



universität
wien

DIPLOMARBEIT / DIPLOMA THESIS

Titel der Diplomarbeit / Title of the Diploma Thesis

„Herstellung, Charakterisierung und Modifikation von
Nanopartikeln aus bovinem Serumalbumin mit dem
Targeter-Molekül WGA als Teil der Hüllmatrix“

verfasst von / submitted by

Domenik Grünwald

angestrebter akademischer Grad / in partial fulfilment of the requirements for the degree of
Magister der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2021 / Vienna, 2021

Studienkennzahl lt. Studienblatt /
degree programme code as it appears on
the student record sheet:

UA 449

Studienrichtung lt. Studienblatt /
degree programme as it appears on
the student record sheet:

Diplomstudium Pharmazie

Betreut von / Supervisor:

a.o. Univ.-Prof. Mag. Dr. Michael WIRTH

Danksagungen

An dieser Stelle möchte ich mich bei all jenen bedanken, die an der Entstehung dieser Arbeit beteiligt waren und mich während des Studiums unterstützten:

Allen voran sind ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Michael Wirth und ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Franz Gabor zu nennen, die mir durch die Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe die Durchführung dieser wissenschaftlichen Arbeit ermöglicht haben. Letztgenannten bin ich außerdem für die umfassende Betreuung sehr verbunden!

Ein großes Dankeschön möchte ich auch Frau Mag. pharm. Katharina Skoll aussprechen, die mir stets tatkräftig zur Seite stand und jederzeit für Hilfestellung und Unterstützung erreichbar war!

Weiters möchte ich mich auch bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe bedanken. Durch Eure Gesellschaft, Hilfsbereitschaft und aufmunternden Worte wurde mein Laboralltag ungemein erleichtert!

Vielen Dank auch an Frau Mag. Birgit Becker, an den Rest der Familie und alle Arbeitskollegen, dass sie mich mit viel Herzlichkeit in ihr Team aufgenommen haben und mir die Absolvierung des Aspirantenjahres ermöglichen.

Mein aufrichtiger Dank gebührt außerdem meiner Familie, allen voran meinen Eltern, die mir in jeder erdenklichen Situation zur Seite standen und mich ermutigt haben.

Abschließend möchte ich mich noch bei meinen Studienkollegeninnen und -kollegen sowie meinen Freunden bedanken, die mich ständig motivierten und meine Studienzeit zu einem unvergesslichen Lebensabschnitt machten!

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	7
1.1. Allgemeiner Teil	7
1.2. Nanopartikuläre Systeme und deren Anwendung	7
1.3. Materialien zur Partikelbildung	8
1.4. Herstellungsmethoden für Nanopartikel	9
1.5. Aktives Drug Targeting	9
2. Zielsetzung	11
3. Materialien und Methoden	12
3.1. Verwendete Materialien	12
3.2. Verwendete Geräte	13
3.3. Verwendete Pufferlösungen	14
3.4. Zellkultur	14
3.4.1. Verwendete Chemikalien und Zellen	14
3.4.2. Passagieren von 5637-Zellen	15
3.4.3. Kultivierung von 5637-Zellen in 96-Well-Mikrotiterplatten	15
3.5. Herstellung und Modifikation der Proteinpartikel	16
3.5.1. Optimiertes Herstellungsverfahren	16
3.5.2. Optimierung des Waschvorganges	17
3.5.2.1. Erstellung einer Kalibrationsgerade mit BSA	18
3.6. Quantifizierung des Proteingehaltes der Nanokapseln	19
3.7. Partikelcharakterisierung	20
3.7.1. Bestimmung der Partikelgröße und Größenverteilung (PDI)	20
3.7.2. Messung des Zetapotentials	20
3.8. Stabilitätsmessungen und Frier-Tau-Experiment	20
3.9. Rasterelektronenmikroskopie	21
3.10. Bindungsstudien an Zellmodellen	21
3.10.1. Monolayerversuch	21
3.10.2. Einzelzellversuch	22

3.10.3. Kolokalisationsstudien	23
4. Ergebnisse und Diskussion	24
4.1. Proteinpartikelherstellung	24
4.1.1. Analyse der Waschzentrifugate.....	25
4.1.2. Proteingehalt der Kapseln	27
4.1.3. Größenvergleich unterschiedlicher Partikelchargen	28
4.1.4. Elektronenmikroskopische Evaluierung der Proteinkapseln (REM)	30
4.2. Stabilitätsmessungen	31
4.2.1. Zetapotentialmessungen und Lagerstabilität	31
4.2.2. Stabilität der Partikelsuspension über Stunden	34
4.2.3. Frier-Tau-Methode	35
4.3. Bindungsstudien an 5637-Zellen	36
4.3.1. Monolayerversuch.....	36
4.3.2. Durchflusszytometrische Analyse von Einzelzellen (FACS)	39
4.3.3. Mikroskopische Analyse und Kolokalisationsstudien	40
5. Zusammenfassung	43
6. Abstract.....	44
7. Abkürzungsverzeichnis	45
8. Abbildungsverzeichnis	46
9. Tabellenverzeichnis	46
10. Literaturverzeichnis	47

1. Einleitung

1.1. Allgemeiner Teil

Die pharmazeutische Technologie ist jener Teilbereich der Pharmazie, der sich mit der Formulierung von Arzneiformen beschäftigt. Dies ermöglicht es, Wirkstoffe in eine Form zu bringen, die den physiologischen Anforderungen des Applikationsortes und dem gewünschten Freisetzungsprofil angepasst ist. Außerdem werden hierbei die chemisch-physikalischen Eigenschaften (Bsp. Löslichkeit und Verteilungskoeffizient) der jeweiligen Stoffe bei der Verarbeitung berücksichtigt. Dadurch entstehen unterschiedliche Arzneiformen, wie zum Beispiel Tabletten, Suppositorien und Salben. Welche Darreichungsform schlussendlich zur Therapie verwendet wird, ist vom Krankheitsbild abhängig. [1]

1.2. Nanopartikuläre Systeme und deren Anwendung

Der Fokus der Arzneimittelentwicklung wurde in den letzten Jahren vermehrt auf die Nanotechnologie gelegt. Dieser spezielle Bereich befasst sich mit Arzneiformulierungen im Nanometerbereich (1 nm – 1000 nm), die bemerkenswerte Eigenschaften hinsichtlich Liberation und Absorption besitzen. Die Verkleinerung der Arzneiformen in den nanoskaligen Größenbereich führt zu einer größeren spezifischen Oberfläche und folglich zu einer verbesserten Löslichkeit. Dadurch erfolgt eine rasche Freisetzung des verkapselten Wirkstoffes, was wiederum eine höhere Absorption ermöglicht. Dies hat schließlich zur Folge, dass die Bioverfügbarkeit des Arzneistoffes erhöht wird und die zu verabreichende Dosis reduziert werden kann. [2]

Außerdem kann die Aufnahme der Nanopartikel in die Zellen durch den Partikeldurchmesser gesteuert werden. Kleine Partikel können entweder durch Clathrin- (bis 200 nm) oder durch Caveolin-vermittelte Endozytose (bis 500 nm) aufgenommen werden. Bei größeren nanopartikulären Systemen (bis 5 µm) erfolgt die Aufnahme mittels Makropinozytose. Durch die Internalisation über Caveolin-Proteine wird der Transport von Nanopartikeln in die Lysosomen verhindert, wodurch eine Inaktivierung empfindlicher inkorporierter Arzneistoffe wie Peptide oder Nukleinsäuren vermieden wird. [2]; [3]; [4]

Bei intravenöser Applikation beeinflusst der Partikeldurchmesser zusätzlich auch die Distribution des verkapselten Wirkstoffes im Organismus. Hierbei können die Partikel das Gefäßsystem nur durch Öffnungen des Endothels verlassen, die in etwa eine Größe von 150 nm besitzen. Vor allem im Tumorgewebe akkumulieren Nanopartikel aufgrund der

induzierten Angiogenese. [2] Dies erklärt sich aufgrund des EPR-Effektes (Enhanced Permeability and Retention) [5]. Während der Gefäßbildung kommt es zur Entstehung einer von Lücken geprägten Endothelschicht, die eine Diffusion der Partikel in das betroffene Gewebe ermöglicht („passives targeting“ bzw. „natürliches targeting“). Dadurch können höhere lokale Wirkstoffkonzentrationen erzielt werden und eine Dosisreduktion erfolgen. [6] Aufgrund dieser Vorteile ist die Therapie von Tumorerkrankungen eines der wichtigsten Forschungsgebiete von Nanopartikeln [7].

Nanopartikuläre Systeme eignen sich aber nicht nur als Wirkstoffträger, sondern fungieren in der medizinischen Bildgebung (Bsp. Computertomografie) auch als Kontrastmittel [8]. Des Weiteren werden Nanopartikel in Form von Sensoren in der medizinischen Diagnostik zur Früherkennung von Krankheiten genutzt [9].

1.3. Materialien zur Partikelbildung

Zur Produktion von Nanopartikeln können unterschiedlichste Polymere verwendet werden.

Dazu zählt unter anderem das häufig eingesetzte Polylactid-co-Glycolid (PLGA) aus Milch- und Glycolsäure. PLGA ist ein synthetisches und bioabbaubares Polymer, das aufgrund der chemischen Struktur an der Oberfläche derivatisiert werden kann, um aktive zielgerichtete und organspezifische Applikationen zu ermöglichen [10].

Mittlerweile gewann jedoch der Einsatz von Proteinen als Hüllmaterial immer mehr an Bedeutung. Vor allem tierische (Bsp. BSA), aber auch humane Serumalbumine (Bsp. HSA) eignen sich aufgrund ihrer guten Verträglichkeit besser zur Partikelbildung als PLGA. Ein großer Vorteil vom Einsatz von Proteinen als natürliche Polymere ist, dass diese biologisch abbaubar sind und auch keine immunologischen oder toxischen Reaktionen im Körper induzieren. [11] Es wurden bereits HSA-Nanopartikel mit eingebautem Zytostatikum (Bsp. Paclitaxel) zur experimentellen Therapie von Krebserkrankungen entwickelt [12].

Bei Albuminen handelt es sich um physiologische Plasmaproteine, die in der Leber synthetisiert werden. Daher kann die Albuminkonzentration im Blutplasma als Indikator für Lebererkrankungen herangezogen werden. Diese Proteine sind außerdem für den Transport von Pharmaka, Vitaminen und Kationen zuständig. Des Weiteren sind Albumine auch für die Aufrechterhaltung des kolloidosmotischen Drucks essenziell. [13]

1.4. Herstellungsmethoden für Nanopartikel

Zur praktischen Nanopartikelfertigung finden unterschiedliche Verfahren Anwendung, die sich an der Art des Polymers und der chemisch-physikalischen Beschaffenheit des zu verkapselnden Wirkstoffes orientieren. Bei natürlichen und synthetischen Polymeren werden meist physikalische Methoden eingesetzt, wie zum Beispiel Ultraschall und Hochdruckhomogenisation, aber auch Fällungsverfahren können zur Herstellung von Nanopartikeln verwendet werden. [14] Der Einsatz von Ultraschallwellen wird jedoch bevorzugt, da es während der Hochdruckhomogenisation zur Kontamination der Partikelsuspension mit Öl- und Metallrückständen kommen könnte [15]. Außerdem entfällt hierbei der Einsatz von giftigen Chemikalien.

1.5. Aktives Drug Targeting

Die Forschung der pharmazeutischen Technologie befasst sich außerdem intensiv mit der aktiven zielgerichteten Anwendung („aktives targeting“) von Arzneimitteln. Vor allem der Einsatz von Lektinen spielt hierbei eine sehr große Rolle [16].

Lektine sind pflanzliche Proteine nicht immunologischen Ursprungs, die spezifische Mono- oder Oligosaccharide der Zelloberfläche binden können. Diese Spezifität für Zuckerkomponenten ermöglicht vielseitige Anwendungen. [17] Besonders erwähnenswert ist hierbei das Weizenkeimlektin (WGA), das aus *Triticum vulgare* isoliert wird. WGA interagiert mit N-acetyl-D-Glucosamin- und Sialinsäureresten [18], die vor allem auf der Glykokalyx von Blasenkarzinomen überexprimiert sind. [19] Durch die Modifikation der Nanopartikel mit diesem biorekognitiven Protein konnte bereits eine verstärkte Affinität und Endozytose der Partikel in Krebszellen des Urothels gezeigt werden [20]. Auf Basis dieser Erfahrungen können schließlich auch neue Therapieansätze für Blasenkarzinome erprobt und etabliert werden.

Bei der Therapie von Blasenkrebs sollte zunächst, wenn technisch möglich eine Resektion kleinerer Karzinome mittels Elektroschlingen durchgeführt werden. Anschließend werden bei Patienten mit niedrigem oder mittlerem Rückfallrisiko über intravesikale Instillation (Instillationstherapie) zusätzlich Zytostatika appliziert, um ein erneutes Auftreten des Tumors zu verhindern. Häufig eingesetzte Wirkstoffe sind hier Mitomycin C, Epirubicin und Gemcitabin. [21] Bei einer instillativen Therapie wird der Wirkstoff über einen Katheter direkt in das Blasenlumen verabreicht. Folglich kommt es zu einer signifikant höheren Arzneistoffkonzentration in der Harnblase und zu einer Reduktion der notwendigen Dosis. [22] Aufgrund der begrenzten lokalen Wirkung bleiben systemische Nebenwirkungen

weitgehend aus [23]. Die Nanopartikel können somit als Wirkstoffträger eines Chemotherapeutikums fungieren und eine weitere Therapiemöglichkeit bei Blasenkarzinomen darstellen.

