Flowcytometrie)

Obwohl die gemessenen Fluoreszenzintensitäten, wie in Abbildung 17 zu sehen, sehr niedrig sind, ist die Arbeit mit den üblichen 0,075 nmol F-WGA sinnvoll, da eine Abnahme der Kopplung in Anwesenheit steigender Pluronic®-Konzentration gut zu erkennen ist.

F-IgG, Fluoresceinamin, F-Cadaverin

Die Liganden F-IgG und Fluoresceinamin wurden an 3 µm Partikel jeweils bei 0%, 0,01% und 1% Pluronic® gekoppelt und bei 0% und 1% auf unspezifische Bindung getestet. Die dafür eingesetzten Mengen sind 0,075 nmol F-IgG und 7,5 nmol Fluoresceinamin. Trotz hoher unspezifischer Bindung ist das Ergebnis bei F-IgG wie erwartet: Die Fluoreszenzintensität ist in einem ähnlichen Rahmen wie bei der Kopplung an PLGA-Mikropartikel und es ist eine deutliche Abnahme der Kopplungseffizienz bei der Erhöhung der Pluronic®-Konzentration zu erkennen. Der vollständige Datensatz ist in Tabelle 26

aufgelistet (Anhang A.1.2). Bei Fluoresceinamin hingegen ist zwar die detektierte Fluoreszenz ausreichend hoch für eine Auswertung, jedoch ist keine Abhängigkeit von Pluronic® zu erkennen. Die entsprechenden Daten findet man in Tabelle 27 im Abschnitt A.1.2.

Die Kopplung an Latexpartikel in anderer Größe sowie die Kopplung von F-Cadaverin wurde nicht durchgeführt, da es aufgrund unerklärlicher Phänomene bei der Kopplung von F-WGA im größeren Maßstab als nicht sinnvoll erachtet wurde.

4.2 Partikelherstellung und –vorbereitung

4.2.1 PLGA-Partikel

4.2.1.1 Herstellung der PLGA-Mikropartikel

Zu Herstellung hilfsstofffreier PLGA-Partikel wird die Methode des Sprühtrocknens gewählt. Es hat sich gezeigt, dass die Ausbeute von den Ablagerungen an PLGA an den Glasteilen des Geräts abhängig ist. Bei regelmäßiger Reinigung beträgt die Ausbeute etwa 10%. Nachdem jedoch bereits eine größere Menge an PLGA gesprüht wurde und das Gerät beschichtet ist, so ist eine Steigerung auf bis zu 40% möglich. Es ist sinnvoll, diese Veränderungen genau zu beobachten, da nicht nur eine Vergeudung von PLGA sehr kostspielig, sondern die Reinigung auch sehr mühsam ist.

Dabei ist es notwendig, alle Ablagerungen von PLGA aus den Glasteilen des Sprühtrockners zu kratzen, um es erneut zu Partikeln versprühen zu können. Obwohl elektrostatische Aufladungen nicht zu vermeiden sind, ist das geeignetste Hilfsmittel dafür ein Cell Scraper. Unterstützend kann mit einem Spatel nachgeholfen werden, jedoch nicht in dem innen beschichteten Zyklon, der durch die Bildung von Kratzern zerstört wird. Die verbleibenden Reste an PLGA werden mit Aceton herausgespült und mit Spülmittel und kräftigem Schrubben entfernt. Auch wenn keine Verunreinigungen in der PLGA-Lösung in Aceton vorhanden sind, sind ein Abdampfen des Lösungsmittels und eine Wiederverwendung des PLGA nicht sinnvoll (siehe dazu Abschnitt 4.5).

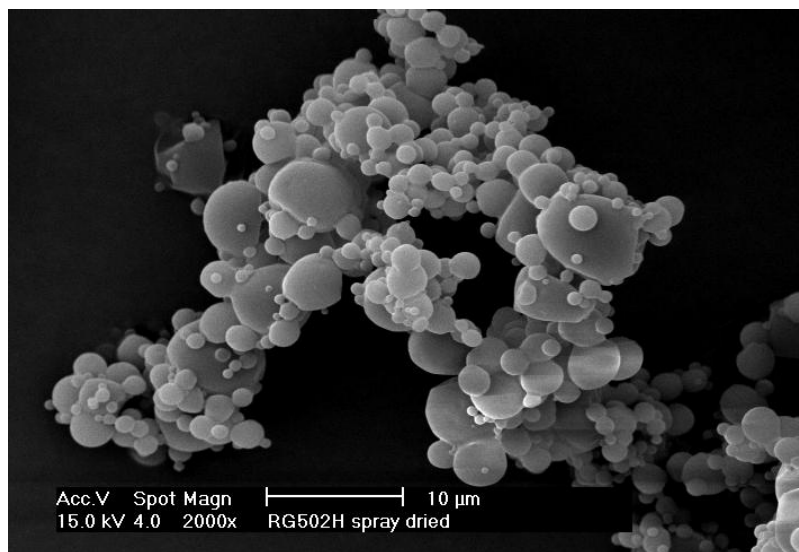


Abb. 18: Sprühgetrocknete PLGA-Mikropartikel (SEM)

Abbildung 18 zeigt eine typische Partikelpopulation nach dem Sprühtrocknen. Man kann erkennen, dass sehr schöne, glatte Kugeln entstehen, die jedoch einer sehr breiten

Größenverteilung unterliegen. Teilweise sind einzelne Kugeln miteinander verbunden, was darauf zurückzuführen ist, dass die Partikel noch Lösungsmittelreste enthalten, wenn sie im Produktbehälter gesammelt werden. Dadurch bleiben sie an benachbarten Partikeln haften und bilden Aggregate. Außerdem fällt auf, dass vereinzelte Kugeln deutliche Löcher aufweisen, durch die vermutlich das Lösungsmittel abgedampft ist. Es handelt sich also bei den Mikropartikeln um Hohlkugeln. Diese Vermutung wird auch dadurch bestätigt, dass Partikel, die intensiv mit dem Elektronenstrahl bestrahlt werden, schmelzen, ihre Oberfläche aufreißt und sie im Inneren leer sind. Das ist auch der Grund dafür, dass genaue Aufnahmen der Oberfläche bei starker Vergrößerung nicht möglich sind.

Das Sprühtrocknen von PLGA zur Herstellung von Mikropartikeln wird immer wieder als saubere, gut reproduzierbare und einfache Methode beschrieben [3], [4], [5]. Möglicherweise ist dies durch die Verwendung eines anderen Gerätes möglich, jedoch ist mit dem hier verwendeten Buechi Mini Spray Dryer Model B-191 die erzielbare Ausbeute so gering, dass nicht von einer effizienten Methode gesprochen werden kann, vor allem nicht angesichts der hohen Kosten von PLGA.

4.2.1.2 Suspendierung und Größentrennung

Beim Sprühtrocknen entstehen Partikel in einer relativ breiten Größenklasse (etwa 1 bis 15 μm). Um die Kopplung von fluoreszierenden Liganden quantifizieren zu können, ist es notwendig, mit einer möglichst homogenen Partikelsuspension zu arbeiten. Um diese herzustellen, werden die suspendierten Partikel einer Größentrennung unterzogen.

Zu Beginn werden die Partikel mit Wasser versetzt. Da sie eine sehr hydrophobe Oberfläche aufweisen, sind sie schlecht benetzbar. Daher haften sie gut an Wand und Boden der Kunststoffgefäße. Bevor man mit der Ultraschallbehandlung beginnt, ist es sinnvoll, die Partikel von den Gefäßwänden abzulösen. Wenn Vortexen dafür nicht ausreicht, ist es am Besten, die Gefäße mit dem Deckel auf den Tisch zu klopfen. Beim Vortexen muss darauf geachtet werden, dass keine Aggregate oberhalb des Flüssigkeitsspiegels an der Gefäßwand kleben, da diese sonst vom Ultraschall nicht erreicht werden.

Der Ultraschallstab ist ein wirkungsvolles Mittel bei der Suspendierung, da nur damit die Suspension ein milchig trübes Aussehen bekommt. Das Ultraschallbad wirkt dabei unterstützend mit. Dabei hat es sich als sinnvoll erwiesen, das Bad mit Eis zu kühlen, bevor man die Proben hineinlegt, denn wenn das Eis bereits geschmolzen ist, kann es auch die Intensität des Ultraschalls nicht abschwächen. Natürlich muss man darauf achten, dass alle Partikel von der Gefäßwand gelöst sind und vom Ultraschall erreicht werden.

Nach dem Zentrifugieren bei 400 rpm sind alle zu großen Aggregate im Pellet gesammelt. Nur einige flotieren aufgrund der Hydrophobizität auch auf der Wasseroberfläche. Beim Abnehmen der verwertbaren Überstände ist darauf zu achten, diese Aggregate nicht

mitaufzunehmen und das Pellet nicht zu berühren, da es sehr instabil ist und sofort Aggregate in die überstehende Lösung treten.

4.2.1.3 Charakterisierung der Partikel

Flowcytometrie

Mit Hilfe der Flowcytometrie kann sowohl die Größenverteilung als auch die Oberflächenbeschaffenheit der Partikel beurteilt werden. In Abbildung 19 ist die Häufigkeit gegen den linearen Forward Scatter (FS LIN) zu sehen, in Abbildung 20 FS LIN gegen den linearen Side Scatter (SS LIN).

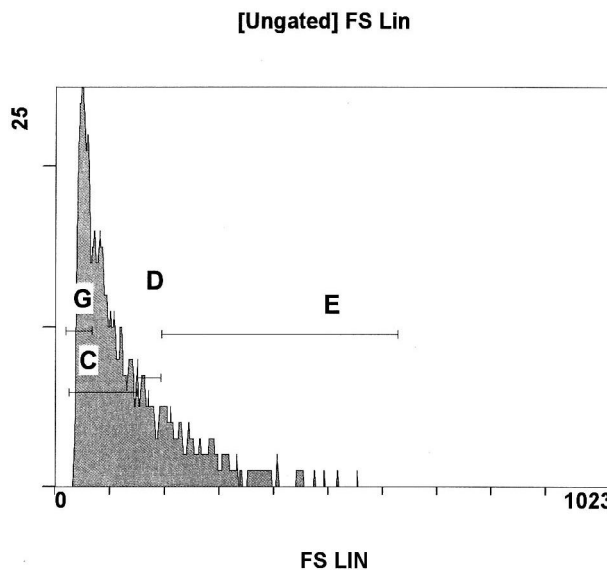


Abb. 19: FS LIN in der Flowcytometrie nach der Größentrennung

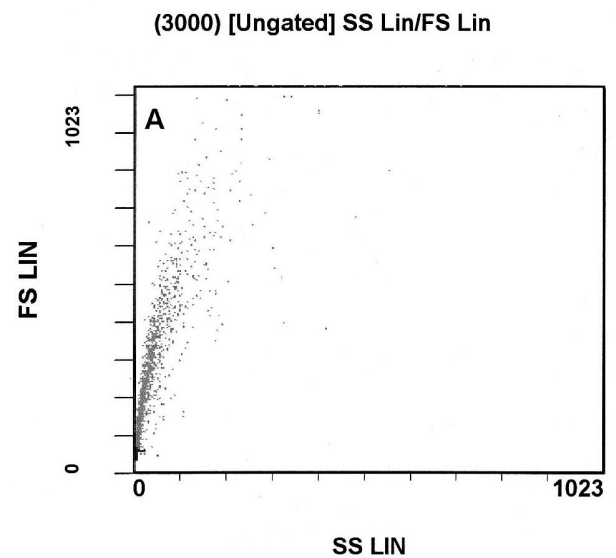


Abb. 20: FS LIN und SS LIN in der Flowcytometrie nach der Größentrennung

Die Abbildungen 19 und 20 zeigen typische Ergebnisse der Flowcytometrie nach der Größentrennung. Abbildung 19 zeigt den linearen Forward Scatter der Partikel, der die Größe widerspiegelt. Die relevante Partikelpopulation liegt in Gate C, der alle Partikel zwischen 1 und 3 μm umschließt (Eichung siehe Abschnitt 3.5.2). Nach der Größentrennung sind 50 bis 60% aller Partikel hier enthalten. In Abbildung 20 ist der Side Scatter gegen den Forward Scatter aufgetragen. Man sieht, dass die Partikel allgemein eine sehr glatte Oberfläche aufweisen. Nur große Partikel weisen eine Oberflächengranularität auf. Das kann darauf zurückgeführt werden, dass kleinere Partikel aneinander haften oder verschmolzen sind und somit keine Kugeloberfläche mehr besitzen.

Laserdiffraktometrie

Das Ergebnis der Laserdiffraktometrie wird als prozentuelle Verteilung der Partikel in Größenklassen angegeben. Außerdem wird ermittelt, welcher prozentuelle Anteil unterhalb einer bestimmten Maximalgröße liegt. Ein typisches Resultat ist in Tabelle 8 aufgelistet.

Tabelle 8: Größenverteilung nach der Größentrennung (Laserdiffraktometrie)

Durchmesser [μm]	Anteil [%]	Anteil (%)	Maximale Größe (μm)
45,00 - 31,00	0	90,00	9,68
31,00 - 22,00	0	83,33	8,09
22,00 - 16,00	0,4	75,00	6,52
16,00 - 11,00	4,8	50,00	4,09
11,00 - 7,50	14,3	25,00	2,58
7,50 - 5,30	13,6	16,67	2,04
5,30 - 3,70	23,3	10,00	1,66
3,70 - 2,60	18,3		
2,60 - 1,80	13,0		
1,80 - 1,30	8,8		
1,30 - 0,88	2,0		
0,88 - 0,60	1,2		
0,60 - 0,43	0,3		
0,43 - 0,30	0		
0,30 - 0,17	0		
0,17 - 0,10	0		

Rasterelektronenmikroskopie

Eine weitere Kontrolle ist die Rasterelektronenmikroskopie, die jedoch nicht nach jeder Größentrennung durchgeführt werden kann. Ein Beispiel ist in Abbildung 21 gezeigt.

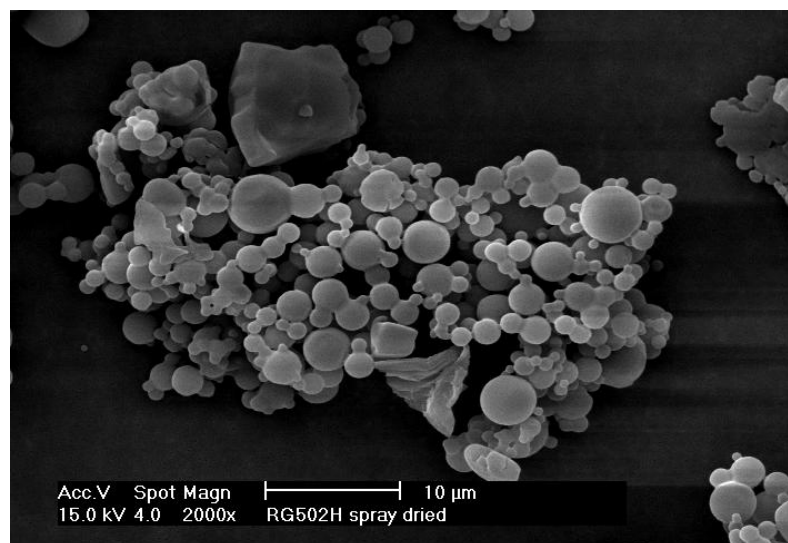


Abb. 21: PLGA-Mikropartikel nach der Größentrennung (SEM)

In Abbildung 21 ist zu sehen, dass die Partikel nach der Ultraschalleinwirkung aneinander geschmolzen sind und Aggregate bilden. Der Grund dafür ist vermutlich, dass trotz Kühlung der Probelösung bei der Verwendung von Ultraschall lokal so hohe Temperaturen erreicht werden, dass die Partikel angeschmolzen werden. Außerdem kann man erkennen, dass einige Partikel durch den Ultraschall komplett zerstört werden und Fragmente entstehen. Trotzdem ist eine Verwendung von Ultraschall unbedingt notwendig, da es keine andere brauchbare Methode zur Suspendierung der Partikel gibt. Auch nach der Größentrennung ist die Partikelgröße nicht absolut einheitlich, jedoch ist die Größenverteilung nun einheitlich genug, um eine reproduzierbare und quantifizierbare Kopplung durchführen zu können.

Konzentrationsbestimmung

Nach der Größentrennung wird die Partikelkonzentration durch Lyophilisation eines Aliquots ermittelt. Dabei ist jedoch zu berücksichtigen, dass häufig etwas niedrigere Konzentrationen als mit HPLC ermittelt werden. Dies kann unter anderem auf Verluste beim Belüften des Lyophilisators zurückzuführen sein.

4.2.2 Polystyren-Partikel

Die einzige notwendige Vorbereitung dieser Partikel ist das Entfernen von in der gekauften Suspension enthaltenen Stabilisatoren. Dieser Waschvorgang, der aus dreimaligem Zentrifugieren und Resuspendieren besteht, führt dazu, dass mit jedem Schritt die Pelletbildung etwas schlechter stattfindet und leicht an das Verhalten von PLGA-Partikel ohne Pluronic® erinnert. Wird Pluronic® für die Kopplung zugesetzt, so ist diese Veränderung umkehrbar. Diese Tatsache lässt darauf schließen, dass mit dieser Vorgangsweise alle vorhandenen Tenside ausreichend entfernt werden.

Da es sich um standardisierte Partikel handelt, ist keine aufwändige Charakterisierung wie bei PLGA-Partikeln notwendig. Dennoch werden die Partikel im Elektronenmikroskop untersucht. Exemplarische Aufnahmen der Partikel aller drei Größen sind in den Abbildungen 22 bis 24 zu sehen.

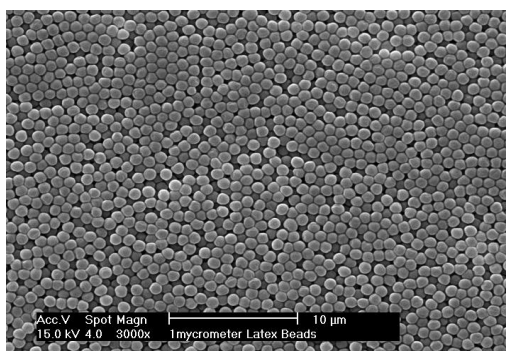


Abb. 22: 1 µm Latex-Partikel (SEMp)

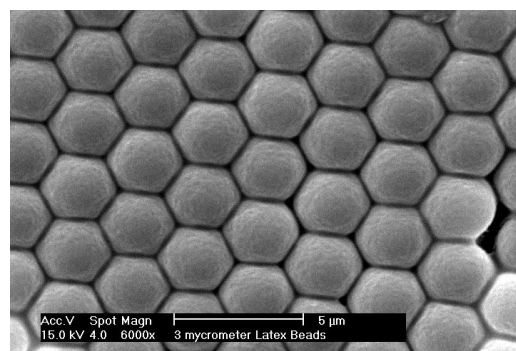


Abb. 23: 3 µm Latex-Partikel (SEM)

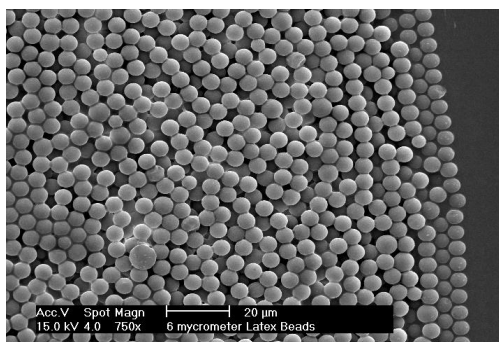


Abb. 24: 6 µm Latex-Partikel (SEM)

Bei der Untersuchung dieser Partikel ist eine genaue Charakterisierung der Oberflächenstrukturen möglich, da die Partikel unter dem Einfluss des Elektronenstrahls nicht zu schmelzen beginnen und eine hohe Auflösung möglich ist. Obwohl es sich bei allen drei Partikelsorten um carboxylierte Polystyren-Partikel der Handelsmarke Polybead® handelt, weisen alle unterschiedliche Charakteristika auf. Die in Abbildung 22 zu sehenden 1 µm Partikel sind sehr einheitlich in ihrer Größe und haben eine glatte Oberfläche, weichen aber von der perfekten Kugelgestalt ab und wirken etwas deformiert. Die 3 µm Partikel sind ebenfalls sehr regelmäßig, weisen jedoch eine wellig strukturierte Oberfläche auf, wie man bei sehr großen Vergrößerungen gut erkennen kann (Abbildung 23). Partikel mit einer Größe von 6 µm sind wiederum glatt (Abbildung 24), jedoch weisen sie immer wieder Auswüchse auf. Ihre Größenverteilung ist nicht so eng wie die der anderen Partikel (auch laut Herstellerfirma, siehe Abschnitt 3.1), und es sind regelmäßig kleinere und größere Partikel zu sehen.

4.2.3 Diskussion und Ausblick

PLGA-Partikel

Die Herstellung von PLGA-Partikeln ist sehr aufwändig: Zuerst erfolgt das Sprühtrocknen, im Anschluss sind die Suspendierung und die für unsere Untersuchung nötige Größentrennung notwendig. Die fertige Suspension ist jedoch aufgrund des Verzichts auf einen Stabilisator sehr instabil und nur wenige Tage haltbar, so dass regelmäßig eine frische Suspension hergestellt werden muss. Das Ergebnis dieser arbeitsintensiven Herstellung ist jedoch nicht wirklich optimal. Direkt nach dem Sprühtrocknen sind zwar sehr schöne, kugelförmige Partikel mit einer glatten Oberfläche vorhanden, jedoch können sie so nicht benutzt werden – eine Suspendierung ist notwendig. Da die PLGA-Partikel relativ hydrophob sind, sind sie schlecht benetzbar. Daher ist die Verwendung von Ultraschall, vor allem des sehr aggressiven Ultraschallstabs, unvermeidlich. Dies hat jedoch einen negativen Einfluss auf die Partikelqualität. Auch wenn die Größenverteilung nach dieser aufwändigen Trennung tatsächlich enger ist als zuvor, so schmelzen dabei die Partikel durch die trotz Kühlung

unvermeidliche lokale Wärmeentwicklung an der Oberfläche an, wodurch einzelne Partikel aneinander haften bleiben und auch sehr große Aggregate bilden können. Da es sich bei den Partikeln um Hohlkugeln handelt, platzen auch einige bei dieser Behandlung auf und es entstehen unbrauchbare Teilstücke. Da es jedoch keine andere Möglichkeit gibt, die Partikel tensidfrei zu suspendieren, müssen diese Nachteile für die vorliegende Untersuchung akzeptiert werden.

Die Analyse einer Partikelsuspension mittels Flowcytometrie hat sich als optimal erwiesen, weil im Gegensatz zur Laserstrahlbeugung dabei nur sehr geringe Mengen benötigt werden. Außerdem sind die dabei erhaltenen Ergebnisse einfach und gut vergleichbar.

Jede Suspension, die hergestellt wird, unterscheidet sich in ihrer Größenverteilung von allen anderen. Es ist nicht möglich, exakt reproduzierbare Suspensionen herzustellen. Diese Tatsache muss bei allen Anwendungen berücksichtigt werden.

Polystyren-Partikel

Im Gegensatz zu den PLGA-Partikeln handelt es sich bei diesen Standards um sehr einheitliche Teilchen mit einer sehr geringen Größenverteilung. Nur wenn man die Partikel von den zugesetzten Stabilisatoren reinigen will, ist eine Vorbereitung notwendig, die jedoch sehr schnell durchzuführen ist, da nur drei Zentrifugationsschritte zu je 10 Minuten notwendig sind. Die Verwendung ist sinnvoll, wenn eine exakt reproduzierbare Partikelsuspension mit definierter Größe und Größenverteilung notwendig ist.

4.3 Kovalente Kopplung von F-WGA an Polystyren-Partikel

Um das Größenspektrum häufig verwendeter Targeter abzudecken, soll die Kopplung von Liganden in drei verschiedenen Größenordnungen, also F-IgG, F-WGA und Fluoresceinamin beziehungsweise F-Cadaverin, an carboxylierte Polystyren-Partikel in den Größen 1 µm, 3 µm und 6 µm untersucht werden. Da jedoch, wie bereits bei den Vorversuchen in Abschnitt 4.2.2 erwähnt, die Kopplung bereits mit F-WGA problematisch ist, wurde dieses Lektin als einziger Ligand für diese Partikel herangezogen. Die Durchführung erfolgt wie in Abschnitt 3.4 beschrieben.

4.3.1 Besonderheiten bei der Durchführung

Im Allgemeinen sind diese Partikel wesentlich leichter zu handhaben als PLGA-Partikel. Es entstehen immer schöne Pellets beim Zentrifugieren, das Resuspendieren erfordert keinen Ultraschall, da durch Vortexen bereits eine homogene Suspension entsteht und die Partikel lagern sich nie an der Gefäßwand an. Die einzige Ausnahme bilden die 1 µm Partikel. Diese zeigen ein den PLGA-Partikeln leicht ähnliches Verhalten im Bezug auf die Pelletbildung. Dennoch sind kaum Unterschiede oder Verluste zwischen den Proben mit unterschiedlichen Mengen an Stabilisator zu erkennen. Nur bei der Verwendung von 5% Pluronic® treten Verluste auf. Die Viskosität einer Lösung ist umso größer, je mehr Pluronic® enthalten ist. Bei einer Konzentration von 5% ist sie bereits so hoch, dass das Sedimentieren dieser kleinen Partikel erschwert. Obwohl in jedem Fall ein Pellet vorhanden ist, ist die überstehende Lösung nach dem Zentrifugieren manchmal noch leicht trüb.

Die Pelletierung ist auch bei den Proben ohne und mit wenig Pluronic® ein wenig beeinträchtigt und erinnert an PLGA-Partikel. Das Verhalten ist aber nicht sehr stark ausgeprägt und es entstehen keine mit freiem Auge erkennbaren Verluste.

4.3.2 Charakterisierung

4.3.2.1 Flowcytometrie

Bestimmung der Kopplungseffizienz

Die Kopplung von F-WGA an Latex-Partikel in allen drei Größenklassen wird im Flowcytometer analysiert. Die entsprechende Kopplungseffizienz bei einer gegebenen Pluronic®-Konzentration ist in Prozent der maximalen Kopplung bei 0% Pluronic® in Tabelle 9 angegeben.

Tabelle 9: Pluronic®-abhängige Kopplungseffizienz von F-WGA an Latex-Partikel der Größen 1 µm, 3 µm und 6 µm in Prozent

	Partikelgröße	1 µm	3 µm	6 µm
	Pluronic® [%]	Fluoreszenz-intensität	Fluoreszenz-intensität	Fluoreszenz-intensität
Spezifische Bindung	0	100,00	100,00	100,00
	0,01	36,17	57,52	87,69
	0,025	59,57	56,64	93,14
	0,05	48,94	68,81	95,06
	0,1	48,94	69,91	97,75
	0,5	55,32	68,14	81,53
	1	42,55	55,97	63,30
	5	36,17	63,72	68,75
Unspezifische Bindung	0	29,79	10,72	4,05
	1	29,79	10,31	2,99

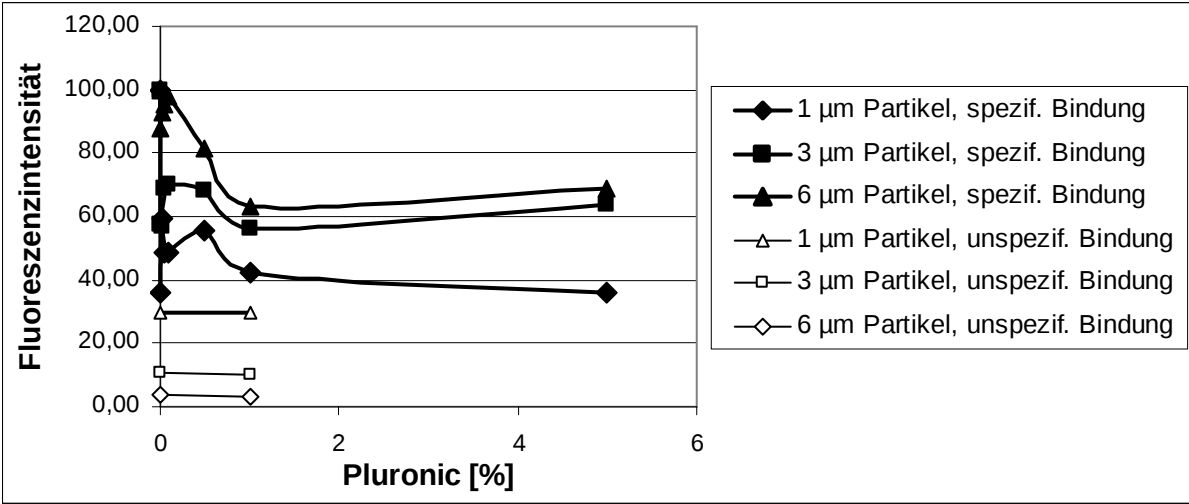


Abb. 25: Kopplungseffizienz von F-WGA an Latex-Partikel (1 µm, 3 µm, 6 µm) in Abhängigkeit der Pluronic®-Konzentration (Flowcytometrie)

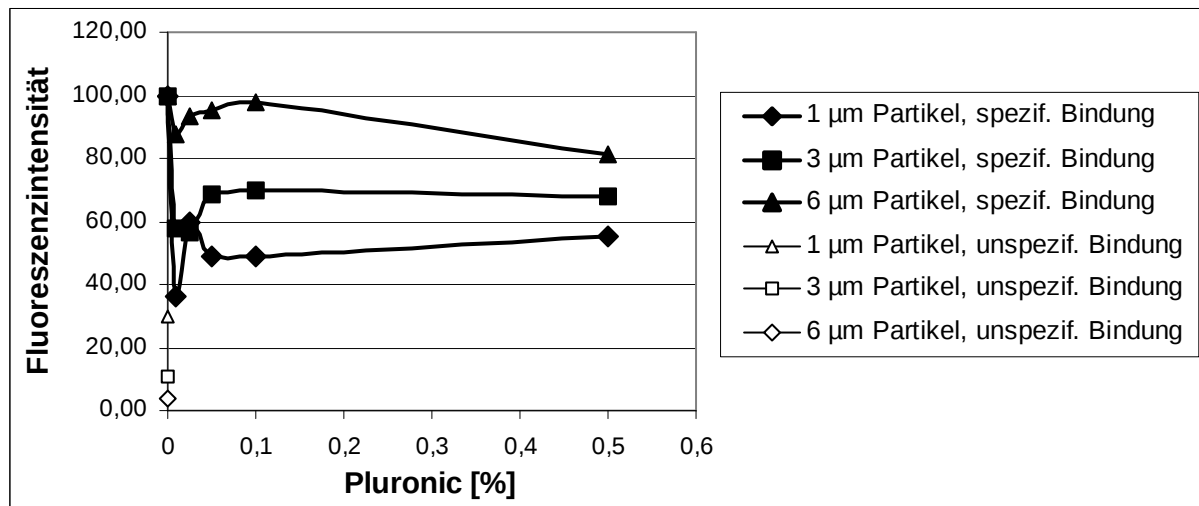


Abb. 26: Kopplungseffizienz von F-WGA an Latex-Partikel (1 µm, 3 µm, 6 µm) in Abhängigkeit kleiner Pluronic®-Konzentrationen (Flowcytometrie)

Die Abbildungen 25 und 26 zeigen typische Resultate. Zur Überprüfung wurde die Kopplung an 3 µm Partikel mehrfach wiederholt. Die zugehörigen Daten sind im Anhang A.2 in Tabelle 28 dokumentiert. Auch wenn die Kurven der drei Größenklassen an Partikeln nicht exakt gleich sind, so ist doch eine sehr ähnliche Tendenz zu erkennen. Ohne Pluronic® ist die Kopplung maximal, mit wenig Pluronic® wird sie unverhältnismäßig stark reduziert. Erhöht man die Pluronic®-Konzentration, so ist wieder eine Verbesserung zu erkennen, bis sehr hohe Konzentrationen wieder zu einer Abnahme führen. Diese Schwankungen können nicht ausschließlich durch Veränderungen in der konzentrationsabhängigen Schichtdicke von Pluronic® hervorgerufen werden. Eine mögliche Erklärung sind die Oberflächeneigenschaften der Partikel, die sich von PLGA unterscheiden. Die durch Anlagerung von Pluronic® geänderte Hydrophobizität der Oberfläche kann die Interaktion der Kopplungspartner beeinflussen. Dadurch gelangt der Ligand mit unterschiedlich hoher Wahrscheinlichkeit nahe genug an die Partikeloberfläche heran, damit die Reaktion stattfinden kann. Da diese Veränderungen sehr komplex sein können, sind Schwankungen in der Kopplungseffizienz nicht verwunderlich. Eine weitere Problematik ist das Auftreten von zwei Fluoreszenzpeaks in der jeweiligen anhand ihrer Größe ausgewählten Partikelpopulation. Dieses Phänomen wird in weiterer Folge näher untersucht (siehe Abbildungen 33 bis 38).

Ermittlung von Größenverteilung und Oberflächenstruktur:

Auch bei diesen Standard-Partikeln ist die Größenverteilung, die mittels Flowcytometrie ermittelt werden kann, interessant. Da diese Partikel definierten Größenklassen angehören, ist eine Quervernetzung der Partikel über F-WGA leicht zu erkennen. Als Beispiel sind in den folgenden Abbildungen Partikel in allen drei Größen, an die ohne Pluronic® F-WGA gekoppelt wurde, die Größen gegenüber der Häufigkeit (Linearer Forward Scatter) und der

Side Scatter gegen den Forward Scatter zur Charakterisierung der Oberflächenstruktur für alle drei Partikelgrößen aufgetragen.

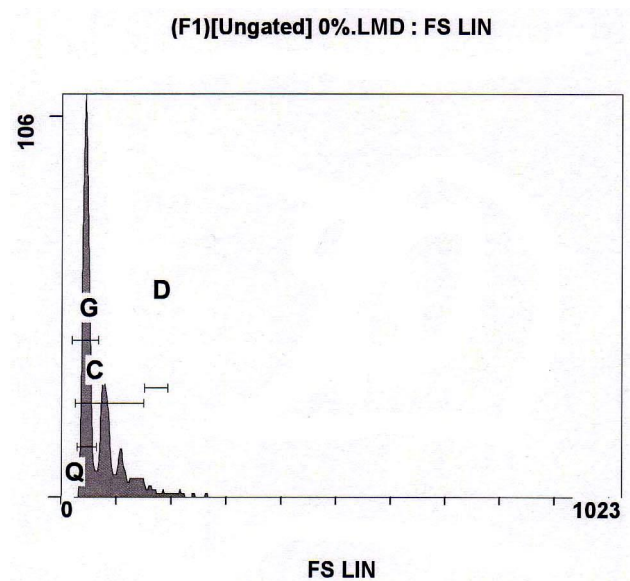


Abb. 27: FS LIN zur Darstellung der Größenverteilung F-WGA gekoppelter 1 µm Latex-Partikel (Flowcytometrie)

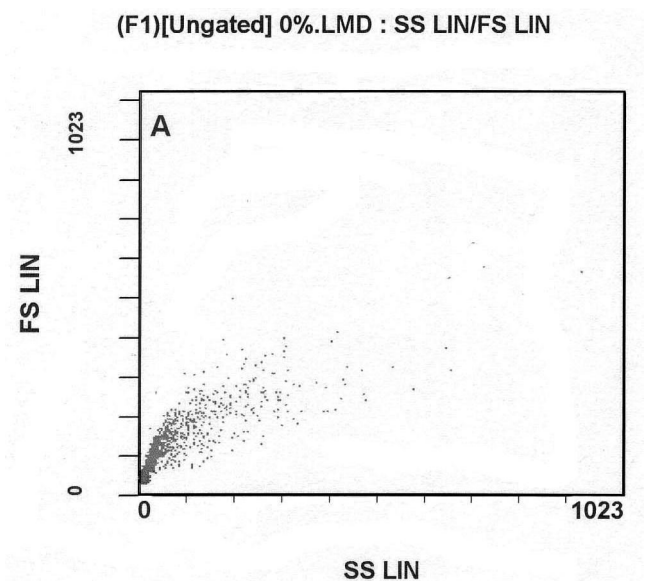


Abb. 28: SS gegen FS zur Charakterisierung der Oberflächenstruktur F-WGA gekoppelter 1 µm Latex-Partikel (Flowcytometrie)

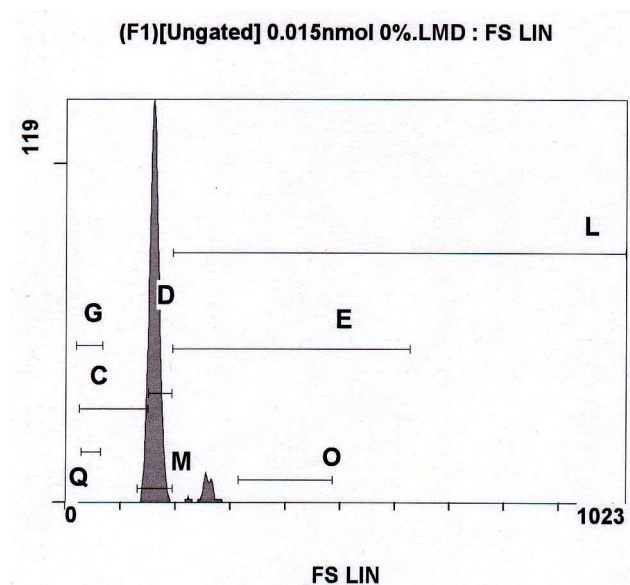


Abb. 29: FS LIN zur Darstellung der Größenverteilung F-WGA gekoppelter 3 µm Latex-Partikel (Flowcytometrie)