2. Zielsetzung

Im Zuge dieser Diplomarbeit wird ein bereits etabliertes Herstellungsprotokoll von Proteinnanopartikel aus HSA und Dodecan [24] angewendet und optimiert. Dabei soll die Optimierung hinsichtlich der Partikeleigenschaften wie Größe, Größenverteilung und Zetapotential erfolgen. Des Weiteren sollen Partikelsuspensionen hergestellt werden, die über einen gewissen Zeitraum gelagert werden können. Die Partikelausbeute soll ebenfalls maximiert werden. Aus kostentechnischen Gründen [15] und zur Etablierung eines geeigneten Herstellungsprotokolls wird zur Bildung der Proteinhülle BSA statt HSA verwendet. BSA besitzt eine strukturelle Homologie zur dreidimensionalen Struktur von HSA [25] und unterscheidet sich lediglich durch wenige Aminosäuren [15]. Zusätzlich sollte ein Austausch des Kernmaterials von Dodecan durch Hexan vorgenommen, und die Auswirkungen auf die chemisch-physikalischen Parameter untersucht werden.

Ein weiteres Ziel der Diplomarbeit ist es, Proteinpartikel mit WGA als Komponente in der Partikelmatrix zu produzieren, um dadurch ein gezieltes Drug Delivery System herzustellen. Dadurch soll aufgrund spezifischer Interaktionen zwischen dem Lektin und Zuckerstrukturen der Zelloberfläche eine höhere Affinität an 5637-Zellen – einer Zelllinie des humanen Blasenkarzinoms – erzielt werden. Diese Zelllinie wird verwendet, um zukünftig eine zielgerichtete intravesikale Instillation der mit Zytostatikum beladenen Proteinpartikel zu ermöglichen. Diese Arzneiform könnte eine weitere Therapiemöglichkeit bei Blasenkrebs darstellen. Die höhere Affinität soll anschließend mit entsprechenden Bindungsstudien bestätigt werden. Bei diesen Experimenten kommen Oil Red O- und fBSA modifizierte Partikel zum Einsatz, um Fluoreszenz- (fBSA) und Absorptionsmessungen (ORO) zu durchzuführen.

3. Materialien und Methoden

3.1. Verwendete Materialien

Hersteller	Material
Vector Laboratories Inc. (Burlingame, USA)	• Weizenkeimlektin von Triticum Vulgare (WGA)
Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)	• Dodecan ($C_{12}H_{26}$) • Hexan (C_6H_{14}) • Natriumchlorid (NaCl) • Calciumchlorid-dihydrat ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$) • HEPES (Pufferan® $\geq 99,5\%$, buffer grade; $C_8H_{18}N_2O_4S$)
Sigma-Aldrich Corporation (St. Louis, Missouri, USA)	• Bovines Serum Albumin (BSA) • Fluoreszenz-markiertes Bovines Serum Albumin (fBSA) • Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4) • Paraformaldehyd • Oil Red O (ORO) • Magnesiumchloridhexahydrat ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$)
Greiner bio-one GmbH (Kremsmünster, Österreich)	• 96-well Mikrotiterplatten • 75 cm² Gewebekulturflaschen
Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, Massachusetts, USA)	• Micro BCA Protein Assay Kit
Invitrogen AG (Paisley, Vereinigtes Königreich)	• Alexa-WGA • HOECHST 33342
Riedel-de-Haën (Seelze, Deutschland)	• Kaliumchlorid (KCl) • Dinatriumhydrogenphosphat-dihydrat ($Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$)
E. Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)	• Kaliumphosphat, dibasic (K_2HPO_4) • Ammoniumchlorid

3.2. Verwendete Geräte

Gerät	Hersteller
Laserdiffraktions-Partikelmessgerät	Malvern Panalytical (Malvern, Worcerstershire, Vereinigtes Königreich) • Zetasizer Nano ZS
Mikrotiterplattenfluorimeter	Tecan Austria GmbH (Grödig/Salzburg, Österreich) • Infinite M200
Lichtmikroskop	Carl Zeiss AG (Oberkochen, Deutschland) • Software: AxioVision Rel. 4.8.2
Vortexmischer	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG (Schwabach, GER)
Laborwaage	Sartorius AG (Göttingen, Deutschland) • LC 1201S
Analysenwaage	Sartorius AG (Göttingen, Deutschland) • Cubis MSX
Zentrifuge	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland) • Centrifuge 5804 R
Ultraschall-Homogenisator	Bandelin electronic GmbH und Co. KG (Berlin, Deutschland) Sonoplus HD2070 bestehend aus: • HF-Generator (GM 2070) • Boosterhorn (SH 213 G) • Sonotrode (Mikrospitze MS 73)
Elektronenmikroskop	Hitachi (Tokio, Japan) • FLEXSEM-1000
Durchflusszytometer	Beckman Coulter Gallios 6C (Indianapolis, USA)
Lyophilisierungsanlage	Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH (Osterode am Harz, Deutschland) • Alpha 1 – 4 LDplus
Brutschrank	Thermo Scientific BBD 6220 (Waltham, USA) • BBD 6220

Sicherheitswerkbank	ESCO Micro Pte. Ltd. (Singapur) • Labculture Plus
Magnetrührer inkl. Heizplatte	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG (Schwabach, Deutschland) • MR 3001 K
Wasserbad	Gesellschaft für Labortechnik mbH (Burgwedel, Deutschland) • GFL 1092
Dialyse Schläuche 12 kD	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)

3.3. Verwendete Pufferlösungen

20 mM isotoner HEPES/Natriumhydroxid (NaOH)-Puffer pH 7,4	• 4,77 g HEPES und 8 g NaCl in 1000 ml Aqua dest. lösen und mit 4 M NaOH auf pH 7,4 einstellen.
100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,4	• 6,0595 g K_2HPO_4 • 2,07 g KH_2PO_4 • ad 500 ml Aqua dest.
100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 8,0	• 8,141 g K_2HPO_4 • 0,444 g KH_2PO_4 • ad 500 ml Aqua dest.
0,5 M EDTA-Lösung pH ~ 9,0	• 104 g EDTA-Tetra-Natrium wird mit 500 ml Aqua dest. versetzt und mit HCl auf pH 9,0 eingestellt bis es sich löst.

3.4. Zellkultur

3.4.1. Verwendete Chemikalien und Zellen

- **RPMI-Medium** mit 10% FCS, 4 mM L-Glutamin und 2 ml Gentamycin (150 µg/ml)
Zur Herstellung des Mediums wird eine Flasche RPMI Pulver in 900 ml Aqua dest. gelöst. Danach wird der pH der Lösung zunächst mit 4 M HCl auf 4,0 und anschließend mit 4 M NaOH auf 7,2 eingestellt. In weiterer Folge wird noch

2 g NaHCO_3 gelöst und zusätzlich 2 ml Gentamycin, wie auch 100 ml FCS zugesetzt. Zum Abschluss wird das RPMI-Medium sterilfiltriert.

- **PBS/EDTA 0,1 %**

Zur Herstellung des Puffers wird 1 g EDTA in 900 ml destilliertem Wasser gelöst und anschließend mit einer 10-fach konzentrierten PBS-Stammlösung auf 1000 ml aufgefüllt. Da dieser Puffer beim Waschen von Zellen angewendet wird, muss zusätzlich eine Sterilfiltration erfolgen.

- **0,25 % (W/V) Trypsin/EDTA** Lösung von Sigma-Aldrich Corporation (St-Louis, USA)

3.4.2. Passagieren von 5637-Zellen

Zu Beginn werden zunächst Medium, Puffer und Trypsin/EDTA auf 37 °C gewärmt. Wenn die Zellen 80 % konfluent gewachsen sind, können diese folglich passagiert werden. Zur Subkultivierung der 5637-Zellkultur wird das verbrauchte Nährmedium unter sterilen Bedingungen abgesaugt. Durch einen Waschschrift mit 2 ml PBS/EDTA werden die nicht angehafteten oder toten Zellen entfernt. Um die Zellen von der Oberfläche der Kulturflasche abzulösen, wird anschließend das Puffermedium durch 2 ml Trypsin/EDTA ersetzt und 15 Minuten lang im Brutschrank inkubiert (37 °C, 95 % Luftatmosphäre, 5 % CO_2).

Nach der Inkubation werden die abgelösten Zellen in 10 ml RPMI aufgenommen und die Zellsuspension 5 Minuten bei 1000 RPM zentrifugiert. Danach wird der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in 2 ml RPMI resuspendiert. Im finalen Schritt werden in einer neuen 75 cm² Gewebekulturflasche erneut 10 ml RPMI-Medium vorgelegt und abschließend 50 µl Zellsuspension (entspricht in etwa 3 – 5 Tropfen) zugesetzt.

Die weitere Kultivierung erfolgt im Brutschrank bei 37 °C, 95 % Luftatmosphäre und 5 % CO_2 .

3.4.3. Kultivierung von 5637-Zellen in 96-Well-Mikrotiterplatten

Um Bindungsstudien an Zellmodellen durchzuführen, wird ein Zell-Monolayer in einer 96-Well-Mikrotiterplatte gezüchtet.

Hierfür wird mittels Zählkammer und Lichtmikroskop die Zellzahl pro Milliliter bestimmt und anschließend 17000 Zellen/Well angesetzt.

Eine 90 – 100%ige Konfluenz pro Well ist nach einer Zeit von ca. 5 Tagen im Brutschrank (37 °C, 95% Luftatmosphäre, 5 % CO_2) erreicht. Nach einer mikroskopischen Verifikation kann der Monolayer für Bindungsaffinitätsstudien verwendet werden.

3.5. Herstellung und Modifikation der Proteinpartikel

3.5.1. Optimiertes Herstellungsverfahren

Zur Herstellung der Proteinpartikel wird nach einem bereits vorliegenden Protokoll [24] gearbeitet und dieses schließlich optimiert.

In einem 25 ml Becherglas werden 20 mg BSA oder fBSA in 10 ml Kaliumphosphatpuffer (100 mM, pH 8,0) gelöst. Anschließend wird die Proteinlösung in einen 25 ml Messzylinder übergeführt und sofort mit 3,3 ml des gewünschten organischen Lösungsmittels (Bsp. Hexan oder Dodecan) versetzt. Durch die unterschiedlichen hydro- und lipophilen Eigenschaften der beiden Flüssigkeiten kommt es folglich zu einer Phasentrennung. Die organische Phase befindet sich aufgrund der geringeren Dichte über der wässrigen Lösung.

Zur Partikelfertigung wird die Mischung nun mittels Ultraschallsonde mit 40% Intensität und 10% Pulsation für 2 Minuten beschallt. Die Pulsation beschreibt hierbei die Frequenz der Ultraschallimpulse. Die Eintauchtiefe der Sonotrodenspitze ist der Meniskus der Grenzfläche zwischen den beiden Phasen. Während der Ultraschallbehandlung muss zusätzlich der Inhalt des Messzylinders mit Hilfe eines Eisbades gekühlt werden, um eine starke Hitzeentwicklung und folglich eine Denaturierung des Proteins zu verhindern. Die entstandenen Nanokapseln befinden sich schließlich in der wässrigen Phase. Danach wird die Partikelsuspension über Nacht im Kühlschrank bei 4 °C gelagert, um eine optimale Phasentrennung zu gewährleisten.

Zur Aufreinigung werden die Proteinpartikel am darauffolgenden Tag mittels Zentrifuge gewaschen (5000 RPM, 5 Minuten, 4 °C). Dadurch erfolgt eine Abtrennung des Proteinanteils, der nicht an der Bildung der Partikelhülle beteiligt ist. Nach dem Zentrifugieren schwimmen die Partikel an der Oberfläche. Mit einer Spritze und entsprechender Kanüle wird die wässrige Phase unterhalb der Proteinkapseln entfernt und durch frischen Kaliumphosphatpuffer (100 mM, pH 7,4) ersetzt. Anschließend wird der Waschschrift vier Mal wiederholt (Abschnitt 3.5.2.) und nach dem letzten Zyklus das Partikelpellet im Kaliumphosphatpuffer (100 mM, pH 7,4) resuspendiert.

Nach den Waschvorgängen wird die Partikelsuspension in einen 25 ml Scheidetrichter überführt und über Nacht bei Raumtemperatur stehen gelassen. Dadurch werden das überschüssige – nicht verkapselte – organische Lösungsmittel und Partikel mit einem zu großem Durchmesser abgetrennt.

Am darauffolgenden Tag wird die untere – wässrige – Phase mit den Proteinnanopartikeln abgelassen und schlussendlich charakterisiert.

Zur Durchführung von Bindungsaffinitätsstudien an Zellen und zur Sichtbarmachung der Proteinpartikel werden die Kapseln mit dem lipophilen Farbstoff „Oil Red O“ gefärbt.

Zur Färbung der Partikel werden 2,561 mg der Festsubstanz von ORO in 3,3 ml des organischen Lösungsmittels gelöst. Durch leichtes Erhitzen und Rühren mit Hilfe eines Magnetrührers kann eine transparente Lösung nach wenigen Minuten erreicht werden. Diese lipophile Phase wird schließlich zu der Proteinlösung in einem 25 ml Becherglas pipettiert. Das weitere Prozedere erfolgt gemäß der bereits oben beschriebenen Herstellungsvorschrift.

Um Proteinkapseln Targeting-Eigenschaften zu verleihen, kann in die Proteinhülle zusätzlich WGA als Targeting-Molekül implementiert werden. Die Zellaффinität wird anschließend mittels Bindungsstudien an 5637-Zellen überprüft.