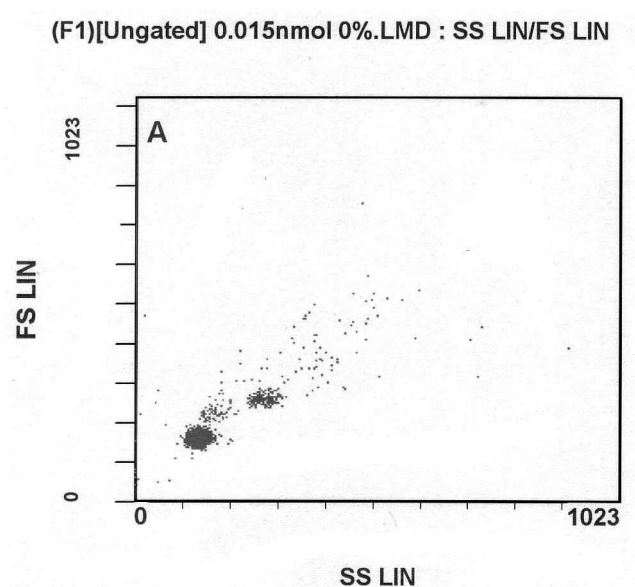


Abb. 30: SS gegen FS zur Charakterisierung der Oberflächenstruktur F-WGA gekoppelter 3 µm Latex-Partikel (Flowcytometrie)

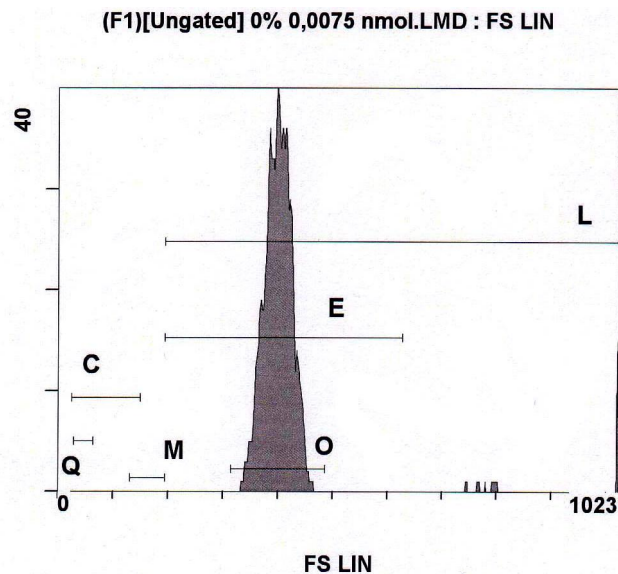


Abb. 31: FS LIN zur Darstellung der Größenverteilung F-WGA gekoppelter 6 µm Latex-Partikel (Flowcytometrie)

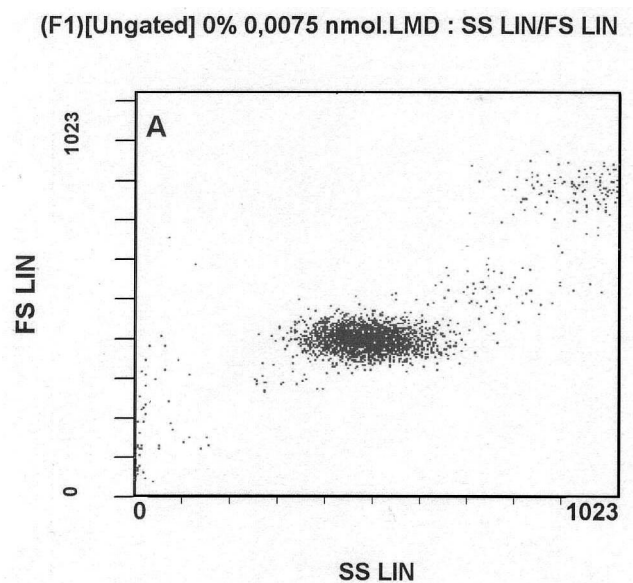


Abb. 32: SS gegen FS zur Charakterisierung der Oberflächenstruktur F-WGA gekoppelter 6 µm Latex-Partikel (Flowcytometrie)

Auf diesen Abbildungen ist zu erkennen, dass, wenn auch in geringem Ausmaß, überall eine Quervernetzung der Partikel stattfindet. Am deutlichsten ist dieses Phänomen bei den 1 µm Partikeln zu sehen. Hier bilden sich, wie in Abbildung 27 zu sehen, Aggregate, die vermutlich aus zwei, drei oder mehreren Partikeln bestehen. Der Großteil jedoch (52%) bleibt als freier Partikel bestehen, und die Vernetzung mehrerer Partikel findet in geringerem Ausmaß statt als jene von nur zwei Partikeln. In Abbildung 28 sieht man keine eindeutige Einteilung dieser Größenklassen, da sie so eng beieinander liegen. Dass jedoch der Side Scatter mit zunehmender Größe ebenfalls größer wird, spricht für die angesprochene Quervernetzung – zwei aneinanderhängende Partikel weisen eine deutlich höhere Granularität auf als einzelne Kugeln. Dieses Phänomen ist noch besser bei den Partikeln mit 3 µm zu beobachten. In Abbildung 29 sind Partikel verschiedener Größen zu erkennen (auch in Abbildung 30 zu sehen), die sich auch in ihrer Oberflächenstruktur so stark unterscheiden, dass zwei verschiedene Populationen ausgebildet werden. Bei den 6 µm Partikeln ist dieses Phänomen nur bedingt zu beobachten, da die doppelt so großen Partikel bereits außerhalb der Detektionsgrößen liegen (Abbildungen 31 und 32).

Charakterisierung verschiedener Partikelpopulationen gleicher Größe:

Wie bereits erwähnt, fällt bei der Detektion der Fluoreszenz auf, dass nahezu bei allen Proben die Partikel zwei Peaks mit unterschiedlicher Fluoreszenzintensität aufweisen. Das ist nur dann möglich, wenn zwei Partikelpopulationen vorhanden sind, die gleich groß sind, aber eine andere Kopplungskapazität aufweisen, indem sie zum Beispiel eine andere Zahl freier Carboxylgruppen an ihrer Oberfläche aufweisen.

Durch das Legen verschiedener Gates kann die Vermutung, dass zwei unterschiedliche Populationen vorliegen, näher untersucht werden. In dem in den Abbildungen 33 bis 38 gezeigten Fall handelt es sich um F-WGA gekoppelte 3 μ m Partikel mit 0,01% Pluronic®.

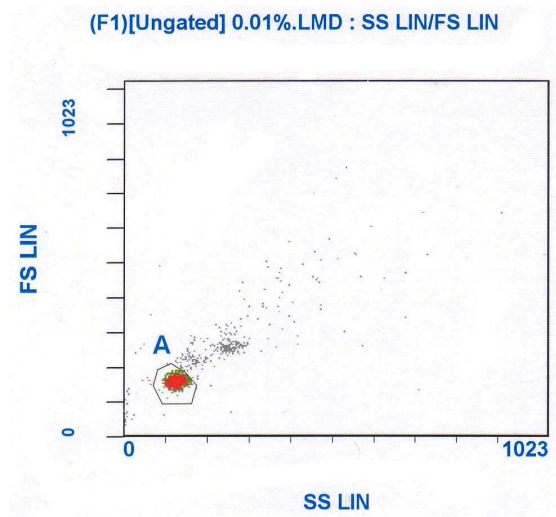


Abb. 33: SS gegen FS zur Charakterisierung verschiedener Partikelpopulationen, 3 μ m Partikel, F-WGA gekoppelt (Flowcytometrie)

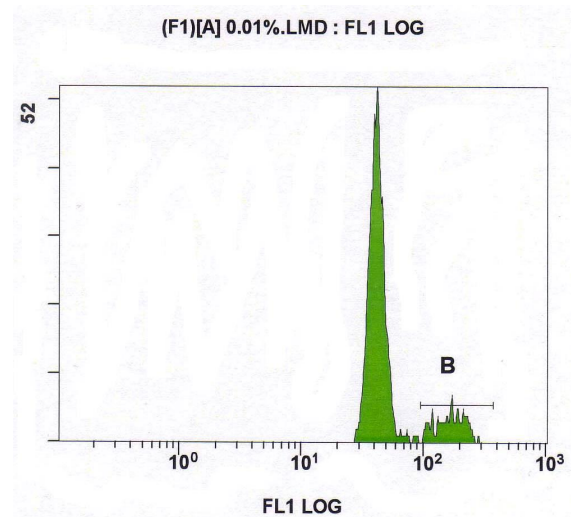


Abb. 34: Fluoreszenzintensität und Häufigkeit der Partikel in Gate A, 3 μ m Partikel, F-WGA gekoppelt (Flowcytometrie)

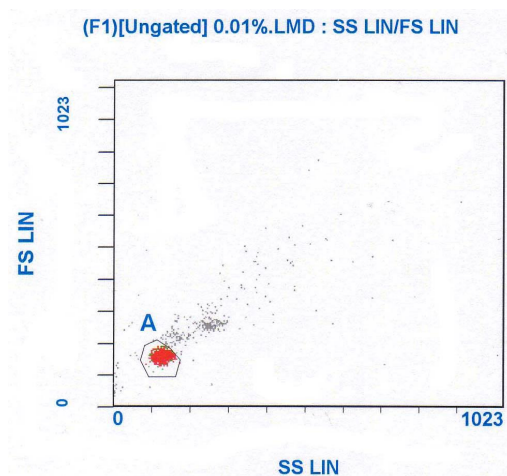


Abb. 35: SS gegen FS zur Charakterisierung verschiedener Partikelpopulationen, 3 μ m Partikel, F-WGA gekoppelt (Flowcytometrie)

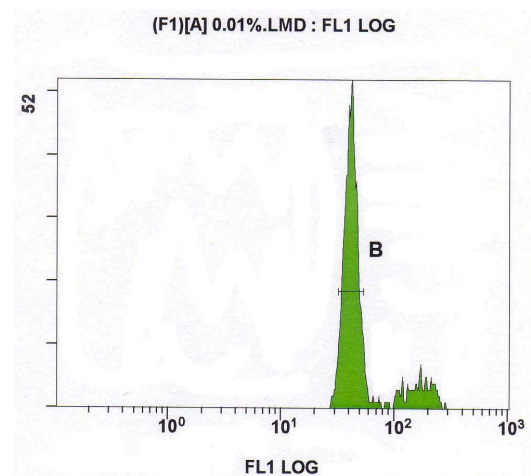


Abb. 36: Fluoreszenzintensität und Häufigkeit der Partikel in Gate A, 3 μ m Partikel, F-WGA gekoppelt (Flowcytometrie)

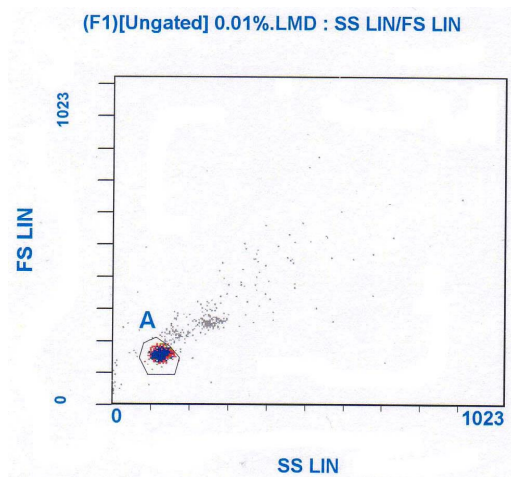


Abb. 37: SS gegen FS zur Charakterisierung verschiedener Partikelpopulationen, 3 μ m Partikel, F-WGA gekoppelt (Flowcytometrie)

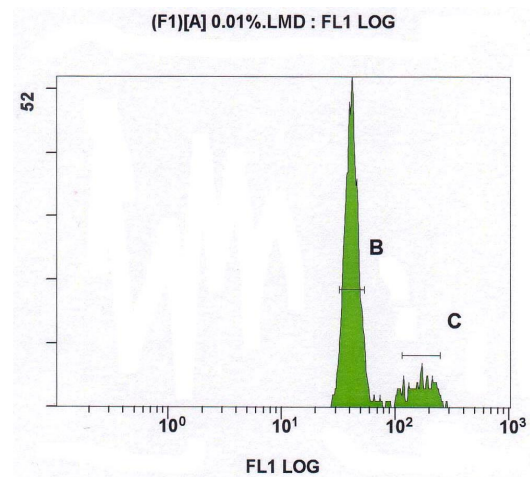


Abb. 38: Fluoreszenzintensität und Häufigkeit der Partikel in Gate A, 3 μ m Partikel, F-WGA gekoppelt (Flowcytometrie)

In Gate A sind jene Partikel erfasst, die eine Größe von 3 μ m aufweisen. Dies wird durch das Verhalten der Partikel im linearen FS bestätigt, der mit Standardpartikeln geeicht wurde. Die Fluoreszenz dieser Partikel ist in den Abbildungen 34, 36 und 38 zu sehen. Es sind deutlich zwei verschiedene Peaks zu erkennen, wobei jener mit größerer Intensität niedrigere Fluoreszenz aufweist und umgekehrt. Durch das Legen von Gates über entweder den kleineren (Abbildung 34) oder größeren (Abbildung 36) Peak kann die dadurch ausgewählte Population im FS LIN/ SS LIN Plot anhand anderer Farbgebung unterschieden werden. Alle fluoreszierenden Partikel in Gate A sind grün dargestellt. Die Partikel, die aber zusätzlich in Gate B der Abbildungen 34 und 36 liegen, sind rot dargestellt. Es ist somit zu erkennen, dass sowohl die Partikel mit niedriger Fluoreszenzintensität (Abbildungen 35 und 36) sowie auch jene mit hoher (Abbildungen 33 und 34) in der durch Gate A ausgewählten Population liegen und sich dennoch anders verhalten. Zusammengefasst ist dieses Phänomen noch einmal in den Abbildungen 37 und 38. Partikel aus Gate B, also jene mit niedriger Fluoreszenzintensität und großer Häufigkeit, sind rot gekennzeichnet, jene von Gate C mit höherer Fluoreszenzintensität aber geringerer Häufigkeit, sind blau. Aus der Kombination dieser Bilder ist zu sehen, dass jene Partikel, die stärker koppeln, in einem etwas stärker begrenzten Größenbereich liegen, wohingegen die größere Population, die etwas schlechter koppelt, etwas breiter in ihrer Größenverteilung streut.

Anhand dieser Abbildungen ist ersichtlich, dass tatsächlich zwei Populationen vorliegen, die sich in ihren Kopplungseigenschaften unterscheiden. Um diese Problematik näher charakterisieren zu können, wurde Rücksprache mit der Herstellungsfirma Polysciences gehalten, die jedoch erfolglos verlief. Die Vermutung, dass herstellungsbedingt die Anzahl zugänglicher Carboxylgruppen verschieden sein könnte, wurde nicht kommentiert. Da alle

Partikel aller drei Größen dieses Phänomen zeigen, soll in weiterer Folge im Rahmen dieser Untersuchung auf die Kopplung weiterer Liganden an Latex-Partikel verzichtet werden.

4.3.2.2 Rasterelektronenmikroskopie

Da die Partikel sich in Anwesenheit von Pluronic® nicht analog zu den PLGA-Partikeln verhalten, wird ihre Oberfläche im Elektronenmikroskop näher untersucht. Die genaue Oberflächenstruktur ist auf den Abbildungen 22 bis 24 in Abschnitt 4.2.2 zu sehen. Die dort besprochenen Unterschiede in der Oberflächenbeschaffenheit können ebenfalls einen Einfluss auf ein nicht einheitliches Verhalten während der Kopplung haben. Exemplarisch für Polystyren-Partikel nach der Kopplung sind in den Abbildung 39 und 40 F-WGA gekoppelte 3 µm Partikel ohne und mit 1% Pluronic® zu sehen.

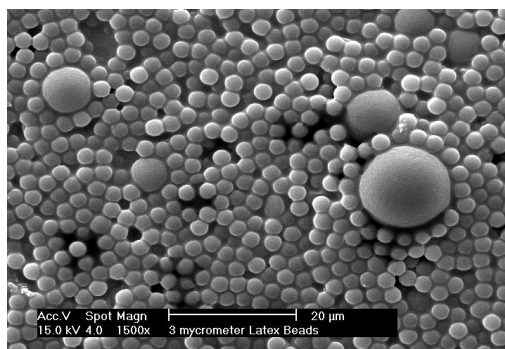


Abb. 39: 3 µm Latex-Partikel, F-WGA gekoppelt bei 0% Pluronic® (SEM)

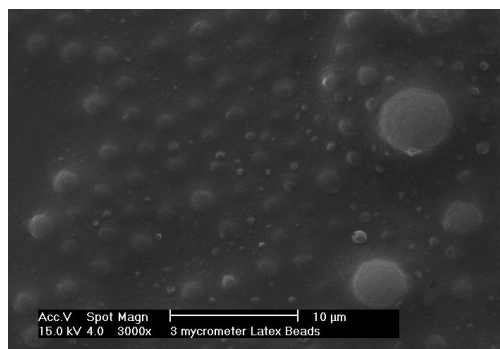


Abb. 40: 3 µm Latex-Partikel, F-WGA gekoppelt bei 1% Pluronic® (SEM)

Diese Partikel sind im Gegensatz zu den nicht gekoppelten Partikeln in eine Matrix eingebettet. In Gegenwart von 1% Pluronic® ist diese besonders stark ausgeprägt, so dass die meisten Partikel davon überschichtet sind. Vermutlich handelt es sich dabei um eine Kombination von Puffersalzen und, wenn vorhanden, Pluronic®. Es ist jedoch bemerkenswert, dass bei der Mikroskopie von F-WGA gekoppelten PLGA-Partikeln keine vergleichbare Matrix zu sehen ist (siehe Abbildung 51 und 52), auch wenn in beiden Fällen die Partikel vor der Mikroskopie nicht gewaschen wurden. Weiters fällt auf, dass zwischen den äußerst regelmäßigen Partikeln plötzlich auch große Partikel auftauchen. Diese sind ebenfalls in der Matrix eingebettet und teilweise von den kleinen Partikeln überlagert, wodurch ausgeschlossen werden kann, dass sie durch unvorsichtiges Hantieren von anderen Proben übertragen wurden. Eine wirkliche Erklärung für dieses Phänomen konnte nicht gefunden werden.

4.3.3 Diskussion und Ausblick

Bei der Kopplung von F-WGA an Latex-Partikel verschiedener Größe kann ein Effekt von Pluronic® auf die Kopplungseffizienz bewiesen werden. Allerdings kann bei Latex-Partikeln

keine stetige Abnahme der Kopplungseffizienz mit steigender Stabilisatorkonzentration beobachtet werden. Vermutlich wird dieses Verhalten durch viele einzelne Faktoren hervorgerufen. Vermutlich spielen die physikalischen Oberflächeneigenschaften der Partikel, wie zum Beispiel die Hydrophobizität, eine Rolle. Nachdem es diese Einflüsse nicht erlauben, ausschließlich den Effekt von Pluronic® über einen breiten Konzentrationsbereich zu untersuchen, erscheint die Verwendung dieser Partikel für diese Fragestellung nicht sinnvoll.

Ein weiterer Aspekt dabei ist das Vorhandensein von zwei Populationen von Partikeln gleicher Größe, die sich durch ihre Kopplungseffizienz unterscheiden. Dies wird durch die Detektion von zwei Peaks unterschiedlicher Fluoreszenzintensität ersichtlich. Dieses Phänomen kann ebenfalls bei der Untersuchung spezifischer Eigenschaften von Pluronic® stören.

Da die Partikel eine sehr enge Größenverteilung haben, kann sehr gut nachgewiesen werden, dass, wenn auch in geringem Ausmaß, eine Quervernetzung von zwei bis drei Partikeln aufgrund ihrer Oberflächeneigenschaften oder wegen Resten an Kopplungsreagenzien möglich ist. Auch für die Untersuchung dieses Phänomens ist Flowcytometrie optimal geeignet.

Vor der weiteren Verwendung dieser Partikel wäre es sinnvoll, zusätzliche Proben elektronenmikroskopisch zu untersuchen. Das Vorhandensein unverhältnismäßig großer Partikel nach der Kopplung ist nicht zu erklären. Es sollte daher abgeklärt werden, ob dieses Phänomen nach jeder Kopplung auftritt oder eine einmalige Ausnahme ist. Außerdem sollten die Partikel vor der Mikroskopie mit partikelfiltrierte Wasser gründlich gewaschen werden, um möglicherweise die Matrix zu entfernen.

Obwohl die verwendeten Latex-Partikel aus den beschriebenen Gründen für die vorliegende Arbeit nicht geeignet sind, können sie sicherlich als Modell für PLGA-Partikel oder für Vorversuche verwendet werden.

4.4 Kovalente Kopplung von Liganden unterschiedlicher Größe an PLGA-Partikel

Die Kopplung von F-WGA und F-IgG wurde im 10 mg Maßstab durchgeführt, bei jener mit F-Cadaverin wurden 5 mg Partikel verwendet.

4.4.1 Besonderheiten bei der Durchführung

Während der Kopplung ist ein unterschiedliches Verhalten der Proben in Abhängigkeit der Pluronic®-Konzentration zu beobachten. Ohne Pluronic® und bei den niedrigen Konzentrationen 0,01% und 0,025% entstehen beim Zentrifugieren Pellets, die sich an der Wand des Gefäßes hinaufziehen und sehr leicht durch den Zug der Pipette beim Abnehmen des Überstandes zerstört werden. Dadurch entstehen relativ große Verluste an Mikropartikeln, insbesondere während der Reinigungsschritte, was sich rein makroskopisch in einer weniger intensiven Trübung der Suspensionen bemerkbar macht.

Im Gegensatz dazu lassen sich die Proben mit mittlerer Pluronic®-Konzentration sehr einfach bearbeiten. Die besten Eigenschaften sind üblicherweise bei 0,1% Pluronic® zu beobachten. Es bilden sich Pellets aus, die stabil genug sind, um nicht beim Abnehmen des Überstandes sofort zerstört zu werden, aber sich dennoch sehr leicht wieder resuspendieren lassen.

Bei sehr hoher Konzentration, insbesondere bei 5% Pluronic® lässt sich wieder eine leichte Verschlechterung beobachten, was darauf zurückzuführen ist, dass die dadurch erhöhte Viskosität die Sedimentation während der Zentrifugation beeinträchtigt und die Partikel eher locker im Pellet sitzen. Es ist jedoch kein Anheften von Partikeln an der Gefäßwand hinauf zu sehen.

Bei den Proben, in denen das unspezifische Bindungsverhalten der Liganden untersucht wird, ist dieser Unterschied jedoch nicht so stark zu bemerken. Im Allgemeinen sind diese Proben gut zu bearbeiten und bilden auch während der zweistündigen Inkubation, die der Aktivierung bei der kovalenten Kopplung dient, immer feste, aber gut resuspendierbare Pellets. Während der Aktivierung werden die wenigen freien, stabilisierenden Carboxylgruppen an der Oberfläche der Partikel so modifiziert, dass ungeladene Aktivester entstehen. Die ohnehin schon sehr hydrophoben Partikel werden dadurch noch instabiler in der wässrigen Umgebung, da keine elektrostatische Stabilisierung mehr stattfindet. Besonders gut sichtbar ist der Effekt ohne oder mit wenig Pluronic®, da dadurch auch die zweite Möglichkeit der Stabilisierung wegfällt. Bei den Versuchen die unspezifische Bindung betreffend fällt dieser Aktivierungsschritt und somit ein kritischer Bearbeitungsschritt weg. Beobachtet man die Trübung der Proben, so ist mit freiem Auge kein oder nur ein sehr geringer Unterschied zwischen 0% und 1% Pluronic® zu erkennen. Daraus kann man

schließen, dass besonders dieser Schritt die unterschiedlichen Partikelverluste bewirkt und hier Pluronic® eine entscheidende Rolle spielt.

Nicht nur beim Zentrifugieren, sondern auch beim Resuspendieren zeigen die Proben unterschiedliches Verhalten. Bei allen Proben ist es wichtig, sie bereits vor der Ultraschallbehandlung gut mit Hilfe des Vortexer zu suspendieren. Dabei ist es vorteilhaft, die Eppendorf-Gefäße leicht schräg und mit dem Pellet an die Oberseite zeigend zu halten. In das Ultraschallbad sollen die Gefäße so gelegt werden, dass die Pellets, wenn noch vorhanden, gut in das Wasserbad eintauchen. Nach etwa einer halben Minute sollen die Proben etwas durchmischt werden, damit alle Flächen im Gefäß mit der Suspension in Berührung kommen und Partikel, die an der Wand kleben, abgelöst werden. Danach sollte die Suspension makroskopisch kontrolliert werden. Etwaige Pelletreste, die vor allem ohne Pluronic® oder bei sehr hohen Konzentrationen, nie aber bei den Proben auf unspezifische Bindung, auftreten, werden meist durch erneutes Vortexen zerkleinert. Ist das nicht der Fall, sollte eine weitere Minute mit Ultraschall behandelt werden, bis eine homogene Suspension entsteht, so dass die Partikeloberfläche für die jeweiligen Modifikationsschritte zugänglich ist. Es hat sich außerdem als sinnvoll erwiesen, vor jeder Zentrifugation die Proben 1 min in das Ultraschallbad bei 50% Leistung zu legen. Dadurch nimmt die Menge an Partikeln an der Gefäßwand ab und das Abnehmen der Überstände wird erleichtert.

Es werden Liganden in drei verschiedenen Größenordnungen an PLGA-Partikel kovalent gekoppelt und deren unspezifische Bindung untersucht. Die jeweils verwendete Partikelsuspension wird vor jeder Kopplung frisch vorbereitet und hat daher immer eine andere, wenn auch sehr ähnliche, Größenverteilung. Die Durchführung erfolgt wie in Abschnitt 3.3 und 3.4 beschrieben mit den in den Vorversuchen ermittelten Ligandenkonzentrationen (Abschnitt 4.1.2).

4.4.2 Charakterisierung

4.4.2.1 Flowcytometrie

Mittels Flowcytometrie werden die Partikel direkt nach der Herstellung untersucht.

PLGA-Partikel unterscheiden sich in ihrem Verhalten im Flowcytometer von den Polystyren-Standards. Besonders auffällig ist, dass sie sich vermehrt im Gerät ablagern. Besonders davon betroffen ist jener Teil, der zum Ansaugen der Partikelsuspension in diese eintaucht. Um das Verschleppen von Partikeln einer Probe in eine andere zu vermeiden, muss nach jeder Messung gewaschen werden. Es hat sich gezeigt, dass eine besonders gute Reinigung erzielt werden kann, wenn die Waschlösung regelmäßig ersetzt wird. Bei der Messung wird immer mit den Proben mit höchster Pluronic®-Konzentration begonnen. Für jede Konzentration gibt es drei Proben; nach jeder wird gewaschen. Danach wird mit frischer

Waschlösung erneut gewaschen, bevor die Proben mit anderer Pluronic®-Konzentration gemessen werden, um Partikelreste zu entfernen. So kann einer Verschleppung von Partikeln gut entgegen gewirkt werden.

Kopplungseffizienz

Durch den Vergleich der relativen Fluoreszenzintensität wird die Kopplungseffizienz bei der jeweiligen Pluronic®-Konzentration für jeden der drei Liganden ermittelt. Es kann die gewünschte Partikelpopulation ausgewählt und nur diese näher charakterisiert werden. In diesem Fall handelt es sich dabei um Partikel der Größe von 1 bis 3 µm. Dadurch werden Veränderungen während der Kopplung, wie die Bildung von Aggregaten, der Quervernetzung von Partikeln über die Liganden mit Resten der Kopplungsreagenzien, oder Verluste kleiner Partikel nicht berücksichtigt. Es werden nur jene Partikel untersucht, die auch wirklich vergleichbar sind.

Da eine Abnahme der Kopplung mit erhöhter Pluronic®-Konzentration stattfindet, wird die Effizienz bei 0% Pluronic® gleich 100% gesetzt und alle anderen Werte werden darauf bezogen (siehe Tabelle 10 und Abbildungen 41 und 42). Die absoluten gemessenen Werte sind im Anhang A.3 in den Tabellen zu sehen.

Tabelle 10: Pluronic®-abhängige Bindung von F-WGA, F-IgG und F-Cadaverin an PLGA-Partikel in Prozent (Flowcytometrie)

	Pluronic® [%]	F-WGA		F-IgG	
		Kopplungs-effizienz	Standard-abweichung	Kopplungs-effizienz	Standard-abweichung
Spezifische Bindung	0	100,00	4,74	100,00	8,71
	0,01	89,92	4,34	104,61	4,07
	0,025	73,14	8,27	99,98	9,10
	0,05	75,22	0,80	89,99	5,46
	0,1	99,57	24,28	87,17	2,28
	0,5	62,88	2,98	60,48	3,16
	1	67,42	1,88	48,72	7,65
	5	55,73	5,80	34,78	2,89
Unspezifische Bindung	0	3,45	0,20	23,95	2,59
	1	3,72	0,59	8,39	0,52

Spezifische Bindung	Pluronic® [%]	F-Cadaverin	
		Kopplungseffizienz	Standardabweichung
	0	100,00	13,25
	0,01	97,53	23,80
	0,025	88,01	1,92
	0,05	106,86	13,72
	0,1	95,98	5,22
	0,5	74,74	4,78
	1	64,50	6,68
	5	50,77	5,44
Unspezifische Bindung	0	23,51	1,36
	1	22,86	1,00

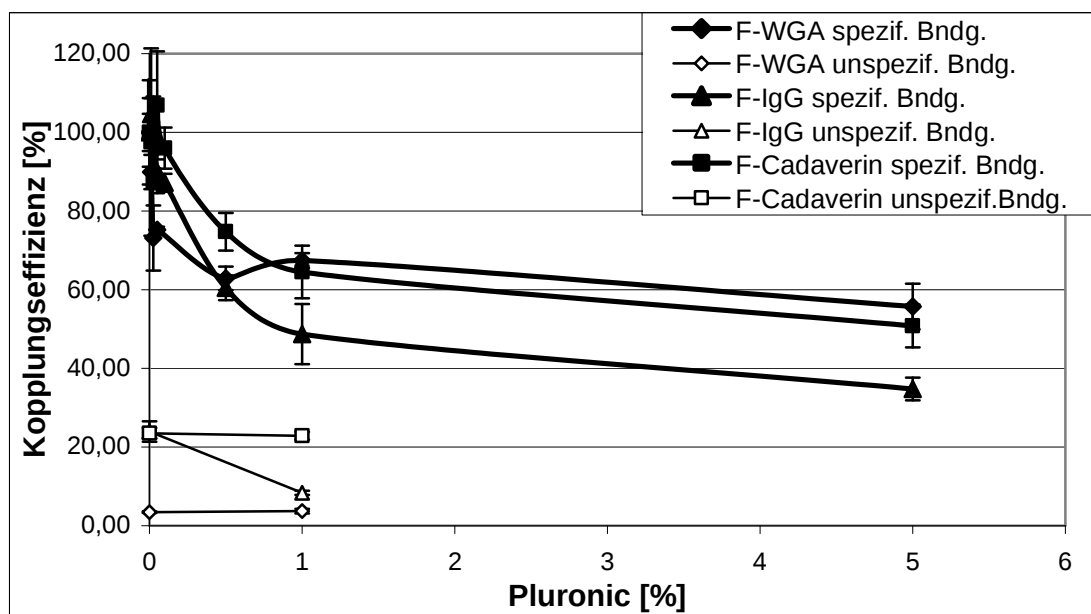


Abb. 41: Kopplungseffizienz in Abhängigkeit der Pluronic®-Konzentration, Kurve der Mittelwerte inklusive Standardabweichung (Flowcytometrie)

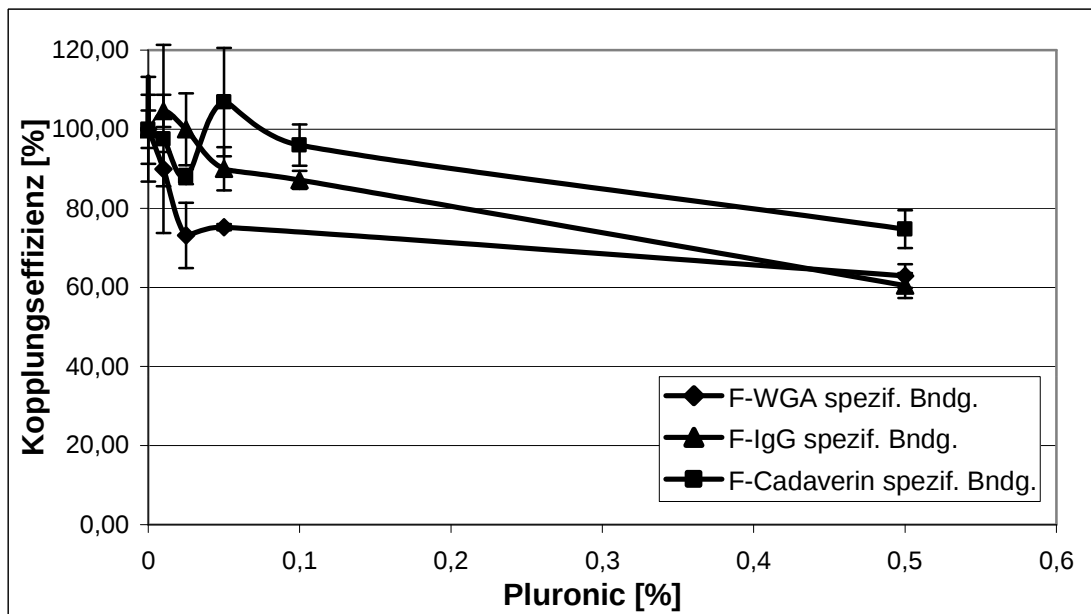


Abb. 42: Kopplungseffizienz in Abhängigkeit kleiner Pluronic®-Konzentrationen, Kurve der Mittelwerte inklusive Standardabweichung (Flowcytometrie)

Besonders auffällig sind sehr große Standardabweichungen und das Auftreten von vielen Ausreißern. Dennoch ist eine eindeutige Pluronic®-abhängige Tendenz zu erkennen: Die Kopplungseffizienz nimmt mit steigender Konzentration von Pluronic® bei allen drei Liganden ab. Bei der Kopplung von F-WGA ist besonders im sehr kleinen Konzentrationsbereich eine starke Abnahme auffällig. Bereits bei 0,025 % Pluronic® sind nur mehr etwa 70% des Liganden gebunden. Bei der höchsten untersuchten Konzentration, 5%, wird nur mehr knapp mehr als die Hälfte gebunden. Bei F-IgG hingegen ist die Abnahme zu Beginn weniger stark, jedoch sinkt die Effizienz sehr kontinuierlich auf etwa ein Drittel. Bei F-Cadaverin ist bis zu 0,1% nahezu keine Änderung zu bemerken. Dieser Bereich ist starken Schwankungen unterworfen, jedoch ist unter Berücksichtigung der Standardabweichungen keine Änderung der Effizienz zu erkennen. Bei höheren Pluronic®-Konzentrationen tritt jedoch auch hier eine Reduktion der Kopplung auf etwa die Hälfte auf.

Die großen Standardabweichungen und Schwankungen sind bei diesem Versuch unvermeidlich. In großem Ausmaß ausschlaggebend dafür sind vermutlich die Mikropartikel, deren Größenverteilung in der Suspension nie exakt ident sein kann, weil sie permanenten Veränderung unterworfen und nicht stabil sind.

Der Einfluss von Pluronic® auf die Kopplung von verschiedenen Liganden an PLGA-Mikropartikel ist dennoch reproduzierbar. Eine mögliche Erklärung dafür ist die Anlagerung von Pluronic® an die Oberfläche der hydrophoben Partikel mit dem ebenfalls hydrophoben Mittelteil des Pluronic®. Die hydrophilen Seitenteile des Pluronic® hingegen stehen frei in die umgebende Lösung hinaus und können etwaige Liganden sterisch daran hindern, sich der Partikeloberfläche zu nähern. In nur geringen Konzentrationen ist der Effekt je nach Ligand

unterschiedlich. Eine mögliche Erklärung dafür ist der unterschiedliche Hydrophilie-Charakter der Liganden und ihre dadurch unterschiedliche Affinität zur Partikeloberfläche. Kleine Pluronic®-Konzentrationen können durch Anlagerung an das Molekül eine Veränderung der Hydrophilie herbeiführen und somit die Kopplungseffizienz beeinflussen.

Veränderungen der Größenverteilung

Mit Hilfe der Flowcytometrie können auch Veränderungen der Partikelsuspension untersucht werden. Die makroskopische Betrachtung des Endproduktes lässt wie oben erwähnt darauf schließen, dass bei wenig Pluronic® größere Partikelverluste auftreten. Durch das Legen geeigneter Gates kann verglichen werden, wie sich die Größenverteilung verändert.

Tabelle 11: Prozentuelle Zu- oder Abnahme der Partikelzahl innerhalb der gegebenen Größenklassen

		Pluronic®-Konzentration [%]	0	0,01	0,025	0,05
		Größenklasse				
Spezifische Bindung	1 µm		-46,69	-55,79	-51,93	-46,90
	1 – 3 µm		-40,73	-47,76	-43,72	-36,89
	3 µm		-23,61	-23,79	-19,17	-11,11
	3 – 10 µm		+83,03	+97,88	+90,80	+75,83
Unspezifische Bindung	1 µm		-10,09	-3,74		
	1 – 3 µm		-4,94	+0,05		
	3 µm		+7,71	+7,15		
	3 – 10 µm		+10,93	+1,83		
		Pluronic®-Konzentration [%]	0,1	0,5	1	5
		Größenklasse				
Spezifische Bindung	1 µm		-51,81	-35,74	-33,76	-30,20
	1 – 3 µm		-37,90	-24,37	-21,00	-17,13
	3 µm		-2,63	+9,24	+13,47	+14,38
	3 – 10 µm		+76,52	+46,91	+51,72	+34,61

In den Abbildung 43 und 44 ist der prozentuelle Anteil der erfassten Partikel in der jeweiligen Größenklasse dargestellt. Zwecks besserer Übersicht wurden dabei Versuche mit repräsentativen Pluronic®-Konzentrationen herangezogen.