Um möglichst kostengünstig und ressourcenschonend zu arbeiten, wird bei diesem Herstellungsverfahren der halbe Ansatz von BSA/fBSA und ORO gewählt. Zur Herstellung der modifizierten Proteinpartikel werden somit in einem 10 ml Becherglas 1,805 mg WGA und 8,195 mg BSA/fBSA in 5 ml Kaliumphosphatpuffer (100mM, pH 8,0) gelöst. Anschließend wird 1,65 ml organisches Lösungsmittel (Dodecan) mittels Eppendorf-Pipette zugesetzt. Das weitere Prozedere erfolgt gemäß dem bereits oben beschriebenen Herstellungsverfahren.

3.5.2. Optimierung des Waschvorganges

Zur Bestimmung der optimalen Anzahl an Waschvorgängen wird bei jedem Waschschrift mittels BCA-Assay (Bicinchoninic Acid Assay) der nicht partikelbildende Anteil des eingesetzten Proteins ermittelt.

Nach Beendigung der einzelnen Waschzyklen wird die wässrige Phase unterhalb der aufschwimmenden Proteinpartikel unter Zuhilfenahme einer Spritze mit zugehöriger Kanüle abgesaugt und in ein separates Gefäß (Eppendorf-Mikroreaktionsgefäß) überführt. Nach dem Sammeln dieser Flüssigkeiten werden jeweils 150 µl in drei Wells (Dreifachbestimmung) einer 96-Well-Mikrotiterplatte pipettiert.

Mit Hilfe der Unterlagen des „Micro BCA Protein Assay Kit“ wird anschließend das erforderliche Nachweisreagenz hergestellt. Hierfür werden zunächst 25 Teile der Micro BCA Reagenz MA (alkalischer Tartrat-Carbonat-Puffer) [26] mit 24 Teilen des Micro BCA Reagenz MB (Bicinchoninsäure-Lösung) [27] gemischt. Zum Schluss wird dieser Mischung noch 1 Teil der Micro BCA Reagenz MC (Kupfer (II)-sulfat-Lösung) [28] zugesetzt. [29]

Die hierfür benötigte Menge wird über die Anzahl der zu messenden Proben inklusive Mehrfachbestimmungen und Blank-Werte errechnet. Nach der Herstellung dieses Nachweisreagenz werden ebenfalls 150 µl den bereits befüllten Wells zugesetzt. Somit befinden sich in einem Well 150 µl Probe und 150 µl Nachweisreagenz. Danach wird die Mikrotiterplatte mit einer Folie versiegelt. Mittels TECAN wird die Platte 30 Sekunden geschüttelt und schließlich 2 Stunden bei 37 °C inkubiert. Danach wird die 96-Well-Platte auf Raumtemperatur abgekühlt und die Absorption über den Mikroplattenleser bei einer Wellenlänge von 562 nm (Absorptionsspektrum von BSA) gemessen. Abschließend wird der durchschnittlich gemessene Blank-Wert subtrahiert und die Proteinkonzentration mithilfe einer Kalibrationsgerade (Abschnitt 3.5.2.1.) bestimmt.

3.5.2.1. Erstellung einer Kalibrationsgerade mit BSA

Für eine reproduzierbare Quantifizierung der Proteinkonzentration des Waschmediums muss zunächst eine Kalibrationsgerade erstellt werden.

Unter Zuhilfenahme des „Micro BCA Protein Assay Kit“ wird eine Verdünnungsreihe mit dem gewünschten Lösungsmittel (Kaliumphosphatpuffer, pH 7,4), ausgehend von einer definierten BSA-Stammlösung (2 mg/ml) hergestellt:

- | | | |
|--------------------|---------------------|----------------------|
| • 1:10 (200 µg/ml) | • 1:200 (10 µg/ml) | • 1:2000 (1 µg/ml) |
| • 1:50 (40 µg/ml) | • 1:400 (5 µg/ml) | • 1:4000 (0,5 µg/ml) |
| • 1:100 (20 µg/ml) | • 1:800 (2,5 µg/ml) | |

Durch diese Verdünnungsreihe wird ein möglichst breiter Konzentrationsbereich (0,5 µg/ml – 200 µg/ml) abgedeckt. Anschließend erfolgt eine Dreifachbestimmung der jeweiligen Verdünnungen mittels BCA-Assay (Abschnitt 3.5.2.).

Mit Hilfe einer Regressionsanalyse werden dann die detektierten Werte miteinander verglichen und eine Geradengleichung ($y = kx + d$) aufgestellt. Mit dieser Gleichung kann schließlich die Proteinkonzentration der Probe über die gemessenen Absorptionsmaxima berechnet werden.

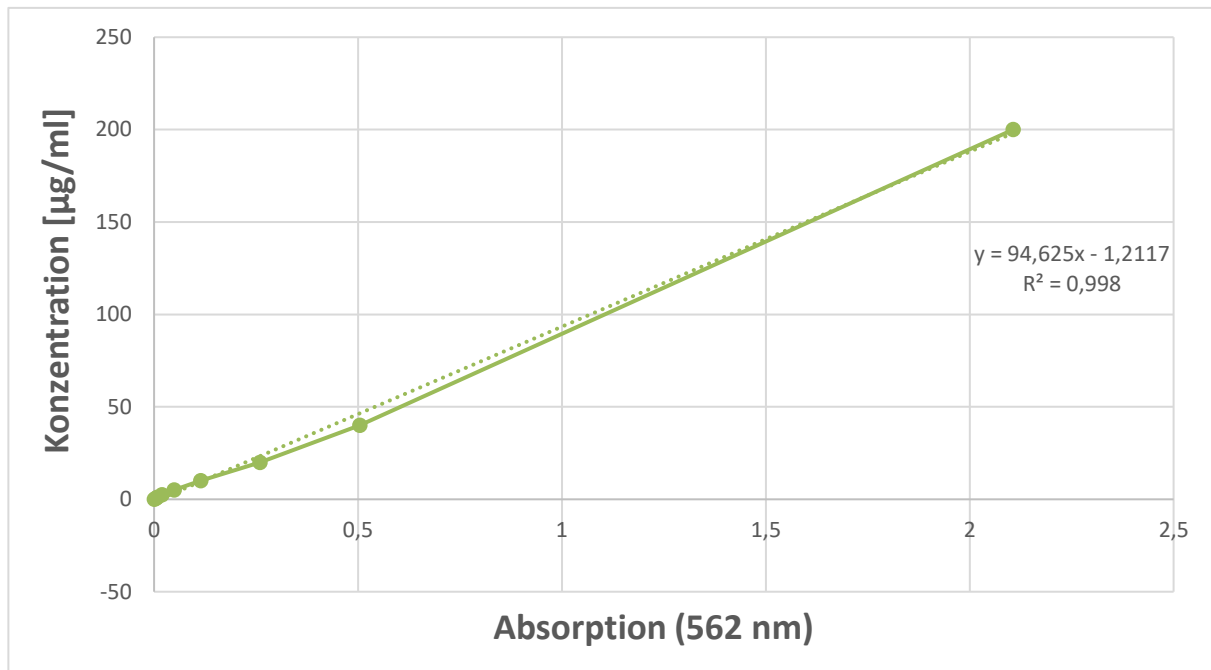


Abbildung 1: Kalibrationsgerade von BSA in Kaliumphosphatpuffer (100 mM, pH 7,4) bei 562 nm.

3.6. Quantifizierung des Proteingehaltes der Nanokapseln

Zur Bestimmung des BSA-Anteils, welcher die Kapselhülle formt, wird die vom Scheidetrichter abgelassene Partikelsuspension gegen Aqua dest. dialysiert. Dabei werden die im Kaliumphosphatpuffer (100 mM, pH 7,4) enthaltenen Salze entfernt. Die verwendeten Dialyseschläuche werden zuerst in 0,5 M EDTA-Lösung – zur Entfernung von Schwermetallen und Proteasen – und dann in reinem Aqua dest. ausgekocht. Danach wird die Suspension in einen dieser Schläuche überführt und schließlich mit entsprechenden Klammern dicht verschlossen. Anschließend wird in einem 2 L Becherglas Aqua dest. vorgelegt und der mit Probe befüllte Dialyseschlauch hinzugegeben. Außerdem ist im Becherglas ein Magnetrührstäbchen platziert, mit dem das System über eine Magnetrührplatte in Bewegung gehalten wird.

Durch regelmäßiges Ersetzen des Dialysemediums mit frischem Aqua dest. erfolgt die Dialyse über einen Zeitraum von drei Tagen. Dadurch wird gewährleistet, dass keine Salze des Kaliumphosphatpuffers (100 mM pH 7,4) in der Partikelsuspension verbleiben.

Nach erfolgreicher Dialyse wird die Suspension des Dialyseschlauches in ein bereits tariertes Gefäß überführt und anschließend lyophilisiert.

Das entstandene Lyophilisat wird ausgewogen und der Wert mit der eingesetzten Menge an BSA verglichen, wodurch der prozentuale Anteil des Hüllproteins ermittelt werden kann.

3.7. Partikelcharakterisierung

Die Charakterisierung der Proteinpartikel impliziert Partikelgröße, Größenverteilung (PDI) und die Messung des Zetapotentials. Zuletzt genannter Parameter ist wichtig, um eine Aussage bezüglich der physikalischen Stabilität der Partikel zu treffen.

3.7.1. Bestimmung der Partikelgröße und Größenverteilung (PDI)

Nach der Herstellung der Proteinnanopartikel (Abschnitt 3.5.1.) kann eine Charakterisierung hinsichtlich Partikelgröße und Größenverteilung (PDI) erfolgen. Mit Hilfe dieser Messgrößen können schließlich die Reproduzierbarkeit und die Lagerstabilität der Partikel untersucht werden. Für diese Messungen wird der Zetasizer Nano ZS verwendet.

Zur Durchführung werden 500 µl der aufgeschüttelten Partikelsuspension mittels Eppendorf-Pipette in eine Kunststoffküvette pipettiert. Die befüllte Küvette wird anschließend im Zetasizer in korrekter Position platziert und gemessen. Es erfolgt eine Dreifachmessung der Probe. Mit den Messergebnissen werden schließlich der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet.

3.7.2. Messung des Zetapotentials

Zur Messung des Zetapotentials wird ebenfalls der Zetasizer Nano ZS benutzt. Spezielle Zetapotentialküvetten werden mit ca. 900 µl Partikelsuspension befüllt und anschließend im Gerät positioniert. Es wird eine Dreifachbestimmung der Probe durchgeführt und sowohl der Mittelwert als auch die Standardabweichung berechnet.

3.8. Stabilitätsmessungen und Frier-Tau-Experiment

Es wurden Stabilitätsmessungen der Partikelsuspensionen bei 4 °C und Raumtemperatur über einen Zeitraum von 14 Tagen durchgeführt. Hierbei wird täglich die Partikelgröße und der PDI mittels Zetasizer Nano ZS bestimmt. Die gemessenen Werte werden schließlich miteinander verglichen und mögliche Unterschiede der Partikeleigenschaften aufgrund der Lagerung analysiert. Durch dieses Verfahren können die idealen Lagerungsbedingungen festgestellt werden.

Außerdem wurde im Zuge der Arbeit die Zeit bis zum Aufschwimmen der Partikel bestimmt. Hierfür wird die Partikelsuspension in einen Scheidetrichter überführt und über eine definierte Zeitspanne stündlich ein aliquoter Anteil abgelassen. Die Probe wird anschließend im Zetasizer Nano ZS gemessen.

Das Frier-Tau-Experiment beschreibt wiederum eine Methode, bei der die Partikelsuspension über einen längeren Zeitraum bei -20 °C in einem Gefrierschrank gefroren wird.

Vor dem Einfrieren sowie nach dem Auftauprozess wird die Suspension betreffend Partikelgröße und PDI im Zetasizer Nano ZS charakterisiert. Dadurch kann eruiert werden, ob eine Langzeitlagerung der Proteinpartikel im gefrorenen Zustand überhaupt möglich ist.

3.9. Rasterelektronenmikroskopie

Um die Form der Proteinpartikel visuell darzustellen, wurde die Technologie der Rasterelektronenmikroskopie verwendet. [30]

Zu Beginn bedarf es jedoch einer speziellen Probenaufbereitung. Die Partikelsuspensionen werden mit 0,9 % NaCl gewaschen, verdünnt und anschließend mit 2,5 % Glutaraldehyd für 2 Stunden bei Raumtemperatur fixiert. Danach werden die Proteinpartikel erneut gewaschen und zur Dehydrierung mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe (30 %, 50 %, 70 %, 80 %, 90 % und 100 %) jeweils 10 Minuten behandelt. Nach dieser Aufbereitung werden die Partikel mit einer Goldschicht überzogen und mit dem Elektronenmikroskop der Firma Hitachi High-Tech Co. (Tokio, Japan) betrachtet und Aufnahmen erstellt.

3.10. Bindungsstudien an Zellmodellen

Bindungsstudien an Zellen sind essenziell, um Informationen über die Bindungsaffinität der Partikel an die Zellmembran zu erhalten. Dadurch können zum Beispiel Vergleiche zwischen Proteinpartikel mit unterschiedlichen organischen Lösungsmitteln aufgestellt werden. Außerdem kann verifiziert werden, ob aufgrund der WGA-Moleküle in der Partikelhülle eine stärkere Bindung an Strukturen auf der Zellmembran besteht und gegebenenfalls eine verbesserte Aufnahme in die Zelle erfolgt.