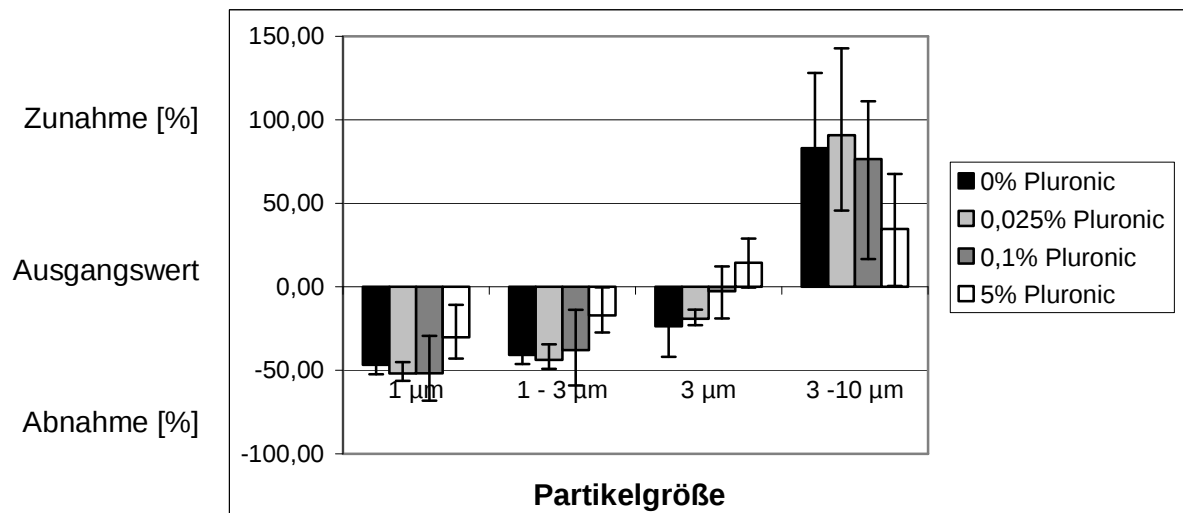


Abb. 43: Änderung der Partikel-Größenverteilung während der Kopplung, Säulenhöhe: Mittelwert, oberer Balken: ermittelter Maximalwert, unterer Balken: Minimalwert (Flowcytometrie)

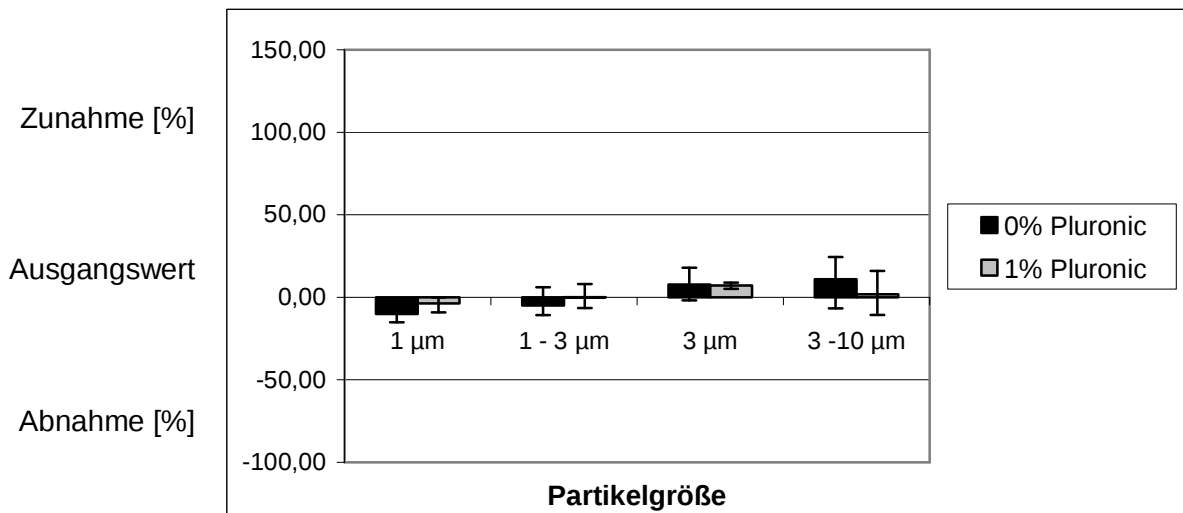


Abb. 44: Änderung der Partikel-Größenverteilung während der Ermittlung der unspezifischen Bindung, Säulenhöhe: Mittelwert, oberer Balken: ermittelter Maximalwert, unterer Balken: Minimalwert (Flowcytometrie)

Als Ausgangswert dient die jeweilige Partikelgrößenverteilung jener Suspension, die für die entsprechende Kopplung herangezogen wurde. Wie bei allen Versuchen ist auch hier eine starke Streuung der Einzelwerte zu beobachten. Dennoch ist klar zu erkennen, dass es bei allen Konzentrationen eine Verschiebung der Verteilung in Richtung größerer Partikel gibt. Das Ausmaß der Veränderung nimmt jedoch ab, je mehr Pluronic[®] zugesetzt wird. Während ohne Pluronic[®] in der interessanten Größenklasse von 1 – 3 µm um 40% weniger Partikel vorhanden sind und im Gegenzug dazu 80 % mehr im darüber liegenden Bereich bis zu 10 µm, so ist bei 5% Pluronic[®] nur ein Verlust von 17% bei 1 – 3 µm zu verzeichnen. Die Population größerer Partikel wächst nur um 34%. Ohne Zugabe der Kopplungsreagenzien ist vergleichsweise kaum ein Unterschied im Vergleich zur Ursprungssuspension zu bemerken.

Diese Veränderung der Größenverteilung ist auch in der Darstellung des FS LIN über den gesamten detektierten Bereich zu sehen. Hier ist als Beispiel die Größenverteilung der PLGA-Suspension nach einer Kopplung mit F-IgG in Abwesenheit von Pluronic® dargestellt (Abbildungen 45 und 46).

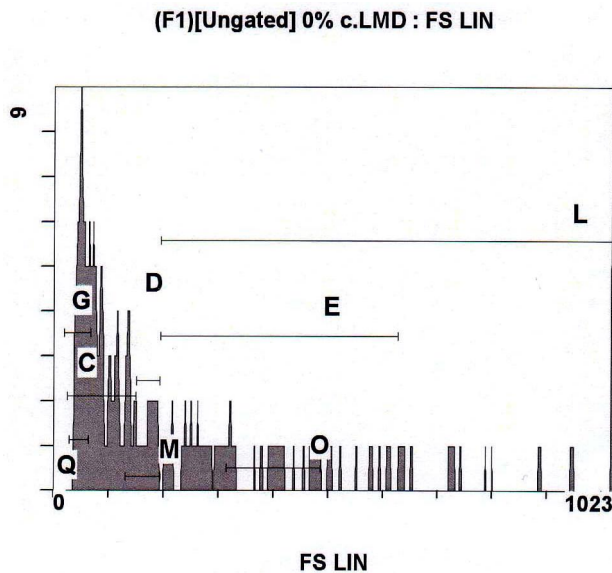


Abb. 45: FS LIN nach der Kopplung von F-IgG an PLGA-Mikropartikel ohne Pluronic® (Flowcytometrie)

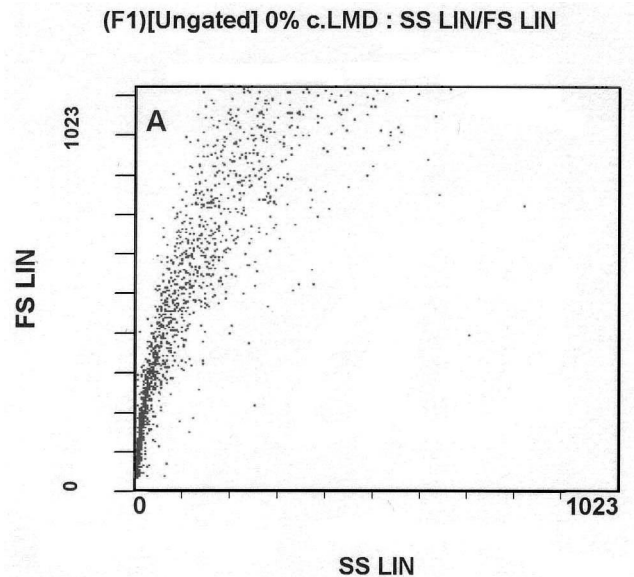


Abb. 46: FS und SS nach der Kopplung von F-IgG an PLGA-Mikropartikel ohne Pluronic® (Flowcytometrie)

Im Gegensatz zur Verteilung direkt nach der Größentrennung (Abbildung 19 und 20, Abschnitt 4.2.1.3) zeigt der FS LIN eine weitaus breitere Verteilung in Richtung größerer Partikel. Auch im FS LIN/ SS LIN Plot ist eine Veränderung zu erkennen. Die Partikel werden größer und weisen eine höhere Granularität auf, was durch die Bildung von Aggregaten gut erklärt werden kann, da deren Oberfläche natürlich im Vergleich zu einzelnen Partikeln stark strukturiert ist.

Beide Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Veränderung der Größenverteilung vermutlich zu einem großen Teil darauf zurückzuführen ist, dass die hydrophoben Partikel in der wässrigen Umgebung aggregieren und sich auch unter Einwirken von Ultraschall nicht mehr voneinander lösen können. Da der Effekt bei der spezifischen Kopplung sehr stark ausgeprägt ist, spielt voraussichtlich die Aktivierung mittels Aktivester eine entscheidende Rolle. Da die negative Ladung der Carboxylgruppe verloren geht, nimmt die elektrostatische Stabilisierung ab. Pluronic® hat einen stabilisierenden Effekt und verringert die Verschiebung in höhere Größenklassen.

4.4.2.2 Quantifizierung der Kopplungseffizienz mit HPLC und Fluoreszenzmessung

Mit Hilfe von HPLC kann die PLGA-Konzentration in jeder Probe einzeln ermittelt werden und somit in Relation zur gemessenen Fluoreszenz gesetzt werden. Dadurch ist es möglich, die Menge an gebundenem Ligand in Abhängigkeit der PLGA-Menge zu berechnen.

Ein typisches Chromatogramm ist in Abbildung 47 zu sehen.

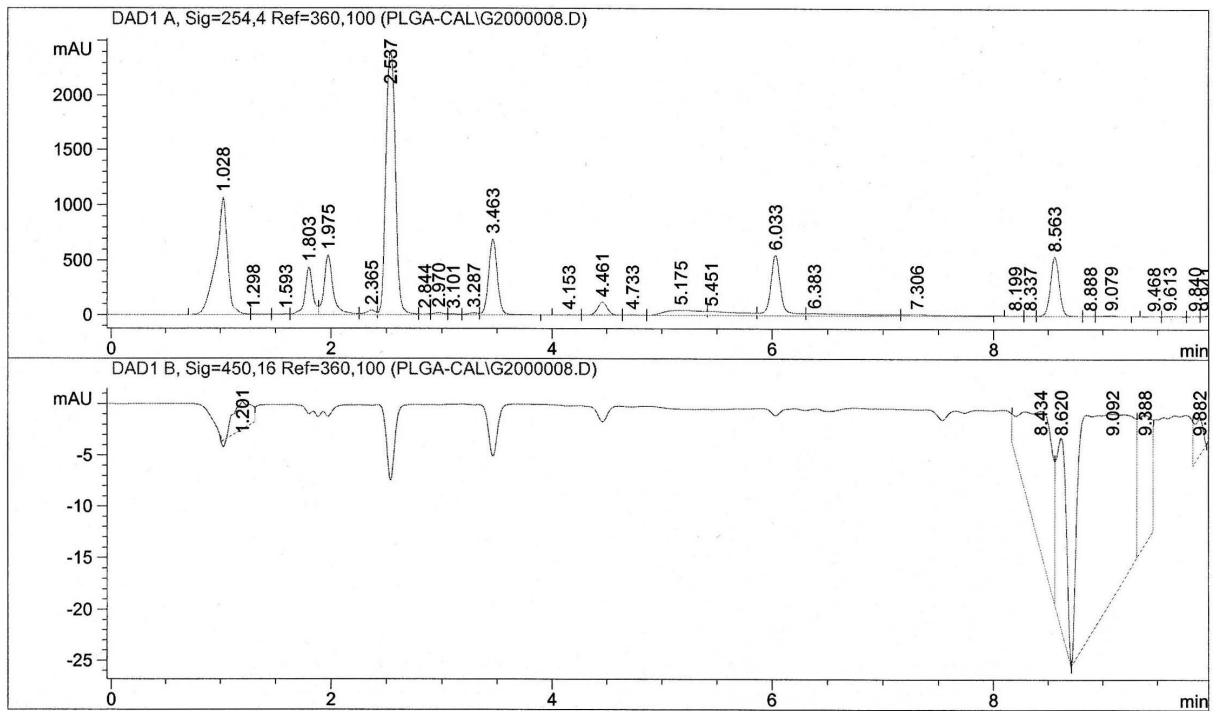


Abb. 47: Hydrolysierte F-Cadaverin gekoppelte PLGA-Partikel (5% Pluronic®), Glykolsäure mit BPB verestert (Katalysator: TEA), Chromatogramm

Die Resultate sind in Tabelle 12 ersichtllich.

Tabelle 12: Pluronic®-abhängige Kopplungseffizienz von F-WGA, F-IgG und F-Cadaverin an PLGA-Partikel (HPLC und Fluoreszenzmessung)

	Pluronic® (%)	F-WGA/ PLGA [ng/mg]		F-IgG/ PLGA [ng/mg]	
		Mittelwert	Standard-abweichung	Mittelwert	Standard-abweichung
Spezifische Bindung	0	21,06	3,18	92,22	15,70
	0,01	17,71	3,08	89,30	26,41
	0,025	12,99	1,20	90,90	18,19
	0,05	19,36	2,14	88,07	18,60
	0,1	17,60	3,68	89,33	21,34
	0,5	6,69	1,70	59,67	16,59
	1	7,65	1,11	53,86	6,41
	5	6,40	2,26	27,02	5,35
Unspezifische Bindung	0	-1,06	0,18	12,03	2,24
	1	-0,95	0,09	9,35	1,55

	Pluronic® (%)	F-Cadaverin [ng/mg]	
		Mittelwert	Standard-abweichung
Spezifische Bindung	0	0,88	0,01
	0,01	0,73	0,07
	0,025	0,67	0,02
	0,05	0,69	0,04
	0,1	0,66	0,01
	0,5	0,70	0,02
	1	0,63	0,03
	5	0,54	0,03
Unspezifische Bindung	0	0,61	0,08
	1	0,44	0,02

Bei allen drei Liganden ist die gleiche Tendenz zu erkennen. Als Beispiel ist in den Abbildungen 48 und 49 das Ergebnis für F-IgG gekoppelte Partikel dargestellt.

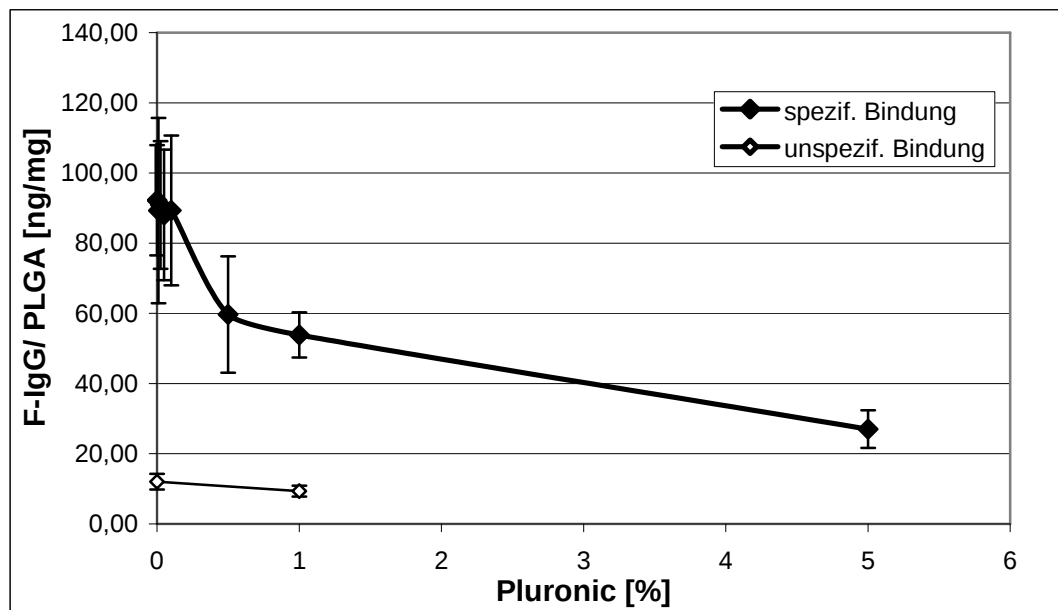


Abb. 48: Kopplungseffizienz in Abhängigkeit der Pluronic®-Konzentration, Kurve der Mittelwerte inklusive Standardabweichung (HPLC)

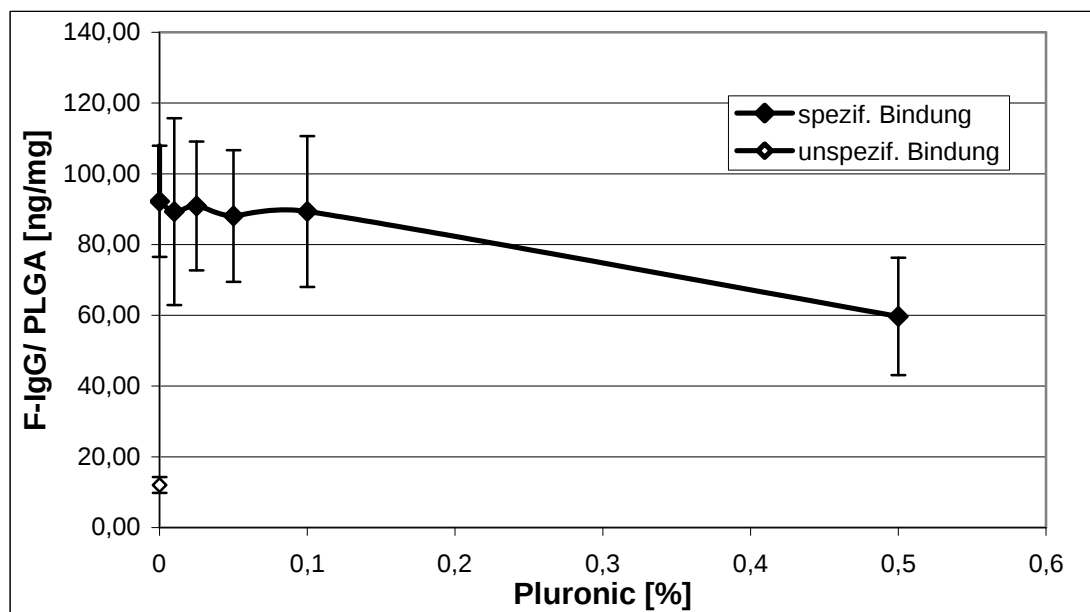


Abb. 49: Kopplungseffizienz in Abhängigkeit kleiner Pluronic®-Konzentrationen, Kurve der Mittelwerte inklusive Standardabweichung (HPLC)

Die Streuung ist deutlich größer, als bei den mittels Flowcytometrie bestimmten Ergebnissen. Dennoch ist eine Abnahme an Ligand mit größerer Pluronic®-Konzentration zu sehen. Im kleinen Konzentrationsbereich bis zu 0,1% Pluronic® kann jedoch keine Aussage getätigt werden, da die Standardabweichungen zu groß sind.