3.10.1. Monolayerversuch

Es wurden Bindungsstudien mit fBSA- und Oil Red O-Partikeln durchgeführt. Mit Hilfe des spezifischen Absorptionsmaximums von ORO kann die Bindungsaffinität der gefärbten Partikel beurteilt werden. Die Detektion von Fluoreszenzsignalen wurde bei Bindungsstudien der fBSA-Suspensionen genutzt. Die Messungen erfolgen hierbei mittels TECAN.

Zu Beginn müssen die eingesetzten fluoreszierenden fBSA-Partikelsuspensionen hinsichtlich ihrer Fluoreszenzintensität aneinander angepasst werden. Dadurch wird verhindert, dass

unterschiedliche Fluoreszenzwerte auf Unterschiede in der Ausgangsfluoreszenz zurückzuführen sind. Auch die ORO-Suspensionen müssen idente Absorptionswerte besitzen.

Die mit 5637-Zellen konfluent angezüchteten 96-Well-Mikrotiterplatten (Abschnitt 3.4.3.) werden vor Versuchsbeginn ca. 10 – 15 Minuten bei 4 °C gekühlt, um aktive Transportprozesse in die Zelle zu minimieren. Die weiteren Arbeitsschritte erfolgen auf einem Kühlakku, um die Temperatur konstant zu halten. Außerdem muss beim Arbeiten mit fBSA-Partikeln auf Lichtschutz geachtet werden, um keine verfälschten Ergebnisse zu erhalten.

Zunächst wird das verbrauchte Nährmedium (RPMI-Medium) mittels Pasteurpipette und Vakuumpumpe entfernt. Danach werden die Zellen zweimal mit 100 µl HEPES/NaOH-Puffer (isoton, pH 7,4) gewaschen. Nach dem Absaugen des Waschreagens wird in die jeweiligen Wells 100 µl der gewünschten Partikelsuspension pipettiert und der Monolayer für 30 bzw. 60 Minuten im Kühlschrank bei 4 °C inkubiert. Anschließend erfolgt eine Messung am TECAN bei Exzitation 485 nm / Emission 517 nm (fBSA) bzw. bei einem Absorptionsmaximum von 495 nm (ORO).

Danach wird die Partikelsuspension mittels Pasteurpipette und Vakuumpumpe entfernt und erneut zweimal mit 100 µl HEPES/NaOH-Puffer (isoton, pH 7,4) gewaschen. Nach diesem Waschprozess erfolgt wieder eine TECAN-Messung bei den entsprechenden Wellenlängen, um den zellgebundenen Anteil an Partikeln zu bestimmen.

3.10.2. Einzelzellversuch

Bei der Durchführung des Einzelzellversuchs wird die Fluoreszenzintensität der fBSA-Partikel mittels Durchflusszytometrie in einem Flowcytometer gemessen (FACS).

Die Einzelzellversuche wurden mit fBSA-Partikelsuspensionen durchgeführt. Zu Beginn müssen auch bei diesem Zellversuch die verwendeten Partikelchargen hinsichtlich der Fluoreszenzintensitäten angepasst werden, um Unterschiede in der Bindungsaffinität aufgrund ungleicher Ausgangsfluoreszenz zu vermeiden.

Vor dem Versuch wird eine Zellsuspension mit HEPES/NaOH-Puffer (isoton, pH 7,4) auf 12 Millionen Zellen/ml eingestellt und bei 4 °C im Kühlschrank gelagert. Durch die Kühlung werden Transportprozesse in die Zellen reduziert und es kann die Bindung an die Zellmembran untersucht werden. Alle folgenden Arbeitsschritte werden auf einem Kühlakku durchgeführt, um einen Temperaturanstieg zu verhindern. Außerdem ist beim Arbeiten mit fBSA-Partikeln auf Lichtschutz zu achten.

Es werden 50 µl der Zellsuspension mit 50 µl der Partikelsuspension 30 Minuten bei 4 °C inkubiert. Anschließend wird der Mischung 900 µl HEPES/NaOH-Puffer (isoton, pH 7,4)

zugesetzt, in ein Probenröhrchen überführt und im Durchflusszytometer gemessen. Die Ergebnisse werden in Relation gesetzt und die Bindungsaffinität beurteilt.

3.10.3. Kolokalisationsstudien

Zur Analyse, ob die Proteinpartikel lediglich an der Zelloberfläche adhären oder auch von den Zellen aufgenommen werden, wurden fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von 5637-Einzelzellen mittels Fluoreszenzmikroskop angefertigt.

Zur visuellen Unterscheidung der Partikel von den Zellelementen wird der Zellkern mit dem DNA-Fluoreszenzfarbstoff HOECHST blau und die Zellwände mit Alexa-WGA (aWGA) rot gefärbt.

Zu Beginn der Kolokalisationsstudie werden die verwendeten fBSA-Partikelsuspensionen auf die gleiche Fluoreszenz eingestellt. Dadurch wird eine Verfälschung der Ergebnisse aufgrund unterschiedlicher Ausgangsfluoreszenz vermieden. Außerdem wird eine Zellsuspension mit HEPES/NaOH-Puffer (isoton, pH 7,4) auf 12 Millionen Zellen/ml eingestellt und bei 4 °C im Kühlschrank gelagert. Durch die Kühlung wird die Aktivität der Transportprozesse limitiert. Alle folgenden Arbeitsschritte werden auf einem Kühlakku durchgeführt, um einen Anstieg der Temperatur während dem Zellversuch weitestgehend zu verhindern. Es werden 10 µl der Zellsuspension mit 20 µl der entsprechenden Partikelsuspension und 2 µl des DNA-Fluoreszenzfarbstoffs HOECHST (0,5 mg/ml) versetzt und 30 Minuten bei 4 °C bzw. 37 °C inkubiert. Bei 37 °C sind wiederum die Transportprozesse der Zelle aktiv und es erfolgt die Aufnahme der Proteinpartikel in das Zellinnere. Nach der Inkubation bei 37 °C wird die Zellsuspension erneut auf 4 °C abgekühlt und anschließend 3 µl aWGA (0,1 mg/ml) zugesetzt. Anschließend werden die Zell-/Partikel-Suspensionen wieder für 30 Minuten bei 4 °C inkubiert.

Danach wird die Suspension mit HEPES/NaOH-Puffer (isoton, pH 7,4) auf 2 ml ergänzt und zentrifugiert (1000 RPM, 5 Minuten, 4 °C). Nach der Zentrifugation wird der Überstand bis auf 100 µl abgehoben und der Rest mit 100 µl Paraformaldehyd (4% in PBS) versetzt. Diese Mischung wird 10 Minuten bei 4 °C inkubiert, um die Zellen zu fixieren. Anschließend erfolgt die Zugabe von 200 µl Ammoniumchlorid (100 mM) und ein weiterer Waschzyklus mit HEPES/NaOH-Puffer (isoton, pH 7,4). Nach diesem Prozedere können die Einzelzellen im Fluoreszenzmikroskop evaluiert werden.

4. Ergebnisse und Diskussion

4.1. Proteinpartikelherstellung

Zur Bereitung von Proteinpartikeln aus bovinem Serumalbumin wurde ein Herstellungsprotokoll von Rollet et al. [24] verwendet und im Zuge der Diplomarbeit optimiert. Das Ziel hierbei war die Produktion von Proteinnanopartikeln mit einer engen Partikelgrößenverteilung, die über einen längeren Zeitraum stabil sind.

Außerdem wurden im Rahmen der Diplomarbeit Nanokapseln mit unterschiedlichen organischen Lösungsmitteln (Hexan und Dodecan) als Kernkomponente hergestellt und deren Partikeleigenschaften miteinander verglichen.

Der lipophile Kern der Partikel konnte erfolgreich mit dem hydrophoben Farbstoff ORO (Abbildung 2) gefärbt werden, um Bindungsstudien an Zellen durchzuführen und die Nanopartikel optisch sichtbar zu machen. Diese Substanz ist ein Bisazofarbstoff, der zur Färbung von Triglyceriden verwendet wird und anschließend quantifiziert werden kann [31].

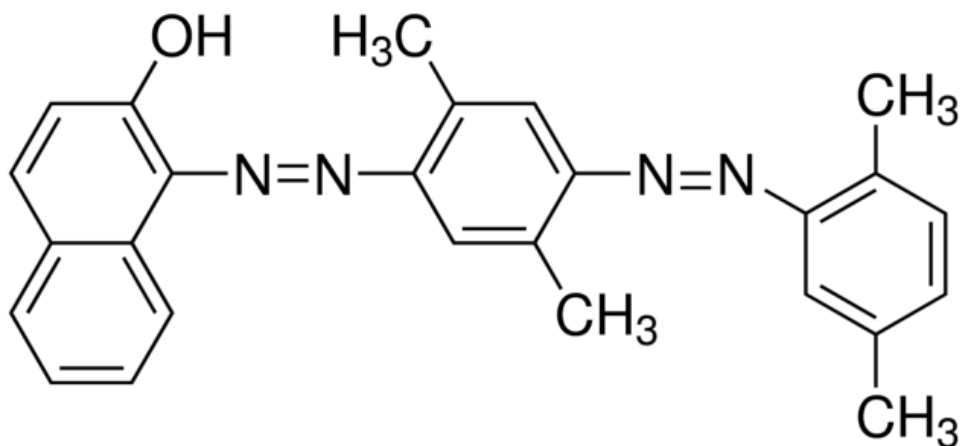


Abbildung 2: Strukturformel von „Oil Red O“. [32]

Nicht modifizierte BSA-Proteinpartikel können aufgrund unspezifischer Wechselwirkungen bereits an die Zelle binden. Die Partikel wurden zusätzlich mittels Einbau von WGA in die Proteinhülle mit einem Targeter-Molekül ausgestattet (Abschnitt 3.5.1.). Das Weizenkeimlektin besitzt nämlich die Fähigkeit, bestimmte Zuckerstrukturen der Zelloberfläche zu binden, wodurch der Lektineinbau eine spezifische Interaktion und somit eine höhere Affinität zu Krebszellen ermöglichen sollte.

Durch die Beschallung (Abschnitt 3.5.1.) werden Tröpfchen des organischen Lösungsmittels in der wässrigen Proteinlösung emulgiert. Außerdem kommt es bei diesem Prozess zur Ausbildung von Disulfid-Brücken zwischen den Cystein-Resten der Proteine und folglich zur Umhüllung der entstandenen Emulsionströpfchen. Diese Bildung basiert auf dem Prinzip der akustischen Kavitation. Hierbei werden durch den sonochemischen Effekt Radikale ($\text{OH}\cdot$, $\text{H}\cdot$) und in Gegenwart von Sauerstoff Superoxide gebildet, die als Oxidationsmittel fungieren. Dadurch werden die Cystein-Seitenketten oxidiert und schließlich Disulfid-Brücken gebildet. [33]

4.1.1. Analyse der Waschzentrifugate

Nach der Herstellung der Partikelsuspension mittels Ultraschallsonde werden die Partikel am nachfolgenden Tag mehrfach gewaschen. Während der einzelnen Waschvorgänge erfolgt die Entfernung des überschüssigen Proteins, das nicht an der Bildung der Partikelhülle beteiligt ist. Das Waschprozedere ist daher einer der wichtigsten Arbeitsschritte in der Partikelproduktion. Während der Diplomarbeit wurde überprüft, wie viele Waschschrirte notwendig sind, um eine möglichst effiziente Aufreinigung der Proteinpartikel zu erzielen.

Die Proteinkonzentrationen der einzelnen Zentrifugate wurden mit Hilfe des BCA-Assay (Bicinchoninic Acid Assay) ermittelt (Abschnitt 3.5.2.).

Die Peptidbindungen des überschüssigen Proteins reduzieren hierbei das zweiwertige Kupfer (Cu^{2+}) zu einwertigem Kupfer (Cu^+), das wiederum durch die Bicinchoninsäure über eine koordinative Bindung komplexiert wird. Der dabei entstehende Komplex mit violetter Färbung besitzt ein Absorptionsmaximum bei 562 nm und kann mittels TECAN gemessen werden. [29] Je mehr Protein daher in den Zentrifugaten enthalten ist, desto höher ist die entsprechende Absorption. Über die detektierten Absorptionswerte konnte schließlich mit Hilfe einer Eichgerade – in der entsprechenden Pufferlösung (Abbildung 1) – die jeweilige Proteinkonzentration der einzelnen Waschzentrifugate mittels Geradengleichung berechnet werden. Der Vergleich dieser Konzentrationen liefert letztendlich Informationen über die maximal erforderliche Anzahl der Waschvorgänge.

Zur Optimierung des Waschprotokolls wurden BSA-Partikel mit dem organischen Lösungsmittel Dodecan als lipophilen Kern hergestellt.

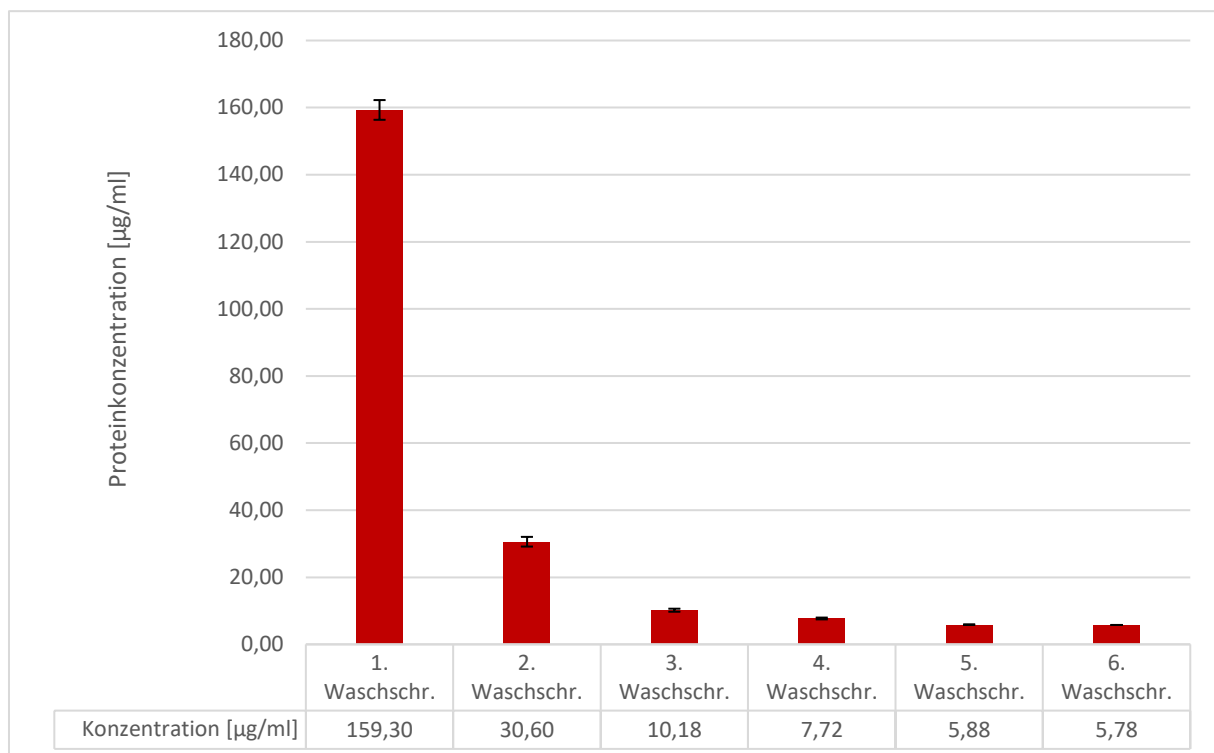


Abbildung 3: Vergleich der Proteinkonzentrationen nach den jeweiligen Waschschr.

Die Ergebnisse in Abbildung 3 illustrieren, dass nach dem ersten Waschschr. die größte Menge an Protein mit $159,3 \pm 2,94 \mu\text{g/ml}$ entfernt wurde. Das entspricht dem Hauptanteil, der nicht an der Verkapselung beteiligt war.

In den nachfolgenden Waschvorgängen (2. Waschschr. – 4. Waschschr.) wurden nur mehr $30,6 \pm 1,44 \mu\text{g/ml}$, $10,18 \pm 0,45 \mu\text{g/ml}$ und $7,72 \pm 0,27 \mu\text{g/ml}$ abgetrennt. In diesen Waschzentrifugaten befindet sich der Rest des nicht als Hüllmaterial fungierenden Proteins und vermutlich auch kleinere Proteinpartikel, die durch die Zentrifugation entfernt wurden.

In den Zentrifugaten 5. (5. Waschschr.) und 6. (6. Waschschr.) wurden mit $5,88 \mu\text{g/ml}$ bzw. $5,78 \mu\text{g/ml}$ fast idente Proteinmengen detektiert. Der Grund hierfür ist vermutlich die Methodik zur Entnahme der wässrigen Phase. Hierbei wird nämlich mittels Spritze und entsprechender Kanüle das aufschwimmende Partikelpellet durchstoßen. Dadurch wird beim Eintauchen der Kanüle ein gewisser Anteil der Partikel mitgerissen, der schließlich mittels TECAN detektiert wird.

Auf Basis dieser Erkenntnisse konnte schließlich gezeigt werden, dass ein Waschprotokoll mit maximal vier Zentrifugationsschritten ausreichend ist, um das überschüssige Protein zu entfernen.

4.1.2. Proteingehalt der Kapseln

Zur Bildung der Proteinhülle der Nanopartikel wurde wie bereits erwähnt, bovines Serumalbumin verwendet, welches sich aufgrund seiner Verträglichkeit und immunologischer Eigenschaften sehr gut als Hüllmaterial für Proteinpartikel eignet. Nach abgeschlossener Optimierung des Waschvorganges (Abschnitt 4.1.1.) wurde untersucht, welcher Anteil der eingesetzten Proteinmenge schließlich für die Bildung der Proteinhülle zuständig ist.

Die Quantifizierung erfolgte hierbei mittels Lyophilisation der Partikelsuspension. Hier musste jedoch beachtet werden, dass die Partikel in einem Puffer (Kaliumphosphatpuffer 100 mM, pH 7,4) suspendiert vorliegen. Daher ist vor der Gefriertrocknung eine Dialyse gegen Aqua dest. essenziell, da die Salze des Puffers sonst das Endergebnis verfälschen würden (Abschnitt 3.6.).

Zur Bestimmung der Proteinmenge wurden ebenfalls nicht beladene Dodecan-Partikel verwendet.

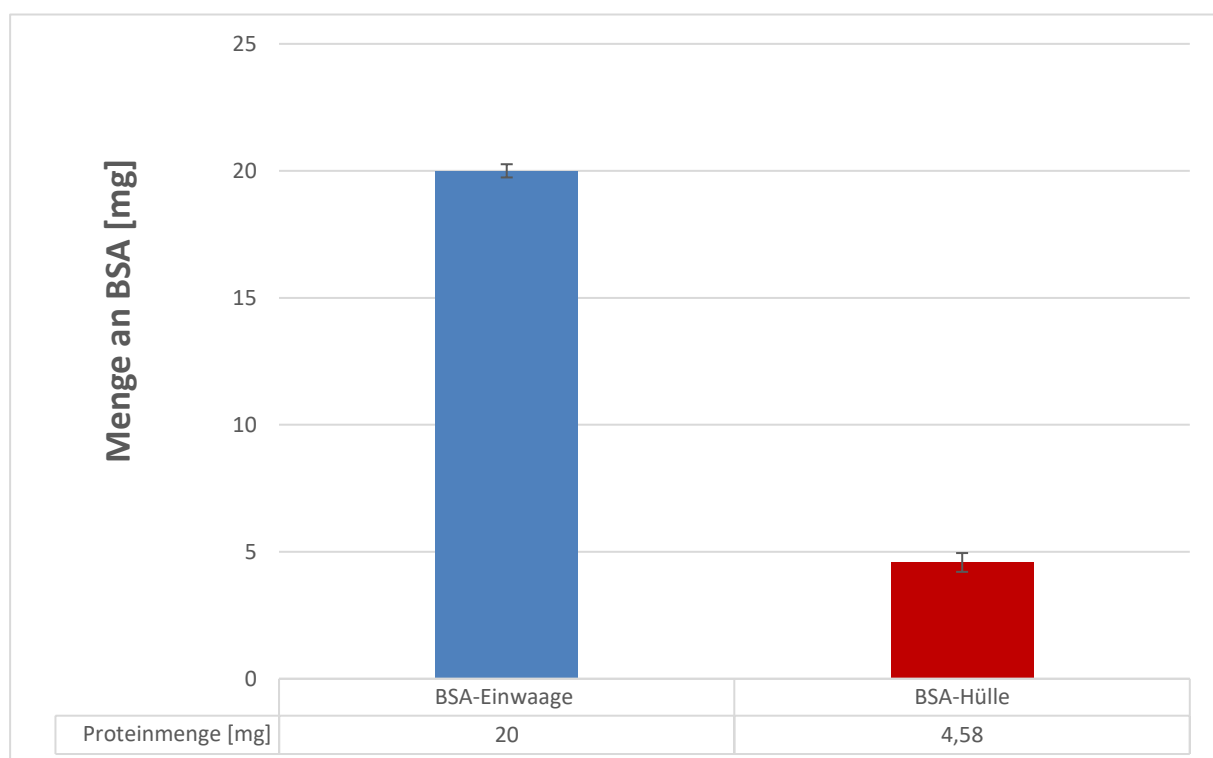


Abbildung 4: Verhältnis der eingesetzten BSA-Menge zum hülle-bildenden Anteil.

Anhand des Balkendiagramms in Abbildung 4 ist zu erkennen, dass bei einer Ausgangsmenge von $20 \pm 0,26$ mg BSA (Einwaage) während der Partikelherstellung $4,58 \pm 0,37$ mg zur Bildung der Proteinhülle beitragen. Das entspricht in etwa 23 % der eingesetzten BSA-Menge.

4.1.3. Größenvergleich unterschiedlicher Partikelchargen

Die Produktion der nachfolgend beschriebenen Partikelchargen erfolgte nach dem in Abschnitt 3.5.1. beschriebenen optimierten Herstellungsprotokoll.

Nach erfolgter Quantifizierung der Proteinmenge, die als hüllbildendes Material fungiert wurden die Proteinpartikel zunächst hinsichtlich Größe und Polydispersitätsindex charakterisiert. Der Einsatz unterschiedlicher organischer Lösungsmittel (Hexan und Dodecan) als Kernmaterial und die Partikelmodifikation mit ORO und WGA können zu Veränderungen dieser Parameter führen. Daher ist es wichtig, Vergleiche zwischen den jeweiligen Partikelchargen aufzustellen und entsprechende Einflüsse zu eruieren.

Die Größe und der PDI wurden mittels Zetasizer Nano ZS gemessen. Das Messprinzip dieses Gerätes basiert auf der DLS (Dynamische Lichtstreuung) [34]. In Tabelle 1 sind die Ergebnisse der analysierten Partikelchargen zusammengefasst.

Tabelle 1: Vergleich der Größe und Größenverteilung der unterschiedlichen Partikelchargen.

Partikelcharge	Durchschnittsgröße	PDI
BSA + Hexan	2,5 µm – 3,5 µm	1,0
BSA + Dodecan	588,3 ± 56,49 nm	0,07 ± 0,03
BSA + Dodecan + ORO	702,5 ± 64,1 nm,	0,09 ± 0,02
BSA + Dodecan + WGA	663 ± 49,67 nm	0,05 ± 0,03

Da es sich bei den hergestellten Partikeln um Nanopartikel handelt, muss sich die Größe in einem Bereich zwischen 1 nm – 1000 nm befinden. Außerdem sollten sie einen kleinen PDI (< 0,2) aufweisen, um eine möglichst enge Größenverteilung und Homogenität der Partikelsuspension gewährleisten zu können.

Der PDI kann Werte zwischen ,0‘ und ,1‘ einnehmen. Disperse Systeme mit einem PDI zwischen 0,03 – 0,06 werden als monodispers bezeichnet. Bei Werten oberhalb von 0,5 wird von einer Formulierung mit einer großen Varianz der Partikelgrößen gesprochen. [35]

Die Ergebnisse in Tabelle 1 zeigen jedoch, dass Proteinpartikel, bei denen Hexan als organisches Lösungsmittel verwendet wurde, mit 2,5 µm – 3,5 µm signifikant größer sind und der PDI von 1,0 auf eine sehr breite Größenverteilung schließen lässt. Im Rahmen der Diplomarbeit wurde mit verschiedenen Methoden und Techniken versucht, die Hexan-Partikel hinsichtlich ihrer Größe zu klassifizieren und insbesondere den PDI zu minimieren. Dazu wurde mittels Zentrifugieren bei unterschiedlichsten Einstellungen überprüft, ob es möglich ist die Proteinpartikel hinsichtlich der Größe aufzutrennen. Außerdem wurden

Filtrivorgänge mit Celluloseacetat-Filtern (Porengröße $< 1 \mu\text{m}$) durchgeführt. Beide Techniken blieben jedoch erfolglos, da die Hexan-Partikel lediglich für einen Zeitraum von einer halben Stunde stabil waren und anschließend agglomerierten. Dadurch wurden bei der Partikelherstellung mit Hexan maximale Partikelgrößen von $2,5 \mu\text{m} - 3,5 \mu\text{m}$ und ein PDI von 1,0 erzielt. Folglich ist Hexan als lipophiler Kern der Proteinpartikel nicht geeignet.

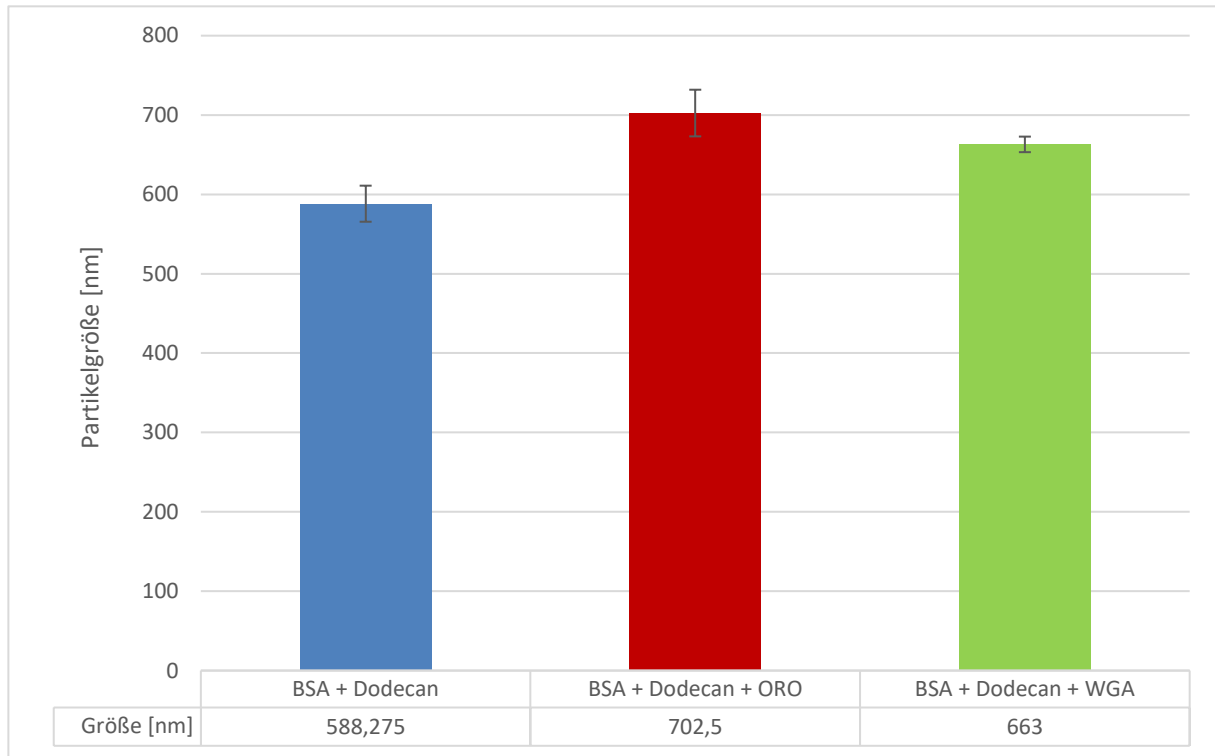


Abbildung 5: Grafischer Vergleich der Dodecan-Partikelchargen.