Mit dieser Methode kann also eine grobe Tendenz abgeschätzt werden, jedoch ist die Genauigkeit deutlich unterhalb jener der Flowcytometrie. Entscheidend dafür sind vermutlich zwei Faktoren. Erstens ist der Prozess der Quantifizierung fehleranfällig, da viele einzelne

Schritte, die hohe Genauigkeit erfordern, aufeinander folgen. Im Gegensatz dazu ist die flowcytometrische Messung nicht quantitativ und sehr einfach durchzuführen. Zweitens erfolgt, wie in Abbildung 43 zu sehen, eine Verschiebung der Größenverteilung der Partikel, insbesondere während der Aktivierung der Carboxylgruppen, also bevor der Ligand zugesetzt wird. Durch das Auftreten von im Durchschnitt größeren Partikeln bietet sich dem Liganden in Summe eine geringere Oberfläche und dadurch sinkt die Zahl an zugänglichen Carboxylgruppen. Da die Umverteilung abhängig von der Pluronic®-Konzentration ist, herrschen in jedem Versuchsansatz unterschiedliche Bedingungen, womit es nicht verwunderlich ist, dass die Ergebnisse stark schwanken und an Genauigkeit einbüßen.

PLGA-Konzentration nach der Kopplung

Die mittels HPLC ermittelte Konzentration an PLGA kann ebenfalls in Relation zur Pluronic®-Konzentration gesetzt werden. Dadurch können die schon mit freiem Auge sichtbaren Pluronic®-abhängigen Verluste quantifiziert werden. Die Ausgangskonzentration des PLGA beträgt bei jedem Versuch 10 mg/ml. Da diese jedoch mit Hilfe der Lyophilisation ermittelt wird, die eine geringere Genauigkeit aufweist, lagen die tatsächlich eingesetzten PLGA-Mengen in einzelnen Versuchen höher. Innerhalb eines Versuchsansatzes wurden jedoch jeweils gleiche PLGA-Mengen eingesetzt. Dadurch sind die ermittelten Konzentrationen nach der Kopplung oft über dem vermeintlichen Ausgangswert und von Versuch zu Versuch unterschiedlich.

Tabelle 13: PLGA-Konzentration nach der Kopplung von F-WGA, F-IgG und F-Cadaverin (HPLC)

	Pluronic® [%]	Kopplung von F-WGA		Kopplung von F-IgG	
		PLGA [mg/ml]	Standard-abweichung	PLGA [mg/ml]	Standard-abweichung
Spezifische Bindung	0	8,93	1,06	6,65	0,51
	0,01	8,14	1,24	9,17	0,34
	0,025	10,05	1,31	10,27	1,30
	0,05	11,12	1,26	10,13	0,30
	0,1	10,41	1,14	11,13	0,82
	0,5	12,29	1,64	12,62	0,35
	1	12,46	0,62	11,49	0,89
	5	11,73	0,93	8,68	2,31
Unspezifische Bindung					
	0	10,37	1,21	11,38	0,16
	1	11,04	0,90	13,15	0,67

	Kopplung von F-Cadaverin		
	Pluronic® [%]	PLGA [mg/ml]	Standardabweichung
Spezifische Bindung	0	7,48	0,06
	0,01	8,45	0,60
	0,025	9,38	0,41
	0,05	10,06	0,72
	0,1	10,18	0,16
	0,5	10,02	1,05
	1	10,77	0,19
	5	10,37	0,13
Unspezifische Bindung	0	8,51	0,29
	1	11,01	0,65

Wieder ist bei allen drei Liganden der gleiche Effekt zu sehen. Als Beispiel ist in Abbildung 50 das Ergebnis der Kopplung von F-WGA dargestellt.

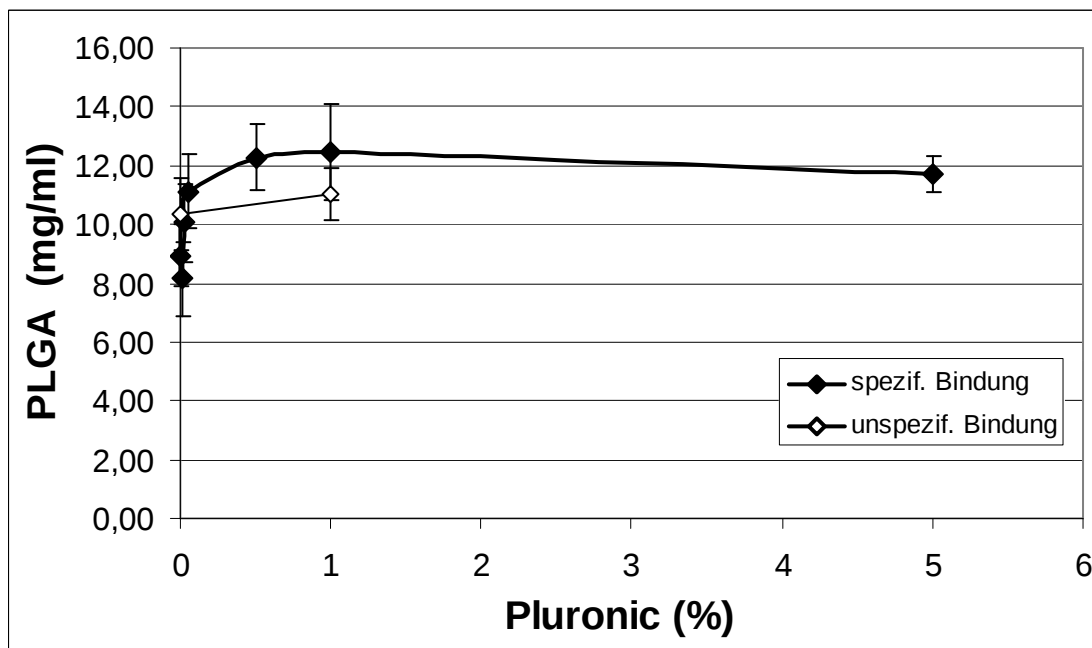


Abb. 50: PLGA-Konzentration nach der Kopplung von F-WGA unter verschiedenen Pluronic®-Konzentrationen (HPLC)

Das Ergebnis ist sehr ähnlich wie bereits durch die makroskopische Beobachtung vermutet. Da ohne oder mit wenig Pluronic® ein wesentlicher Stabilisationseffekt wegfällt, entstehen beim Zentrifugieren keine kompakten Pellets. Stattdessen werden die Partikel nur schwach zusammen gehalten, sie haften an der Wand und werden leicht mit dem Überstand

abgesaugt. Je mehr Pluronic® der Lösung beigesetzt ist, desto besser lassen sich die Partikel pelletieren. Es fällt jedoch auf, dass bei sehr hohen Pluronic®-Konzentrationen von 1% bis 5% wieder eine Abnahme der PLGA-Konzentration detektiert wird. Dies ist, wie bereits erwähnt, vermutlich auf die hohe Viskosität der Lösung zurückzuführen ist, wodurch eine ausreichende Sedimentation verhindert wird und die Partikel leichter verloren gehen,

4.4.2.3 Rasterelektronenmikroskopie

Für einzelne Proben kann auch das Elektronenmikroskop zur Charakterisierung herangezogen werden. Die Abbildungen 51 und 52 zeigen zwei charakteristische Aufnahmen.

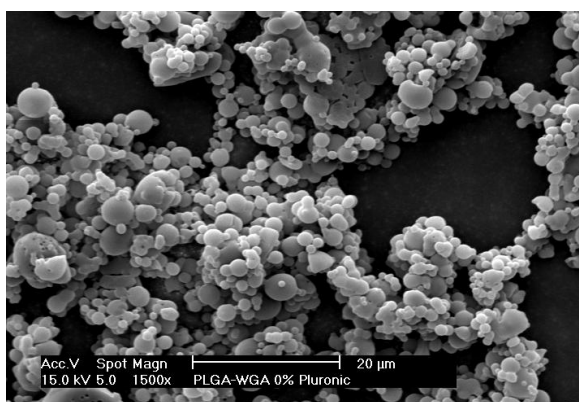


Abb. 51: PLGA-Mikropartikel, kovalente Kopplung von F-WGA mit 0% Pluronic® (SEM)

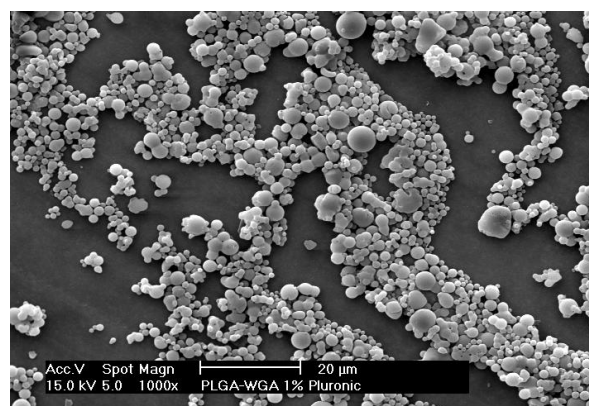


Abb. 52: PLGA-Mikropartikel, kovalente Kopplung von F-WGA mit 1% Pluronic® (SEM)

Das Gesamtbild ähnelt jenem direkt nach der Suspendierung und Größentrennung (siehe Abbildung 21). Die Partikel neigen stark zur Aggregatbildung, jedoch ist dieser Effekt ohne Pluronic® deutlich stärker, so dass kaum noch einzelne Partikel zu sehen sind. Die meisten sind miteinander verschmolzen und zeigen an den Verschmelzungsstellen kleine Löcher. Auch mit 1% Pluronic® sind viele Partikel verschmolzen, jedoch zeigt sich ein deutlich besseres Gesamtbild, weil auch noch vereinzelt Partikel vorhanden sind. Da die Partikel bei zu starker Vergrößerung zerstört werden, sind genaue Aufnahmen der Oberfläche nicht möglich und Unterschiede je nach Ligand nicht zu erkennen.

4.4.3 Diskussion und Ausblick

Pluronic® wird bei der kovalenten Kopplung verschiedener Liganden an PLGA-Partikel als Stabilisator zugesetzt. Dabei muss jedoch berücksichtigt werden, dass dadurch diverse Parameter beeinflusst werden:

Die Effizienz der Kopplung mittels Carbodiimidmethode unterliegt bei Liganden unterschiedlichster Größenordnungen einem starken Einfluss der Pluronic®-Konzentration.

Es wird eine maximale Kopplung ohne Pluronic® erzielt, die jedoch bei einer Erhöhung auf 5% Pluronic® auf bis zu knapp mehr als die Hälfte gesenkt wird (F-IgG, Abbildung 41).

Pluronic® bildet an hydrophoben Partikeloberflächen eine Schicht aus, deren Dicke von der jeweiligen Pluronic®-Konzentration abhängt. Baker und Berg [13] haben gezeigt, dass die Schichtdicke bei sehr kleinen Konzentrationen bis etwa 0,5% sehr rasch ansteigt und sich darüber auf einem Pseudoplateau einpendelt. Diese Beobachtung korreliert mit dem Ergebnis, dass bei kleinen Konzentrationen eine rasche Abnahme der Kopplungseffizienz erfolgt, bei höheren Konzentrationen die Veränderungen jedoch geringer werden.

Diese Beobachtungen lassen darauf schließen, dass ein Zusammenhang zwischen der Schichtdicke des Pluronic® und der Kopplungseffizienz besteht. Pluronic® lagert sich mit seinem hydrophoben PPO-Mittelteil an die Partikeloberfläche, während die hydrophilen PEO-Seitenarme in die umgebende Lösung ragen. Dadurch kann eine Annäherung der Liganden an die Carboxylgruppen der Partikeloberfläche aus sterischen Gründen erschwert werden. Je mehr Pluronic® vorhanden ist, desto dicker ist die Schicht, die die Partikeloberfläche verdeckt und die Kopplung wird erschwert.

Da jedoch Pluronic® die Partikel auch stabilisiert, hat es einen positiven Einfluss auf das Verhalten der Proben bei Zentrifugationen und wirkt dem Anhaften der Partikel an Kunststoffteilen wie den Eppendorf-Gefäßen und Pipettenspitzen entgegen. Je nachdem, wie stabil das resultierende Pellet ist, werden mehr oder weniger Partikel mit dem Überstand abgenommen. Die quantitative Analyse mit HPLC hat gezeigt, dass ohne Pluronic® am meisten PLGA verloren geht. Der Verlust wird mit zunehmender Konzentration an Pluronic® geringer, bis zwischen 0,5% und 1% Pluronic® die Erhöhung der Viskosität wiederum eine Vergrößerung des Verlustes bewirkt. Vergleicht man die Anteile der Partikel in bestimmten Größenklassen mit Hilfe der Flowcytometrie, so sieht man, dass bevorzugt kleine Partikel verloren gehen. Es kommt also zu einer Verschiebung der Größenverteilung in Richtung großer Partikel und Aggregate. Dieses Phänomen kann mit Flowcytometrie ausgezeichnet untersucht werden. Im Vergleich zur Laserdiffraktometrie ist dabei eine wesentlich geringere Menge der Partikelsuspension notwendig.

Diese beiden Ergebnisse zeigen, dass das Verwenden von Pluronic® weder nur Vorteile noch nur Nachteile aufweist. Je nach der Fragestellung muss entschieden werden, ob eine maximale Kopplung oder ein möglichst geringer Verlust an PLGA im Vordergrund stehen soll. Um beide Faktoren in einem sinnvollen Bereich zu halten, scheint eine Konzentration von etwa 0,1% Pluronic® als sinnvoll. Dabei ist die Kopplung bereits reduziert, jedoch nur um etwa 5% bis 10%. Auch ist der Verlust bei dieser Konzentration noch nicht minimal, jedoch ist er in etwa bei einem Drittel der maximalen Verluste. Da es sich außerdem gezeigt hat, dass bei mittleren Pluronic®-Konzentrationen die Bearbeitung der Partikel am einfachsten

durchzuführen ist, ist für eine durchschnittliche Kopplung mit akzeptablem Verlust an Partikeln die Größenordnung von 0,1% Pluronic® empfehlenswert.

Eine weitere entscheidende Erkenntnis dieser Untersuchungen ist, dass die Analyse von Partikeln sehr gut flowcytometrisch erfolgen kann. Der Vorteil dieser Methode ist, dass gezielt jene Partikelpopulation untersucht werden kann, die auch die gewünschten Eigenschaften, also zum Beispiel eine bestimmte Größe, aufweist. Dadurch ist eine korrekte Analyse der Kopplungseffizienz anhand der gemessenen partikelassoziierten Fluoreszenzintensität möglich, die ja durch die Partikelgröße beeinflusst wird. Durch diese Pluronic®-abhängigen Veränderungen ist es nicht möglich, mit einer Kombination aus HPLC der hydrolysierten Partikel und Fluoreszenzmessung zur Quantifizierung des Liganden die Unterschiede im Bereich kleiner Pluronic®-Konzentrationen, in denen sich diesbezüglich am meisten verändert, so deutlich darzustellen. In weiterer Folge erfordert die Analyse im Flowcytometer auch einen deutlich geringeren Zeitaufwand, ist kaum fehleranfällig und benötigt äußerst geringe Probenmengen. Aufgrund dieser zahlreichen Vorteile sollte auch in Zukunft die Flowcytometrie zur Analyse von Mikropartikeln eingesetzt werden.

Um den Effekt von Pluronic® auf die Kopplungseffizienz noch besser charakterisieren zu können, wäre es in weiterer Folge sinnvoll, auch die unspezifische Bindung aller Liganden bei den diversen Konzentrationen zu testen. Dadurch kann analysiert werden, ob Pluronic® die Affinität der Liganden zu den Partikeln verändert. Dieser Effekt könnte zusätzlich zur sterischen Behinderung der Zugänglichkeit der aktivierten Carboxylgruppen die Kopplungseigenschaften beeinflussen. Da jedoch jeder Ligand unterschiedlich hydrophil ist, wird auch bei allen Liganden eine mehr oder weniger starke Anlagerung von Pluronic® und somit unterschiedlich starke Veränderung auftreten.

Zusätzlich wäre eine weitere interessante Analyse die Messung des Zetapotentials der Partikel. Bei der Adsorption von Pluronic® an die Partikeloberfläche kommt es zu einer messbaren Veränderung. Im Allgemeinen nimmt der gemessene Zetapotentialwert mit zunehmender Schichtdicke ab [11]. Dazu können jene Partikel benutzt werden, die nach der Zentrifugation mit dem Überstand von nicht gut zusammenhängenden Pellets entfernt werden. Da diese Partikel so klein sind, dass sie trotz hoher Zentrifugationsgeschwindigkeit nicht ausreichend sedimentiert werden, sind sie auch gerade noch für die Messung des Zetapotentials geeignet.

Zuletzt wäre es sinnvoll, weitere Kopplungen durchzuführen, um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse auch im großen Versuchsansatz zu sichern. Vielleicht können Ausreißer noch besser vermieden werden.

4.5 Verwendung von Aceton zur Wiedergewinnung von PLGA

Wie im Abschnitt 4.2.1.1 erwähnt, ist der Prozess des Sprühtrocknens mit sehr großen Verlusten an PLGA verbunden, da sich die noch nicht vollständig getrockneten Partikel im gesamten Gerät ablagern und aneinander kleben. Ein Vorschlag, um diesen Vorgang ökonomischer zu gestalten, ist, das abgelagerte PLGA aus dem Sprühtrockner mit Hilfe von Aceton abzulösen und das PLGA durch das Abdampfen des Lösungsmittels am Rotavapor wiederzugewinnen. In diesem Abschnitt wird erklärt, welche Eigenheiten aus diesem Prozess hervorgehen.

4.5.1 Rückgewinnung des PLGA

Vor allem im Sprühzylinder lagert sich viel PLGA ab, das nicht mit Hilfe eines Zellschabers oder Spatels herausgekratzt werden kann, da es eine klebrige Schicht bildet, die die gesamte Oberfläche überzieht. Auch im Zyklon befindet sich PLGA an der Wand, das nicht gut zugänglich ist. Daher sind diese beiden Gerätebauteile besonders interessant, um PLGA rückzugewinnen. Sie werden gründlich mit Aceton gespült, und die Lösung in einem Rundkolben gesammelt. Am Rotavapor wird nun das Aceton eingedampft, um PLGA rückzugewinnen. Dabei bildet sich eine Struktur aus feinen PLGA-Fäden und –Schichten, die an Spinnennetze erinnern. Darüber bildet sich eine PLGA-Haut, die möglicherweise für Aceton im unteren Bereich des Kolbens nur schlecht durchlässig ist, da auch lange nachdem kein Lösungsmittel mehr zu sehen ist der Geruch von Aceton vorhanden bleibt. Die Schichten können mit einem Spatel zerstört und solange im Vakuum inkubiert werden, bis kein Acetongeruch mehr zu bemerken ist. Das so gewonnene PLGA wurde nun zum Sprühtrocknen wieder in Dichlormethan gelöst.