In Tabelle 1 und Abbildung 5 ist ersichtlich, dass bei den Dodecan-Partikelchargen die Färbung des lipophilen Kerns mit ORO und die Modifikation der Proteinhülle mit WGA, Einflüsse auf die gemessene Partikelgröße haben.

Die Partikel, die lediglich mit Dodecan hergestellt wurden, besitzen mit $588,3 \pm 22,72 \text{ nm}$ den kleinsten Durchmesser. Durch den Einsatz von WGA entstehen Nanopartikel mit $663 \pm 9,79 \text{ nm}$. Bei den mit ORO gefärbten Proteinpartikeln beträgt die Größe $702,5 \pm 29,39 \text{ nm}$, die auch die größten Partikel sind.

Der PDI ist bei allen Dodecan-Chargen sehr ähnlich und bewegt sich in einem Bereich von $0,05 - 0,09$, was einer monodispersen Partikelgrößenverteilung entspricht. Wie in Tabelle 1 zu sehen ist, hat der Einsatz von ORO oder WGA lediglich minimale Auswirkungen auf die Größenverteilung.

Anhand der Ergebnisse ist festzustellen, dass Proteinpartikel mit Dodecan als Kernmaterial eine Partikelgröße im Nanometerbereich aufweisen und hinsichtlich der Größenverteilung einen signifikant besseren PDI als Hexan-Partikel besitzen.

4.1.4. Elektronenmikroskopische Evaluierung der Proteinkapseln (REM)

Nach den Größenmessungen sollte noch verifiziert werden, ob tatsächlich sphärische Nanokapseln vorliegen. Hierfür wurde das Elektronenmikroskop der Firma Hitachi High-Tech Co. (Tokio, Japan) verwendet und die morphologischen Merkmale der Partikel analysiert.

Bei elektronenmikroskopischer Betrachtung der Partikelsuspensionen ist eine sphärische Form der Nanopartikel zu erkennen (Abbildung 6). Die Färbung des lipophilen Kerns mit ORO und die Modifikation der Proteinhülle mit WGA hatten keine Auswirkungen auf die Morphologie der Proteinpartikel.

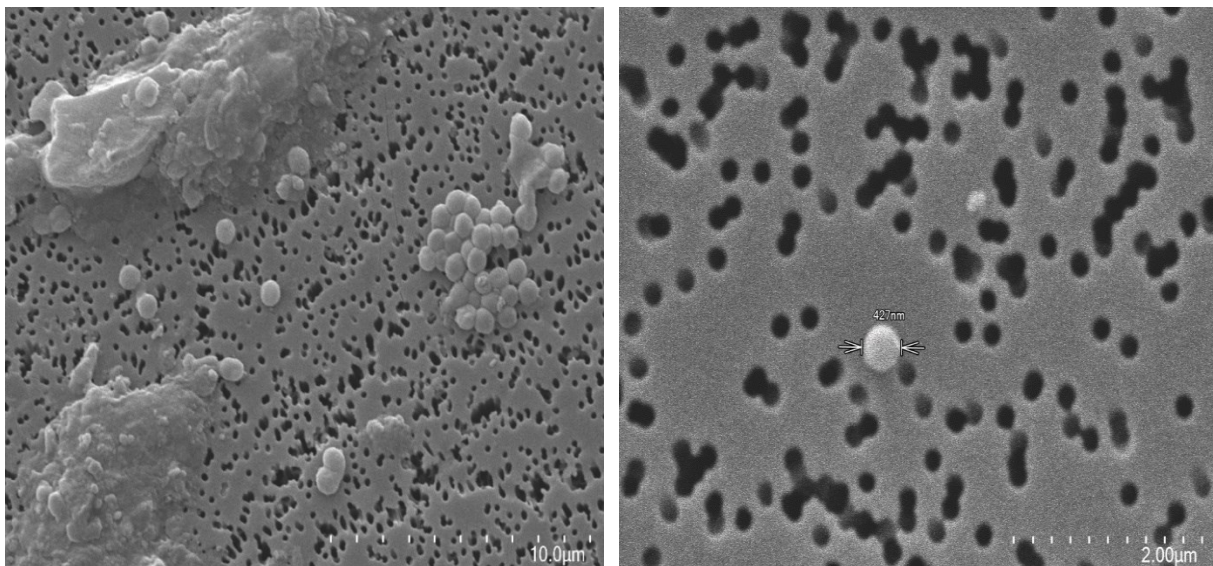


Abbildung 6: Elektronenmikroskopische Aufnahme der Dodecan-Proteinpartikel.

In Abbildung 6 (rechts) ist ersichtlich, dass die Partikel kleiner sind (427 nm) als die Messergebnisse des Zetasizers vermuten lassen (Tabelle 1). Der Grund hierfür könnte die spezielle Probenaufbereitung sein (Abschnitt 3.9.).

Außerdem sind abstrakte Formen und Anhäufungen der Nanopartikel zu erkennen (Abbildung 6, links). Diese lassen sich vermutlich ebenfalls durch die Aufbereitung der Partikelsuspensionen erklären (Abschnitt 3.9.). Hierbei könnte es zur Verschmelzung oder Denaturierung der Proteinpartikel kommen.

4.2. Stabilitätsmessungen

Bei der Herstellung einer potentiell neuen Arzneiformulierung ist deren Stabilität wichtig, um eine Anwendung auch einen gewissen Zeitraum nach der Produktion gewährleisten zu können. Deshalb wurden die Nanopartikel unter bestimmten Lagerungsbedingungen aufbewahrt und hinsichtlich der Qualitätsmerkmale Größe und PDI analysiert. Die Partikelstabilität ist abhängig von den Änderungen der chemischen und physikalischen Eigenschaften der Partikel [36]. Zur Erfassung der Stabilitätsverhältnisse wurden Messungen des Zetapotentials durchgeführt, bei denen die Suspension unter kontrollierten Temperaturbedingungen gelagert und in definierten Zeitintervallen hinsichtlich qualitätsrelevanter Parameter (Größe und Größenverteilung) untersucht wurde.

Die Messungen erfolgten erneut mittels Zetasizer Nano ZS.

4.2.1. Zetapotentialmessungen und Lagerstabilität

Das Zetapotential beschreibt die Oberflächenladung der dispergierten Proteinpartikel und ist ein Indikator für die elektrostatische Abstoßung zwischen diesen. Dieser Parameter ermöglicht es, Prognosen hinsichtlich der Stabilität der Partikelsuspensionen zu treffen. Laut Literatur ist ein Minimumwert von ± 30 mV für eine elektrostatische Stabilität notwendig. Bei niedrigeren Potentialen von 0 mV – ± 10 mV neigen die Partikel vermehrt zur Agglomeration. [37] Die gemessenen Zetapotentiale sind in Tabelle 2 aufgelistet.

Tabelle 2: Vergleich der Zetapotentiale der unterschiedlichen Partikelchargen.

Partikelcharge	Zetapotential
BSA + Hexan	$-8,2 \pm 0,6$ mV
BSA + Dodecan	$-15,4 \pm 1,2$ mV
BSA + Dodecan + ORO	$-15,7 \pm 0,9$ mV
BSA + Dodecan + WGA	$-14,9 \pm 1,4$ mV

Das gemessene Zetapotential der Hexan-Partikel befindet sich mit $-8,2 \pm 0,6$ mV weit unter der geforderten Grenze von ± 30 mV. Wie in Tabelle 1 zu sehen ist, neigen die Proteinpartikel mit Hexan als Kernmaterial zur Agglomeration, da die Suspensionen nach erfolgter Zentrifugation und Filtration lediglich für eine halbe Stunde stabil sind (Abschnitt 4.1.3.).

Die Zetapotentiale der Dodecan-Partikelchargen unterscheiden sich nur geringfügig und bewegen sich in einem Bereich von $-14,9$ mV – $-15,7$ mV. Alle gemessenen Chargen besitzen wesentlich bessere Potentiale als die Hexan-Partikel, befinden sich jedoch noch immer unter der Grenze von ± 30 mV. Diese Erkenntnis legt – wie auch bei den Hexan-

Chargen – die Vermutung nahe, dass die Dodecan-Partikel ebenfalls keine ausreichende Stabilität besitzen und leicht zur Agglomeration neigen. Daher wurde in weiterer Folge mittels Stabilitätstests überprüft, über welchen Zeitraum diese Partikelsuspensionen hinsichtlich der chemisch-physikalischen Parameter im Vergleich zu den Hexan-Partikeln stabil bleiben.

Zur Überprüfung der Lagerstabilität der Dodecan-Partikelchargen wurden über einen Zeitraum von 10 Tagen die Größe und der PDI der jeweiligen Partikelsuspensionen bestimmt. Dabei wurde zusätzlich durch die Lagerung bei Raumtemperatur (Abbildung 7) und im Kühlschrank bei 4 °C (Abbildung 8) auch die Einflüsse der Temperatur auf die Partikeleigenschaften analysiert.

Zur Stabilitätsbestimmung wurden unbehandelte und ORO beladene Dodecan-Partikel verwendet.

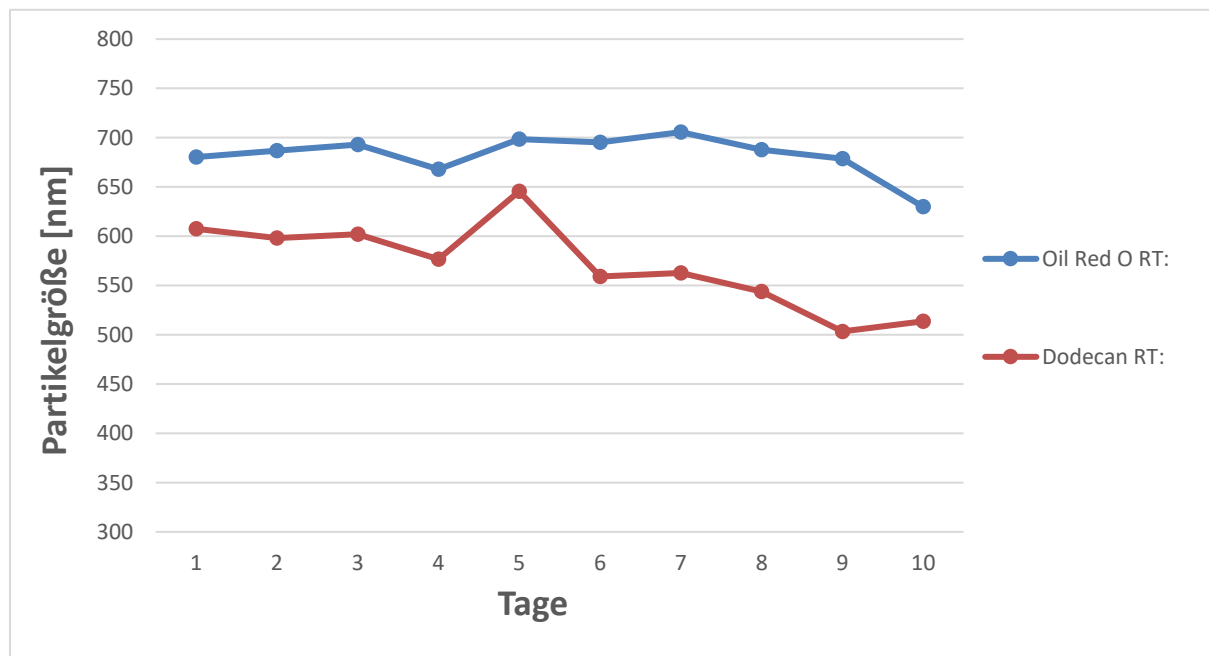


Abbildung 7: Änderungen der Partikelgröße über einen Zeitraum von 14 Tagen bei Raumtemperatur.

Wie in Abbildung 7 dargestellt, verändert sich die Partikelgröße über einen Lagerungszeitraum von 10 Tagen bei Raumtemperatur kaum. Es kommt bei beiden Partikelchargen lediglich zu einer Größenreduktion von ungefähr 100 nm, die jedoch tolerierbar ist.

Der PDI wurde als Durchschnitt aller Messungen ermittelt und beträgt bei den ORO-Partikeln, wie auch bei den nicht gefärbten Dodecan-Partikelchargen 0,1. Die Suspensionen besitzen daher noch immer eine enge Partikelgrößenverteilung.

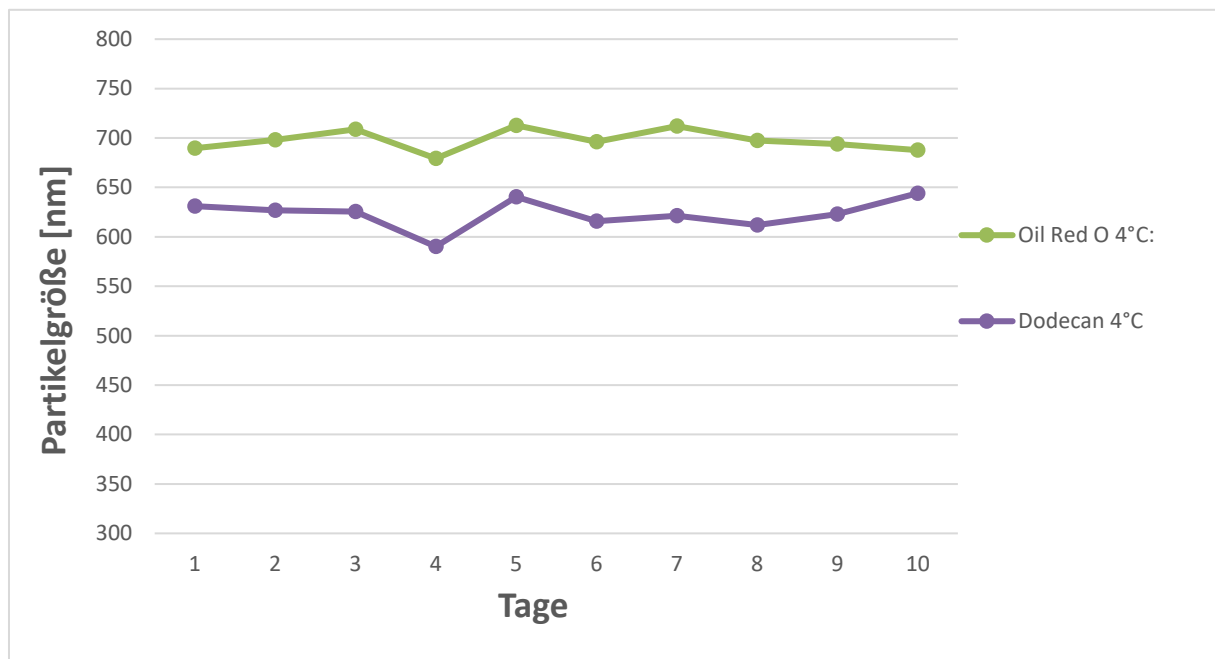


Abbildung 8: Änderungen der Partikelgröße über einen Zeitraum von 14 Tagen im Kühlschrank bei 4 °C.

Bei Lagerungstemperaturen von 4 °C (Abbildung 8) bleiben die Partikel ebenfalls über einen Zeitraum von 10 Tagen stabil.

Der durchschnittliche PDI beträgt bei den ORO-Partikeln, wie auch bei den unbehandelten Dodecan-Partikeln, 0,07, was einer engen Verteilung entspricht. Folglich gibt es bei diesen Lagerungsbedingungen keine signifikanten Änderungen hinsichtlich Partikelgröße und Größenverteilung.

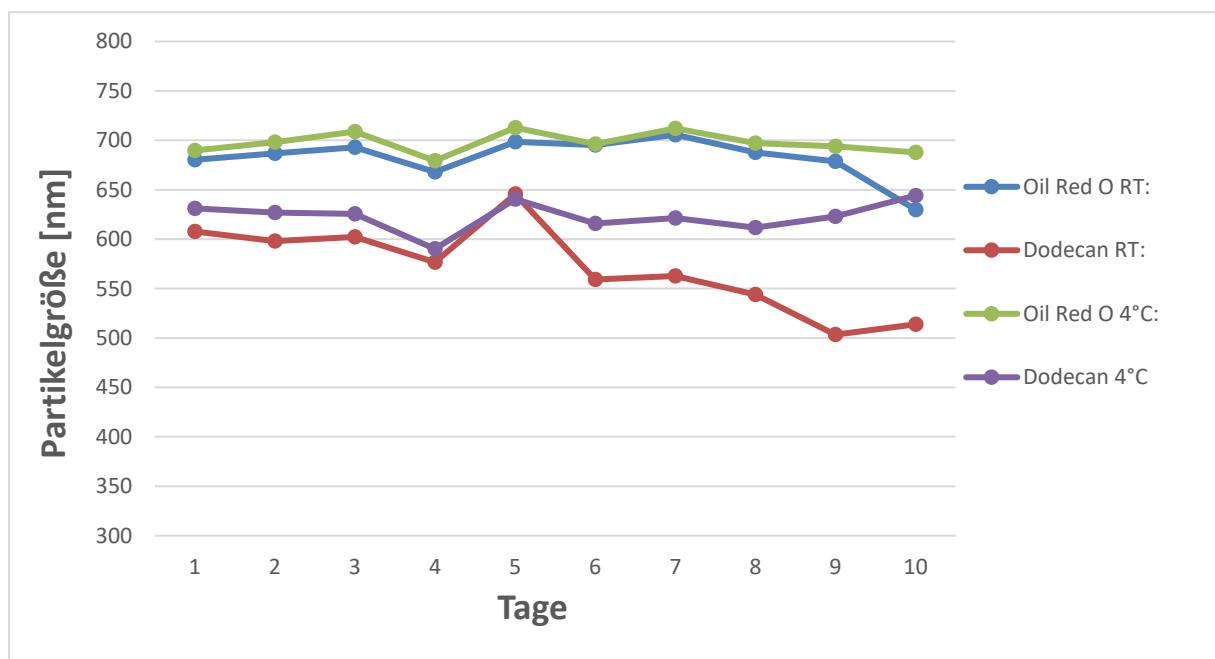


Abbildung 9: Vergleich der Stabilitätsmessungen bei Raumtemperatur und 4 °C.

Prinzipiell ist festzustellen, dass die Partikelsuspensionen sowohl bei Raumtemperatur als auch im Kühlschrank bei 4 °C über eine Zeitspanne von 10 Tagen stabil bleiben.

Abbildung 9 illustriert jedoch, dass die Lagerung der Proteinpartikel im Kühlschrank besser ist, da die Partikelgrößen nahezu konstant bleiben. Bei Raumtemperatur kommt es zu stärkeren Schwankungen hinsichtlich des Partikeldurchmessers; dies könnte mit der höheren Temperatur im Zusammenhang stehen könnte.

Basierend auf den Messergebnissen der Lagerstabilitätstests besitzen die Dodecan-Partikelchargen trotz der niedrigen Zetapotentiale (Tabelle 2) eine ausreichende Stabilität und neigen nicht, wie zunächst angenommen, zur Agglomeration.

4.2.2. Stabilität der Partikelsuspension über Stunden

Im Rahmen der Diplomarbeit wurde außerdem eruiert, über welchen Zeitraum die Proteinpartikel im Kaliumphosphatpuffer (100 mM, pH 7,4) homogen verteilt sind, ohne die Suspension erneut aufschütteln zu müssen. Als lipophiler Kern der Proteinpartikel fungiert Dodecan. Dieses organische Lösungsmittel besitzt eine Dichte von 0,753 g/cm³ [38]. Aufgrund der niedrigen Dichte steigen die Partikel auf und befinden sich folglich nach einer gewissen Zeitspanne an der Oberfläche des Puffers. Dadurch entstehen Konzentrationszonen innerhalb der Suspension, die schließlich bei der Entnahme eines aliquoten Teils zu falschen Messergebnissen führen können.

Dieser Stabilitätstest wurde mit nicht modifizierten Dodecan-Partikeln bei Raumtemperatur durchgeführt.

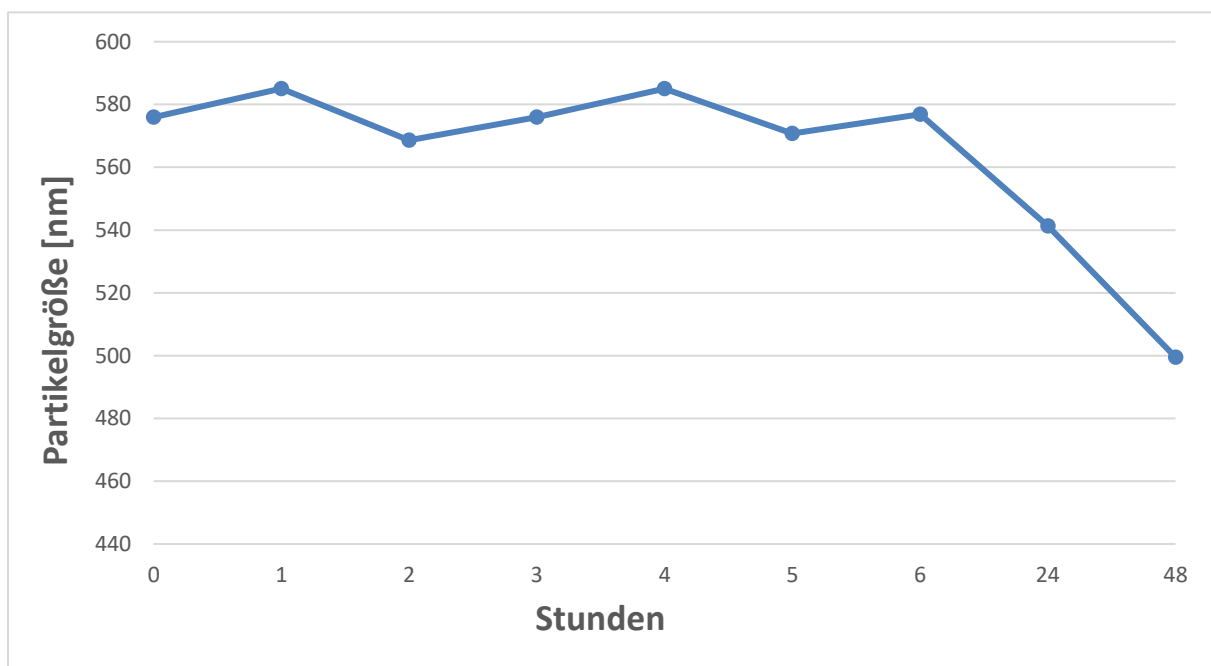


Abbildung 10: Stabilitätsverlauf über Stunden bezüglich der homogenen Verteilung der Partikel.

Die Ergebnisse in Abbildung 10 zeigen, dass die Homogenität der Partikelsuspension ohne erneutes Aufschütteln für 6 Stunden gewährleistet ist. Nach dieser Zeitspanne sinkt die Partikelgröße langsam und sukzessive immer weiter, da die großen Partikel schneller aufschwimmen. Falls die Suspension länger als 6 Stunden stehen gelassen wurde, sollte vor weiteren Analysen eine Homogenisierung des Systems mittels Aufschütteln erfolgen.

4.2.3. Frier-Tau-Methode

Die Stabilität der hergestellten Proteinpartikel soll auch über einen längeren Zeitraum als 10 Tage gewährleistet werden. Eine Methode, die sich hierfür eignet, ist das Einfrieren der Partikel. Im gefrorenen Zustand können Zubereitungen über Monate gelagert werden. [39] Daher wurde im Zuge der Diplomarbeit das Frier-Tau-Experiment durchgeführt. Dieses Experiment beschreibt einen Prozess, bei dem die Partikelsuspensionen zunächst eingefroren und nach einigen Tagen wieder aufgetaut werden. Durch die Frier-Tau-Methode kann schließlich überprüft werden, ob sich die Nanopartikel hinsichtlich der physikalischen Eigenschaften während des Gefriervorganges verändern.

Der Gefrierpunkt von Dodecan befindet sich bei ungefähr $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ [38]. Das Experiment wurde daher bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ in einem Gefrierschrank abgewickelt.

Tabelle 3: Größenveränderungen beim Frier-Tau-Experiment.

Partikelchargen	Vor dem Einfrieren	Nach dem Auftauen
BSA + Dodecan	$631,2 \pm 12,3\text{ nm}$	$715,3 \pm 24,6\text{ nm}$
BSA + Dodecan + ORO	$757 \pm 36,3\text{ nm}$	$903,2 \pm 45,3\text{ nm}$

Die Partikeldurchmesser der beiden Chargen sind nach dem Auftauprozess im Vergleich zur Ausgangsgröße um etwa $100\text{ nm} - 150\text{ nm}$ größer (Tabelle 3). Das lässt darauf schließen, dass die Proteinpartikel während des Gefriervorganges vermutlich leicht agglomerieren.

Tabelle 4: Änderungen des Polydispersitätsindex (PDI) beim Frier-Tau-Experiment.

Partikelchargen	Vor dem Einfrieren	Nach dem Auftauen
BSA + Dodecan	$0,05 \pm 0,02$	$0,189 \pm 0,13$
BSA + Dodecan + ORO	$0,07 \pm 0,04$	$0,197 \pm 0,17$

Wie in Tabelle 4 ersichtlich ist, kommt es nach dem Frier-Tau-Experiment auch zu einer leichten Veränderung hinsichtlich der Größenverteilung. Der PDI beider Partikelchargen befinden sich jedoch noch unter der Grenze von 0,2, was weiterhin einer engen Verteilung entspricht. Somit können diese Abweichungen noch toleriert werden.

Auf Basis dieser Erkenntnisse können die Proteinpartikel ohne signifikante Änderungen der physikalischen Parameter bei -20 °C länger als 10 Tage gelagert werden.