4.5.2 Herstellung, Suspendierung und Größentrennung der Partikel

Die Herstellung der PLGA-Mikropartikel weist keinerlei Besonderheiten auf. Beim Versuch der Suspendierung und Größentrennung hingegen tritt ein ungewohntes Verhalten auf: Bei der Zentrifugation bei 400 rpm, die normalerweise zur Abtrennung zu großer Partikel und größerer Aggregate nötig ist, sinken bereits alle Partikel in das Pellet ab, so dass im Überstand mit freiem Auge gar keine Trübung mehr wahrzunehmen ist. Das unübliche Absinken der Partikel kann zwei Ursachen haben: Wie bereits aus der Rasterelektronenmikroskopie bekannt, handelt es sich bei den durch Sprühtrocknung hergestellten PLGA-Partikeln um Hohlkugeln. Besitzen diese große Löcher, so kann Wasser eindringen und dadurch die Dichte der Partikel so stark erhöhen, dass sie nicht im Überstand bleiben können. Alternativ kann es sich um Partikel mit besonders hoher Tendenz zur

Aggregatbildung handeln, wodurch mehr Energie für das Aufbrechen der Aggregate erforderlich ist.

Es erfolgt daher eine alternative Größentrennung nach folgendem Schema:

- Jede Probe wird dreimal direkt hintereinander 30 Sekunden mit dem Ultraschallstab bei 72% Leistung behandelt. Da es sich dabei um eine deutlich größere Belastung handelt als üblicherweise, muss auch hierbei eine entsprechende Kühlung im Eisbad während der Behandlung stattfinden.
- Anschließend erfolgt wie üblich eine Inkubation im Ultraschallbad bei 90% Leistung für 5 min mit entsprechender Kühlung.
- Nach einer Zentrifugation bei 300 rpm werden die Überstände gesammelt und wie gewohnt von zu kleinen Partikeln abgetrennt, indem bei 3200 rpm für 10 min bei 4°C zentrifugiert wird.

Die Überprüfung dieser Partikel mittels Flowcytometrie ergibt, dass etwa 35% der Partikel im Bereich zwischen 1 und 3 μm liegen und nicht wie gewohnt mehr als mindestens 50%. Da außerdem die Ausbeute deutlich geringer ist als sonst, wird diese Partikelcharge mit einer weiteren aus einer neuen Größentrennung gemischt, wodurch eine deutlich günstigere Verteilung von 67% im gewünschten Bereich erzielt wird. So wird die Suspension für die Kopplung von F-WGA benutzt.

4.5.3 Kovalente Kopplung von F-WGA

Wie für einen Vorversuch üblich, wird ein Ansatz von 5 mg Partikel benutzt. Die zu diesem Zeitpunkt dafür noch übliche Menge an F-WGA ist 1,5 nmol. Jede Pluronic®-Konzentration, also 0%, 0,01% und 0,1%, wird im vierfachen Ansatz untersucht. Bereits bei der Kopplung zeigen die Proben ungewohntes Verhalten:

Die Partikel erscheinen deutlich orange, obwohl exakt die gleiche Menge an F-WGA eingesetzt wurde wie auch in den Versuchen davor. Es scheint also mehr F-WGA an die Partikel gebunden oder assoziiert zu sein. Außerdem sedimentieren die Partikel deutlich rascher als normalerweise.

4.5.3.1 Charakterisierung

Flowcytometrie

Wie gewohnt wird die Fluoreszenz der Partikel von 1 μm bis 3 μm zum Vergleich der Kopplungseffizienz herangezogen. In Tabelle 14 sind die Ergebnisse dieser Kopplung zu sehen. Als Vergleich ist auch eine äquivalente angeführt, die unter den gleichen Bedingungen, jedoch mit einer normalen Partikelsuspension durchgeführt wurde.

Tabelle 14: Pluronic®-abhängige Kopplungseffizienz von F-WGA an PLGA-Partikel

Pluronic® [%]	Fluoreszenzintensität (PLGA-Partikel aus Aceton)	Fluoreszenzintensität (normale Bedingungen)
0	70,38	38,6
0,01	70,35	23
0,1	61,30	17,6

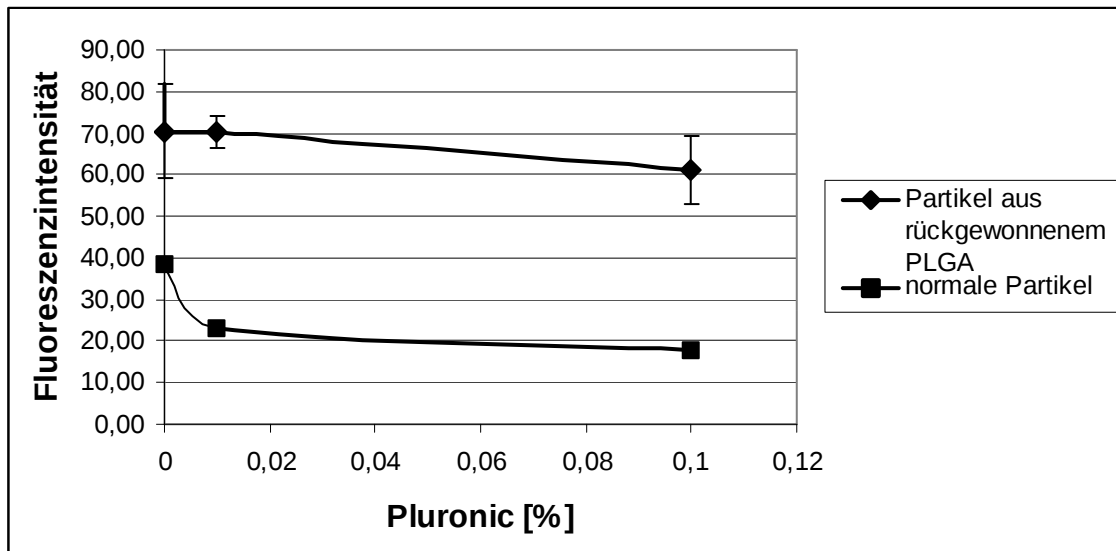


Abb. 53: Kopplungseffizienz von F-WGA in Abhängigkeit der Pluronic®-Konzentration, im Vergleich normale Partikel und Partikel aus rückgewonnenem PLGA (Flowcytometrie)

Auffällig hierbei ist die etwa doppelt so hohe Fluoreszenzintensität der Partikel im Vergleich zu einer äquivalenten Kopplung. Außerdem ist kein Unterschied in der Kopplungseffizienz zwischen 0% und 0,01% Pluronic® zu erkennen, was möglicherweise auf einen Quench schließen lässt.

Da der einzige Unterschied in der Behandlung der Partikel darin liegt, dass jene, die aus rückgewonnenem PLGA hergestellt sind mit deutlich mehr Ultraschall behandelt wurden, kann es sein, dass die Partikel dadurch zwar nicht völlig zerstört, aber doch löchrig oder rissig geworden sind. Da die Inkubation mit F-WGA über Nacht erfolgt, kann es dabei in den Hohlraum aufgenommen werden. Die Waschschrte dauern verhältnismäßig sehr kurz an und könnten nicht ausreichen, um alles eingedrungene F-WGA wieder zu entfernen. Dadurch würde in der Flowcytometrie erhöhte Fluoreszenz durch nicht kovalent gekoppeltes F-WGA gemessen, die den Effekt von Pluronic® überdeckt. Diese Vermutung soll überprüft werden, indem einige Proben mit Harnstoff behandelt werden.

Inkubation mit 8 M Harnstoff

Aus den beiden Versuchen, deren Kopplungseffizienz in Abbildung 53 dargestellt ist, werden jeweils zwei Proben mit 0% und 0,1% Pluronic® gewählt, um mit Harnstoff inkubiert zu werden. Durch dieses Chaotrop werden alle nicht-kovalenten Bindungen zerstört und das Protein wird durch ausreichend lange Inkubation aus den Partikeln gewaschen. Die Überstände dieser Partikel können fluorimetrisch und die Partikel selbst erneut mit Flowcytometrie untersucht werden.

Die Inkubation mit 8 M Harnstoff wird wie folgt durchgeführt:

- Je 200 µl Suspension werden bei 3500 rpm und 4°C 10 min zentrifugiert.
- Die Pellets werden in 200 µl 8 M Harnstoff resuspendiert und über Nacht end-over-end geschüttelt.
- Am nächsten Tag wird erneut unter den gleichen Bedingungen zentrifugiert. Die Überstände werden zur Fluoreszenzmessung verwendet, die Pellets in 500 µl 20 mM HEPES/ NaOH pH 7,4 resuspendiert und erneut zentrifugiert.
- Zuletzt werden die Partikel wieder in 200 µl Puffer aufgenommen und anschließend flowcytometrisch analysiert.

Die Fluoreszenzintensitäten der Überstände nach der Inkubation mit Harnstoff sind in Tabelle 15 zu sehen.

Tabelle 15: Fluoreszenzintensität der Überstände F-WGA gekoppelter PLGA-Partikel nach der Inkubation mit 8 M Harnstoff

Pluronic® [%]	Fluoreszenzintensität (Überstand von Partikeln aus rückgewonnenem PLGA)	Fluoreszenzintensität (normale Partikel)
0	17801	6301
0,1	44583	5822

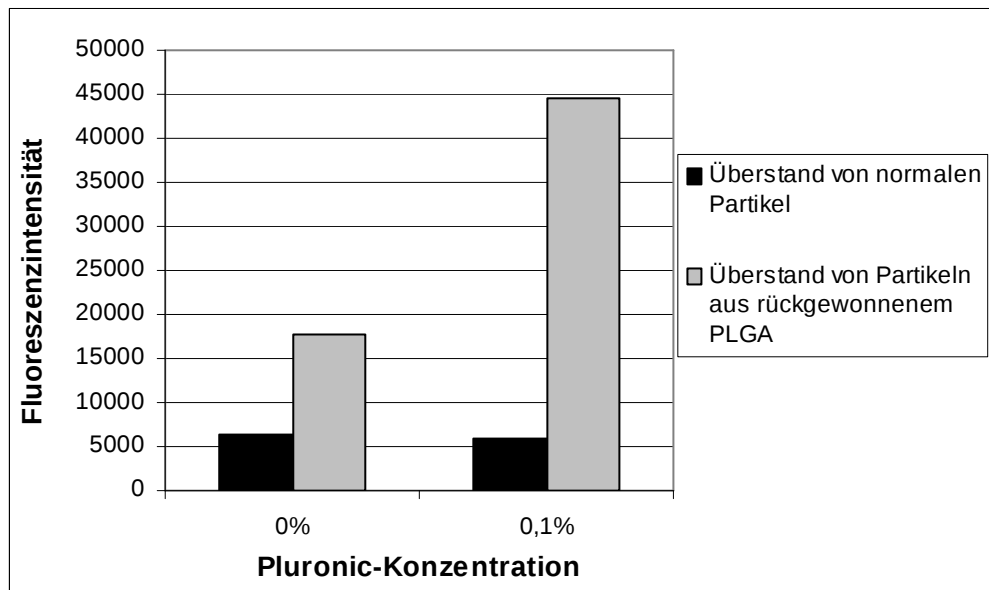


Abb. 54: Fluoreszenzintensität des Überstandes verschiedener F-WGA gekoppelter Partikel nach der Inkubation mit 8 M Harnstoff

In Abbildung 54 ist zu erkennen, dass aus den Partikeln aus rückgewonnenem PLGA deutlich mehr F-WGA herausgelöst werden kann als aus den normalen Partikeln. Außerdem scheint nur bei diesen Partikeln eine Pluronic®-Abhängigkeit gegeben zu sein. Die Vorstellung, dass mehr F-WGA unspezifisch gebunden ist, bestätigt sich durch diese Analyse.

Das Ergebnis der erneuten Untersuchung der Partikel mittels Flowcytometrie ist in Tabelle 16 aufgelistet.

Tabelle 16: Fluoreszenzintensität F-WGA gekoppelter PLGA-Partikel nach der Behandlung mit 8 M Harnstoff

Pluronic® [%]	Partikel aus rückgewonnenem PLGA		Normale Partikel	
	Vor Harnstoff-Behandlung	Nach Harnstoff-Behandlung	Vor Harnstoff-Behandlung	Nach Harnstoff-Behandlung
0	78,2	82,7	38,6	53,5
0,1	66,8	89	23	34

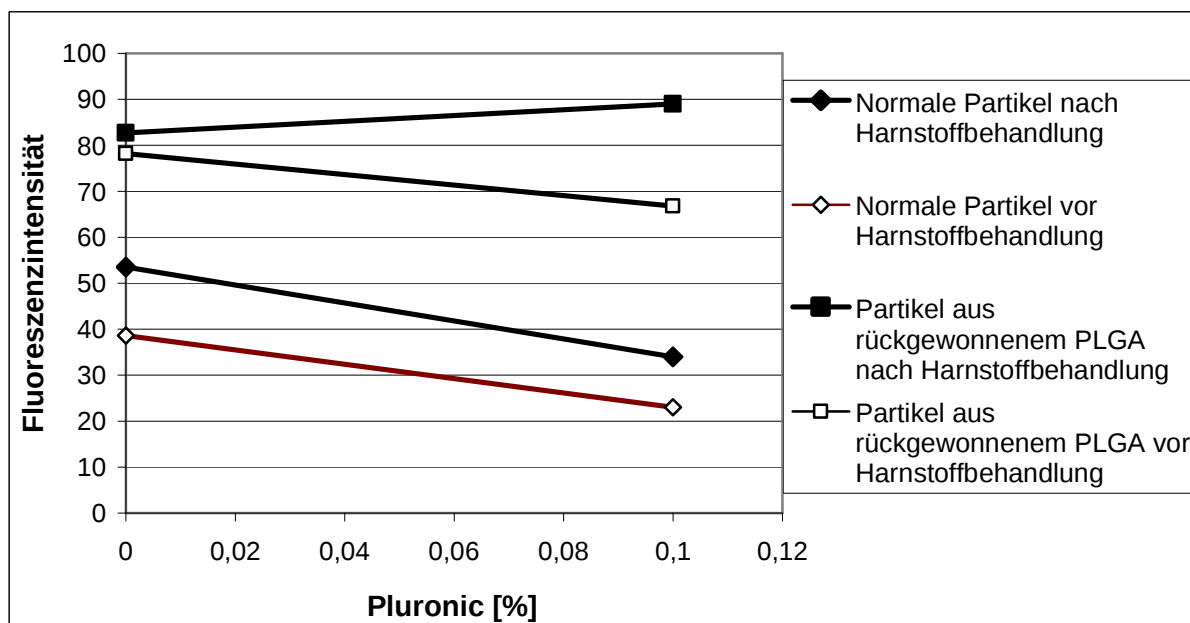


Abb. 55: Fluoreszenzintensität F-WGA gekoppelter Partikel vor und nach der Behandlung mit 8 M Harnstoff (Flowcytometrie)

In Abbildung 55 sind die neuen Ergebnisse der Flowcytometrie in Relation zu jenen vor der Behandlung mit Harnstoff dargestellt. Bei beiden Partikeltypen ist eine größere Intensität zu erkennen. Während die normalen Partikel jedoch genau die gleiche Kurve wie vor der Harnstoffbehandlung zeigen, ist bei den Partikeln aus rückgewonnenem PLGA nun anstatt einer Abnahme eine Zunahme der partikelgebundenen Fluoreszenzintensität zu sehen. Diese könnte darauf zurückzuführen sein, dass bei der Probe mit 0,1% Pluronic® genügend F-WGA entfernt wurde, um einen verminderten Quench und somit höhere Fluoreszenz erreichen zu können. Da bei 0% Pluronic® erfahrungsgemäß mehr F-WGA koppelt, müsste hier natürlich auch mehr F-WGA entfernt werden, um den Quenchbereich zu verlassen. Auch wenn das Verhalten der Partikel nicht eindeutig zu interpretieren ist, kann dennoch mit Sicherheit gesagt werden, dass sich Partikel, die aus PLGA produziert werden, das mit Aceton aus dem Sprühtrockner gelöst wurde, mehr Ligand unspezifisch binden als dies üblicherweise der Fall ist.

Rasterelektronenmikroskopie

Um die Ursache für das Verhalten dieser Partikel noch näher charakterisieren zu können, werden auch elektronenmikroskopische Bilder herangezogen. Repräsentative Ausschnitte von F-WGA gekoppelten Partikeln ohne Pluronic® zeigen die Abbildungen 56 und 57.

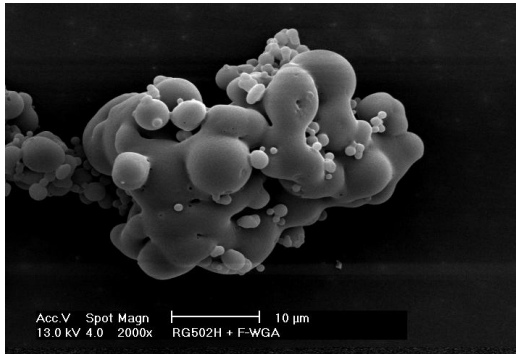


Abb. 56: F-WGA gekoppelte Partikel aus rückgewonnenem PLGA (SEM)

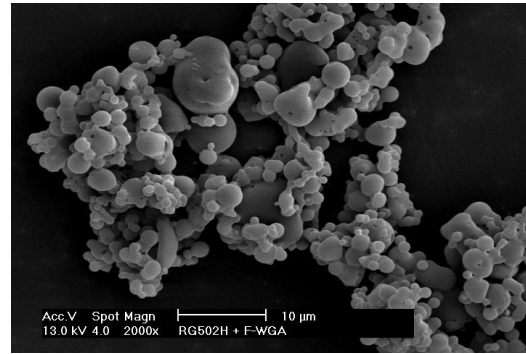


Abb. 57: F-WGA gekoppelte Partikel aus rückgewonnenem PLGA (SEM)

Wie in den Abbildung 56 und 57 zu sehen ist, weicht die Struktur dieser Partikel deutlich von jener normaler F-WGA gekoppelter Partikel ab (siehe Abbildung 51 und 52). Die Partikel weisen tatsächlich größere Dampfaustrittslöcher auf, in die F-WGA eindringen kann. Außerdem sind die Partikel zu sehr großen Aggregaten verschmolzen, die nicht mehr voneinander getrennt werden können. Auch wenn dieses Phänomen ebenfalls bei normalen Partikeln auftritt, ist es in diesem Fall in einem unvergleichlich höheren Ausmaß vorhanden. Ein Grund dafür kann die um 18 Mal längere Behandlung mit dem Ultraschallstab sein, wobei trotz intensiver Kühlung die Partikeloberfläche stark angeschmolzen wird.

4.5.4 Diskussion und Ausblick

Diese Versuche zeigen, dass es nicht sinnvoll ist, PLGA mit Hilfe von Aceton aus dem Sprühtrockner zu lösen, obwohl dabei große Mengen zurückgewonnen werden können. Die Analysen der Partikel mit Rasterelektronenmikroskopie in Kombination mit den fluorimetrischen Versuchen nach der Inkubation mit Harnstoff zeigen, dass der Ligand F-WGA in die hohlen Partikel eindringt, weil zahlreiche Löcher an den Partikeloberflächen vorhanden sind. Auch bei normalen PLGA-Partikeln sind Löcher zu erkennen, jedoch in weitaus geringerem Ausmaß. Da Aceton sehr schwer vollständig abzukochen ist, ist es naheliegend, dass minimale Lösungsmittelreste während des Sprühtrocknens vorhanden waren. Da Aceton einen höheren Siedepunkt als Dichlormethan hat [17], verdampft es auch später und kann dabei durch eine plötzliche Expansion größere Dampfaustrittslöcher in den Partikeln erzeugen.

Es ist mit diesen Versuchen bewiesen, dass diese Partikel ein anderes Verhalten zeigen als jene, die aus frischem oder nur durch Auskratzen rückgewonnenem PLGA hergestellt werden. Entscheidend ist, dass dadurch keine sichere Möglichkeit der Quantifizierung der Kopplungseffizienz existiert, weil eine große Menge Ligand unspezifisch in Hohlräumen gebunden ist. Daher ist es nicht möglich, diese Partikel zur Untersuchung von Unterschieden in der Kopplung heranzuziehen.

5 Zusammenfassung

Poly(D,L-laktid-co-glykolid) (PLGA)-Nano- und Mikropartikel sind vielversprechende Drug Delivery Systeme, die mit einer großen Bandbreite an Targetern kovalent gekoppelt und so für zielgerichtete Arzneiformen eingesetzt werden können. Die wichtigste Herstellungsmethode ist die Solvent Evaporation Technik, bei der große Mengen an Stabilisator zugesetzt werden. Einer der meist verwendeten Stabilisatoren ist Pluronic® F68, ein Block-Copolymer des Typs PEO-PPO-PEO, das bereits für parenterale Anwendungen zugelassen ist. Das Ziel dieser Arbeit war die Analyse der Auswirkungen von Pluronic® F68 auf die kovalente Kopplung der drei unterschiedlich großen Modellliganden FITC-Immunglobulin G (F-IgG), F-Weizenkeimagglutinin (F-WGA) und F-Cadaverin.

Hilfsstofffreie Mikrosphären wurden durch Sprühtrocknung hergestellt und so fraktioniert, dass Partikel mit einem mittleren Durchmesser von 1 bis 5 µm erhalten wurden. Mit Hilfe der Carbodiimidmethode wurden die oben genannten Liganden an ihre Oberfläche in Abwesenheit und in Gegenwart von bis zu 5% Pluronic® gekoppelt. Die Charakterisierung der Partikel erfolgte mit Laserdiffraktion und Flowcytometrie, der PLGA-Gehalt wurde mit HPLC und die Ligandendichte mit Fluorimetrie ermittelt.

Pluronic® hat einen Einfluss auf den Verlust der Partikel während der Modifikation. Die größten Verluste wurden ohne der Zugabe von Pluronic® beobachtet, die besten Ergebnisse bei einer Konzentration von 0,5% des Stabilisators erzielt.

Die maximale Kopplungsrate wurde für alle drei Liganden in der Abwesenheit des Stabilisators erreicht. Bei niedrigen Pluronic®-Konzentrationen bis zu 0,1% kann eine starke Abnahme der Kopplungseffizienz bei den großen Liganden F-IgG und F-WGA beobachtet werden. Im Gegensatz dazu tritt bei dem kleinen Liganden F-Cadaverin dieser Effekt nicht auf. Bei Erhöhung der Pluronic®-Konzentration tritt bei allen drei Liganden eine starke Reduktion der Kopplungseffizienz auf. Bei F-WGA und F-Cadaverin wurde nur mehr die Hälfte der maximalen Kopplung beobachtet werden, bei F-IgG sogar nur ein Drittel. Dieser Effekt kann optimal mittels Flowcytometrie demonstriert werden, da sie die Analyse von Partikeln in einer definierten Größenordnung erlaubt. Die Ergebnisse sind daher von Schwankungen in der Größenverteilung in der Partikelsuspension unabhängig.

Die Verwendung von Pluronic® als Stabilisator während der Immobilisierung von Liganden an der Oberfläche von PLGA-Partikeln führt einerseits zu einer Abnahme der Kopplungseffizienz, andererseits aber zu einem deutlich geringerem Verlust an Partikeln. Daher sollte eine mittlere Konzentration von 0,1% Pluronic® gewählt werden, um eine ausreichende Kopplung mit minimalem Partikelverlust zu kombinieren.

6 **Abstract**

Impact of Stabilizer Concentration on the Surface Functionalisation of Polystyren- and PLGA-particles

Poly(D,L-lactide-co-glycolide) (PLGA) nano- and microparticles are promising drug delivery devices which can be covalently coupled with a wide array of targeters for site-specific delivery. The most prominent method for preparation is the solvent evaporation technique which requires the use of high amounts of stabilizer. One of the most frequently employed stabilizers is Pluronic® F68, a block-copolymer of the type PEO-PPO-PEO, which is one of the few authorized stabilizers for the parenteral administration route. The aim of this work was the analysis of the influence of Pluronic® F68 on the covalent coupling of the three model ligands of different molecular size namely FITC-immunoglobulin G (F-IgG), F-Wheat Germ Agglutinin (F-WGA) and F-cadaverine.

Surfactant-free microspheres were produced via spray drying and fractionated to yield particles with a mean diameter of 1 – 5 µm. Using the carbodiimide method the above mentioned ligands were coupled to their surface in absence and in presence of up to 5 % Pluronic®. The grafted particles were characterized in terms of size via laser diffraction and flowcytometry, PLGA-content via HPLC as well as ligand density via fluorimetry.

The presence of Pluronic® has an impact on the loss of particles during modification. High particle loss was observed without the addition of Pluronic®, the best results were achieved at a concentration of 0,5% of the stabilizer.

Maximal coupling rate for all the three ligands was achieved in absence of the stabilizer. At low Pluronic® concentrations up to 0.1% a strong decrease in the coupling efficiency was observed for the large ligands F-WGA and F-IgG, whereas no effect was observed in case of the small F-cadaverine. An increase in the Pluronic® concentration resulted in a strong reduction of the coupling efficiency of all the three ligands. Only half of the maximum coupling could be detected for F-WGA and F-cadaverine, for F-IgG even only one third. Flow cytometry was the ideal method to demonstrate this effect as it allowed the analysis of particles in a selected size range. The results were therefore independent of fluctuations in particle size distribution within the suspension.

The use of Pluronic® as stabilizer during the immobilization of ligands on the surface of PLGA particles led on the one hand to a decrease in the coupling efficiency, but on the other hand to considerably lower loss of particles. Therefore an average concentration of 0.1% Pluronic® should be chosen to combine sufficient coupling with minimum loss of particles.

7 Literaturverzeichnis

- [1] P. Couvreur, C. Vauthier: Nanotechnology: Intelligent design to treat complex disease. *Pharmaceutical Research* 23 (2006) 1417 – 1450
- [2] S. K. Sahoo, V. Labhasetwar: Nanotech approaches to drug delivery and imaging. *Drug Discovery Today* 8 (2003) 1112 – 1120
- [3] R. A. Jain: The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) devices, *Biomaterials* 21 (2000) 2475 – 2490
- [4] R. C. Mundargi, V. R. Babu, V. Rangaswamy, P. Patel, T. M. Aminabhavi: Nano/micro technologies for delivering macromolecular therapeutics using poly(D,L-lactide-co-glycolide) and its derivatives. *Journal of Controlled Release* 125 (2008) 193 – 209
- [5] B. Ertl, F. Heigl, M. Wirth, F. Gabor: Lectin-mediated Bioadhesion: Preparation, stability and Caco-2 binding of wheat germ agglutinin-functionalized poly(D,L-lactic-co-glycolic acid)-microspheres. *Journal of Drug Targeting* 8 (2000) 173 – 184
- [6] P. Langguth, G. Fricker, H. Wunderli-Allenspach: Biopharmazie, WILEY-VCH Verlag, Weinheim, 2004
- [7] J. D. Byrne, T. Betancourt, L. Brannon-Peppas: Active targeting schemes for nanoparticle systems in cancer therapeutics. *Advanced Drug Delivery Reviews* 60 (2008) 1615 – 1626
- [8] F. Gabor, M. Wirth: Lectin-mediated drug delivery: fundamentals and perspectives. *S.T.P. Pharma Sciences* 13 (2003) 3 – 16
- [9] H. Elnakat, M. Ratnam: Distribution, functionality and gene regulation of folate receptor isoforms: implications in targeted therapy. *Advanced Drug Delivery Reviews* 56 (2004) 1067 – 1084
- [10] G. T. Hermanson: Bioconjugate Techniques. Academic Press, San Diego, 1996
- [11] R. H. Müller: Zetapotential und Partikelladung in der Laborpraxis: Einführung in die Theorie, praktische Messdurchführung, Dateninterpretation. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 1996

- [12] C. Fillafer, M. Wirth, F. Gabor: Stabilizer-induced viscosity alteration biases nanoparticle sizing via dynamic light scattering, *Langmuir* 23 (2007) 8699 – 8702
- [13] J. A. Baker, J. C. Berg: Investigation of the adsorption configuration of poly(ethylene oxide) and its copolymers with poly(propylene oxide) on model polystyrene latex dispersions. *Langmuir* 4 (1988) 1055 – 1061
- [14] M. J. Santander-Ortega, A. B. Jòdar-Reyes, N. Csaba, D. Bastos-González, J. L. Ortega-Vinuesa: Colloidal stability of Pluronic F68-coated PLGA nanoparticles: A variety of stabilization mechanisms. *Journal of Colloid and Interface Science* 302 (2006) 522 – 529
- [15] E. V. Batrakova, A. V. Kabanov: Pluronic block copolymers: Evolution of drug delivery concept from inert nanocarriers to biological response modifiers. *Journal of Controlled Release* 130 (2008) 98 – 106
- [16] S. M. Moghimi, A. C. Hunter, C. M. Dadswell, S. Savay, C. R. Alving, J. Szebeni: Causative factors behind poloxamer 188 (Pluronic F68, Floccor)-induced complement activation in human sera. A protective role against poloxamer-mediated complement activation by elevated serum lipoprotein levels. *Biochimica et Biophysica Acta* 1689 (2004) 103 – 113
- [17] M. J. O'Neil, P. E. Heckelman, C. B. Koch, K. J. Roman: Merck-Index, an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals, 14th edition. Merck Research Laboratories, Whitehouse Station, 2006

8 Lebenslauf

URSULA LÄNGER

wohnhaft in Leinpaumgasse 8
A-3100 St. Pölten

geboren am 5. August 1986
in St. Pölten

Ausbildung

25. 6. 2008	Abschluss der ersten Diplomprüfung im Fach Pharmazie
Seit Juni 2008	Diplomarbeit im Fach Molekulare Biologie im Rahmen einer Zusammenarbeit der Departments für Biochemie und Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie, Universität Wien, Wien
5. 7. 2007	Abschluss der ersten Diplomprüfung im Fach Molekulare Biologie
Seit Oktober 2004	Studium der Molekularen Biologie und der Pharmazie, Universität Wien, Wien
14. 6. 2004	Reifeprüfung mit ausgezeichnetem Erfolg
1996 – 2004	Gymnasium, St. Pölten Josefstraße, St. Pölten
1992 – 1996	Volksschule, Franz-Jonas-Volksschule, St. Pölten

Praktika

Mai 2008	Department für Biochemie, Universität Wien, Wien
Februar – März 2008	Abteilungen für Pathogénomique mycobacterienne intégrée und Regulation immunitaire et vaccino-logie, Pasteur Institut, Paris
September 2007	Department für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie, Universität Wien, Wien

9 Anhang

A.1 Bestimmung geeigneter Ligandenkonzentrationen

A.1.1 Oberflächenkopplung an PLGA-Partikel

F-WGA

Tabelle 17: Oberflächenkopplung von F-WGA (1,5 nmol) an PLGA-Partikel (Flowcytometrie)

Pluronic® [%]	Fluoreszenzintensität
0	47,1
0,01	46,7
0,05	41,3
0,1	40,7
0,25	39,9
0,5	37,5
1	30,6

Tabelle 18: Oberflächenkopplung von F-WGA (1,5 nmol) an PLGA-Partikel (Flowcytometrie)

	Pluronic® [%]	Fluoreszenzintensität
Spezifische Bindung	0	46,4
	0,01	64,5
	0,025	38,9
	0,05	19,1
	0,1	16,9
	0,5	19,3
	1	20,3
	5	15,5
Unspezifische Bindung	0	1,7

Tabelle 19: Oberflächenkopplung von F-WGA (1,5 nmol) an PLGA-Partikel (Flowcytometrie)

	Pluronic® [%]	Fluoreszenzintensität (Mittelwert)	Standardabweichung
Spezifische Bindung	0	69,37	6,68
	0,01	69,10	24,48
	0,025	68,10	12,90
	0,05	66,10	10,36
	0,075	74,93	1,96
	0,1	74,90	2,51
	0,25	72,53	7,81
	0,5	23,13	8,43
	1	64,43	12,98
	5	58,83	4,79
Unspezifische Bindung	0	1,13	0,12
	1	1,23	0,06

F-IgG

Tabelle 20: Oberflächenkopplung von F-IgG (1,5 nmol) an PLGA-Partikel (Flowcytometrie)

Pluronic® [%]	Fluoreszenzintensität
0	159,7
0,01	239,9
0,05	252,1
0,1	266,6
0,5	264,2
1	286,0

Tabelle 21: Oberflächenkopplung von F-IgG (0,15 nmol) an PLGA-Partikel (Flowcytometrie)

	Pluronic® [%]	Fluoreszenzintensität
Spezifische Bindung	0	77,6
	0,01	96,4
	0,1	87,2
Unspezifische Bindung	0	32,4
	0,1	37,6

Fluoresceinamin

Tabelle 22: Oberflächenkopplung von Fluoresceinamin (1,5 nmol) an PLGA-Partikel (Flowcytometrie)

	Pluronic® [%]	Fluoreszenzintensität
Spezifische Bindung	0	0,9
	0,01	1
	0,05	1
	0,1	0,8
	0,5	0,7
	1	0,8
Unspezifische Bindung	0	1,5
	0,1	1,2
	1	3,3

Tabelle 23: Oberflächenkopplung von Fluoresceinamin (30 nmol) an PLGA-Partikel (Flowcytometrie)

	Pluronic® [%]	Fluoreszenzintensität (Mittelwert)	Standardabweichung
Spezifische Bindung	0	3,20	0,14
	0,01	3,40	0,42
	0,025	2,87	0,23
	0,05	3,00	0,00
	0,1	2,53	0,12
	0,5	1,83	0,06
	1	2,43	0,42
	5	1,70	0,10
Unspezifische Bindung	0	0,60	0,00
	1	0,57	0,06

F-Cadaverin

Tabelle 24: Oberflächenkopplung von F-Cadaverin (1,5 nmol, 0,15 nmol und 0,015 nmol) an PLGA-Partikel, Argonlaser (Flowcytometrie) 1300 V

Pluronic® [%]	Fluoreszenzintensität (1,5 nmol F-Cadaverin)	Fluoreszenzintensität (0,15 nmol F-Cadaverin)	Fluoreszenzintensität (0,015 nmol F-Cadaverin)
0	7	0,8	1,3
0,01	5,5	1,3	0,8
1	2,1	0,7	0,6

A.1.2 Oberflächenkopplung an Polystyren-Partikel

F-WGA

Tabelle 25: Oberflächenkopplung von F-WGA (0,75 nmol, 0,075 nmol und 0,0075 nmol) an 3 µm Polystyren-Partikel (Flowcytometrie)

Pluronic® [%]	Fluoreszenzintensität (0,75 nmol F-WGA)	Fluoreszenzintensität (0,075 nmol F-WGA)	Fluoreszenzintensität (0,0075 nmol F-WGA)
0	177,9	37,9	6,9
0,01	53,1	21,3	6,8
1	46,7	13,7	5,5

F-IgG

Tabelle 26: Oberflächenkopplung von F-IgG (0,075 nmol) an 3 µm Polystyren-Partikel (Flowcytometrie)

	Pluronic® [%]	Fluoreszenzintensität
Spezifische Bindung	0	21,6
	0,01	19,6
	1	15
Unspezifische Bindung	0	12,6
	1	11,4

Fluoresceinamin

Tabelle 27: Oberflächenkopplung von F-IgG (7,5 nmol) an 3 µm Polystyren-Partikel (Flowcytometrie)

	Pluronic® [%]	Fluoreszenzintensität
Spezifische Bindung	0	42,7
	0,01	32,5
	1	40,1
Unspezifische Bindung	0	3,8
	1	3,2

A.2 Kovalente Kopplung von F-WGA an Polystyren-Partikel

Tabelle 28: Oberflächenkopplung von F-WGA an 3 µm Polystyren-Partikel in Prozent

Pluronic® [%]	Fluoreszenzintensität (Wiederholung 1)	Fluoreszenzintensität (Wiederholung 2)	Fluoreszenzintensität (Wiederholung 3)
0	100,00	100,00	100,00
0,01	85,76	85,82	103,68
0,025	101,38	75,48	99,13
0,05	92,80	79,09	92,21
0,1	107,50	92,91	102,38
0,5	105,97	84,01	76,62
1	122,51	109,86	76,41
5	73,92	60,70	75,32

A.3 Kovalente Kopplung von Liganden unterschiedlicher Größe an PLGA-Partikel

F-WGA

Tabelle 29: Oberflächenkopplung von F-WGA (0,3 nmol) an PLGA-Partikel (Flowcytometrie)

	Pluronic® [%]	Fluoreszenzintensität (Mittelwert)	Standardabweichung
Spezifische Bindung	0	26,08	1,24
	0,01	23,45	1,13
	0,025	19,08	2,16
	0,05	19,50	0,07
	0,1	22,48	2,65
	0,5	16,40	0,78
	1	17,73	0,60
	5	13,70	0,64
Unspezifische Bindung	0	0,88	0,04
	1	0,88	0,18

F-IgG

Tabelle 30: Oberflächenkopplung von F-IgG (0,03 nmol) an PLGA-Partikel (Flowcytometrie)

	Pluronic® [%]	Fluoreszenzintensität (Mittelwert)	Standardabweichung
Spezifische Bindung	0	19,07	1,66
	0,01	19,95	0,78
	0,025	19,07	1,74
	0,05	17,16	1,04
	0,1	16,62	0,44
	0,5	11,53	0,60
	1	9,29	1,46
	5	6,63	0,55
Unspezifische Bindung	0	0,88	0,49
	1	0,88	0,10

F-Cadaverin

Tabelle 31: Oberflächenkopplung von F-Cadaverin (1,5 nmol) an PLGA-Partikel (Flowcytometrie)

	Pluronic® [%]	Fluoreszenzintensität (Mittelwert)	Standardabweichung
Spezifische Bindung	0	51,47	6,82
	0,01	50,20	12,25
	0,025	45,30	0,99
	0,05	55,00	7,06
	0,1	49,40	2,69
	0,5	38,47	2,46
	1	33,20	3,44
	5	26,13	2,80
Unspezifische Bindung	0	12,10	0,70
	1	11,77	0,51