4.3. Bindungsstudien an 5637-Zellen

Durch die Modifikation der Partikelhülle mit WGA sollten Partikel hergestellt werden, die einen Targeting-Effekt besitzen. Aufgrund der spezifischen Wechselwirkungen des Lektins mit den Zuckerkomponenten der Zelloberfläche müssten WGA -modifizierte Partikelchargen eine höhere Affinität zu den Zellen aufweisen. Um diese Hypothese zu bestätigen, wurden Bindungsstudien an Zellmonolayer und Einzelzellen durchgeführt.

Für die Zellversuche wurden WGA funktionalisierte fBSA- (Abbildung 12) und ORO-Partikel (Abbildung 11) verwendet. fBSA ist fluoreszierendes bovines Serumalbumin und ermöglicht die fluorometrische Bestimmung der Bindungsstärke. ORO ist wiederum ein lipophiler Farbstoff, der zur Färbung des Partikelkerns verwendet wird. Mit Hilfe des spezifischen Absorptionsmaximums von ORO kann ebenfalls die Bindungsaffinität der Partikel gemessen werden. Die direkte Färbung des lipophilen Kernes bietet zusätzlich die Möglichkeit, tatsächlich nur Proteinpartikel zu detektieren. Bei fBSA-Nanopartikeln wird jedoch die Fluoreszenz der Proteinhülle gemessen, wobei hier das Risiko besteht, nicht partikelbildendes fBSA zu ermitteln, das möglicherweise im Zuge der Aufreinigung nicht vollständig entfernt wurde. Dieser Umstand kann wiederum zu einer Verfälschung der Messergebnisse führen.

Außerdem wurden bei diesen Studien nicht modifizierte Proteinpartikel eingesetzt, um entsprechende Vergleiche zwischen den unterschiedlichen Partikelchargen zu erhalten.

4.3.1. Monolayerversuche

Zunächst wurden Bindungsstudien an Zellmonolayer durchgeführt (Abschnitt 3.10.1), um die höhere Affinität zu Tumorzellen durch den Einbau von WGA zu veranschaulichen. Hierbei muss beachtet werden, dass die Fluoreszenzintensitäten (fBSA) und Absorptionswerte (ORO) der eingesetzten Partikelsuspensionen ungefähr gleich sind, um Verfälschungen der Ergebnisse zu vermeiden. Die Monolayer wurden für unterschiedliche Zeiträume (30 und 60 Minuten) in einem Brutschrank inkubiert. Hierbei wurde der Einfluss der Inkubationszeiten untersucht, da angenommen wurde, dass bei einer längeren Inkubation auch mehr Bindungen ausgebildet werden und somit ein Anstieg der Affinität zu verzeichnen sein müsste.

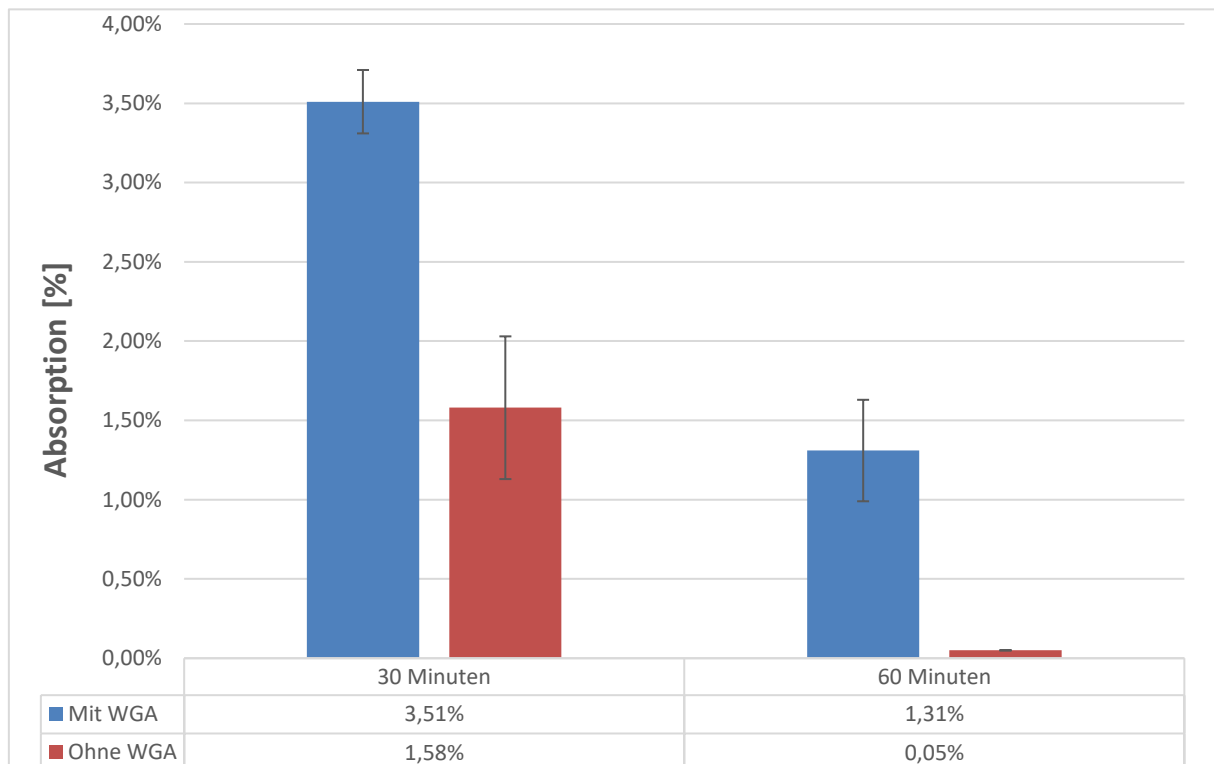


Abbildung 11: Versuch am Zellmonolayer mit ORO-Partikelchargen bei 30 und 60 Minuten.

Die Messergebnisse des Monolayerversuches mit den ORO-Partikelchargen zeigen, dass der Einbau von WGA in die Partikelhülle deutliche Auswirkungen auf die Affinität der Proteinpartikel zu urothelialen Karzinomzellen hat (Abbildung 11). Nach 30 Minuten wurde bei den WGA/ORO-Partikeln eine Absorption von $3,51 \pm 0,2$ % und bei der unbehandelten Partikelcharge von $1,58 \pm 0,45$ % gemessen. Dadurch ist erkennbar, dass die Partikel durch den Lektineinbau in die Proteinhülle ungefähr 2,2-fach stärker an die Zellstrukturen binden. Bei einer Inkubationszeit von 60 Minuten wurde bei den WGA modifizierten ORO-Partikeln $1,31 \pm 0,32$ % und bei den Blank-Partikeln kaum eine Absorption detektiert. Diese Ergebnisse vermitteln ebenfalls den Eindruck, dass die WGA-Modifikation eine höhere Affinität der Partikel zu den Karzinomzellen nach sich zieht. Paradoxe Weise wurde jedoch nach 60 Minuten eine niedrigere Absorption gemessen als nach 30 Minuten, was der Annahme, dass es bei längerer Inkubation zu einem Anstieg der Bindungsaffinität kommt, widerspricht. Der Grund hierfür ist vermutlich die chemisch-physikalische Beschaffenheit der Partikel, der unten detaillierter beschrieben wird.

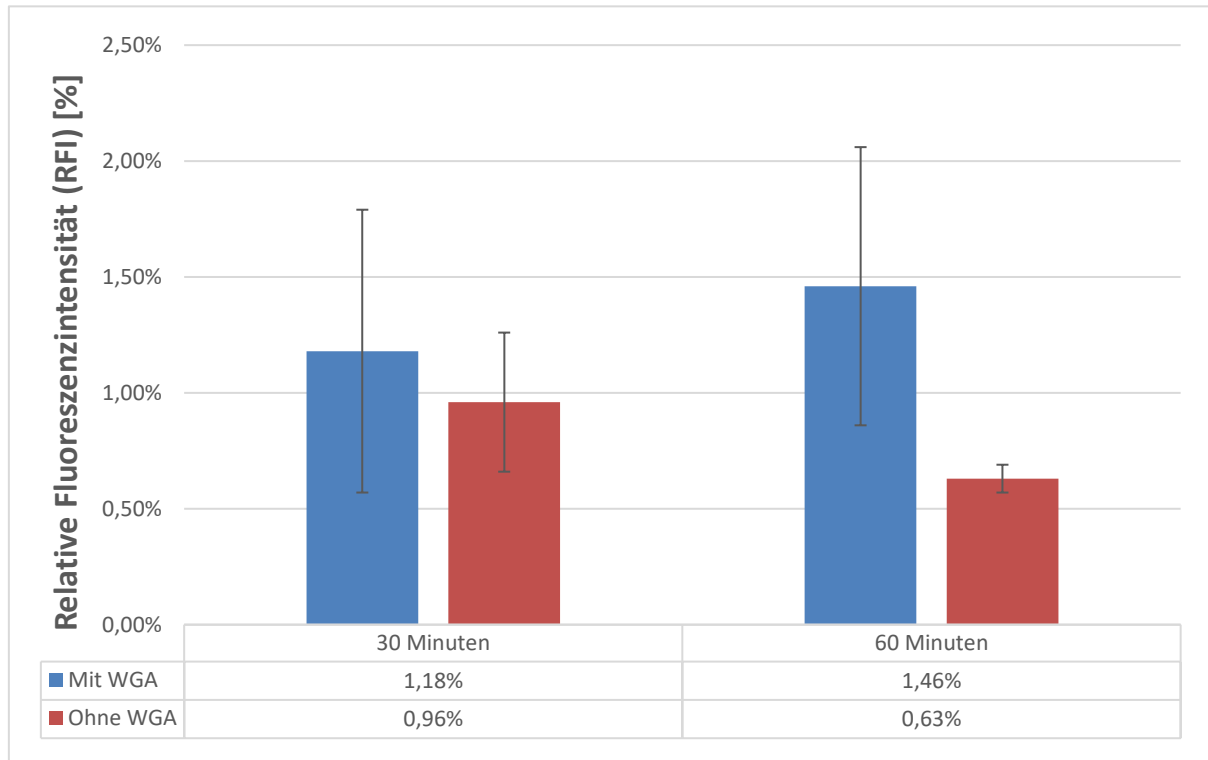


Abbildung 12: Versuch am Zellmonolayer mit fBSA-Partikelchargen bei 30 und 60 Minuten.

Wie Abbildung 12 illustriert, liefern die RFI-Werte der fBSA-Partikelchargen ebenfalls positive Ergebnisse hinsichtlich einer höheren Affinität der WGA/fBSA-Partikel. Es ist eine Tendenz zur besseren Bindung durch die WGA-Modifikation ersichtlich, jedoch überlappen sich bei 30-minütiger Inkubationszeit die Standardabweichungen der Messwerte. Nach 30 Minuten wurde bei der WGA/fBSA-Probe eine RFI von $1,18 \pm 0,61\%$ und ohne WGA von $0,96 \pm 0,3\%$ gemessen. Die Intensität nach 60 Minuten Inkubationszeit beträgt bei den WGA/fBSA-Partikeln $1,46 \pm 0,6\%$ und bei den unbehandelten Partikeln $0,63 \pm 0,06\%$, was wiederum einer ungefähr 2,3-fach stärkeren Bindung der WGA-Partikelchargen entspricht.

Durch die Monolayerversuche mit ORO- und fBSA-Partikeln wird verdeutlicht, dass der Einbau des Lektins in die Proteinhülle durchaus einen Einfluss auf die Bindungsaffinität besitzt. Die WGA-Partikelchargen binden wesentlich besser als das Pendant ohne Lektinmodifikation. Außerdem kommt es aufgrund der unspezifischen Wechselwirkungen zwischen den nicht funktionalisierten Partikeln und den 5637-Zellen mit Zunahme der Inkubationszeit zu einer Reduktion der Fluoreszenzintensität. Bei den WGA-Partikeln ist dies nicht der Fall, da das Lektin mit spezifischen Zuckerkomponenten der Zelloberfläche interagiert. Generell sind die gemessenen Werte der jeweiligen Zellversuche jedoch nicht sehr hoch. Dieses Phänomen lässt sich aber vermutlich mit den chemisch-physikalischen Eigenschaften der hergestellten Partikel erklären. Der Kern dieser Proteinpartikel besteht

aus Dodecan, einem organischen Lösungsmittel, das eine niedrigere Dichte als Wasser besitzt [38]. Dieser Dichteunterschied hat zur Folge, dass die Partikel zum Aufschwimmen neigen und es nur kurzfristig zu einem Kontakt mit dem Zellrasen im Well kommt. In weiterer Folge entstehen nur wenige Bindungen zwischen Proteinpartikeln und Zellen.

4.3.2. Durchflusszytometrische Analyse von Einzelzellen (FACS)

Aufgrund der niedrigen Messwerte bei den zuvor beschriebenen Monolayerversuchen wurden zusätzlich Affinitätsstudien an Einzelzellen durchgeführt (Abschnitt 3.10.2.), um die höhere Affinität auch bei anderen Zellversuchen nachzuweisen. Hierbei wurden die Zellen mittels Durchflusszytometrie analysiert (FACS). Diese Methode ermöglicht eine Analyse der Bindungsaffinität zu den Zellelementen, die unabhängig vom Aufschwimmen der Proteinpartikel ist.

Die Einzelzellversuche wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen der fBSA-Partikelchargen durchgeführt. Hier musste die Fluoreszenzintensität ebenfalls angeglichen werden, um Missinterpretationen der Messergebnisse zu vermeiden. Außerdem wurde eine Probe ohne Nanopartikel untersucht, um einen Blank-Wert zu bestimmen und entsprechende Vergleiche zu erhalten.

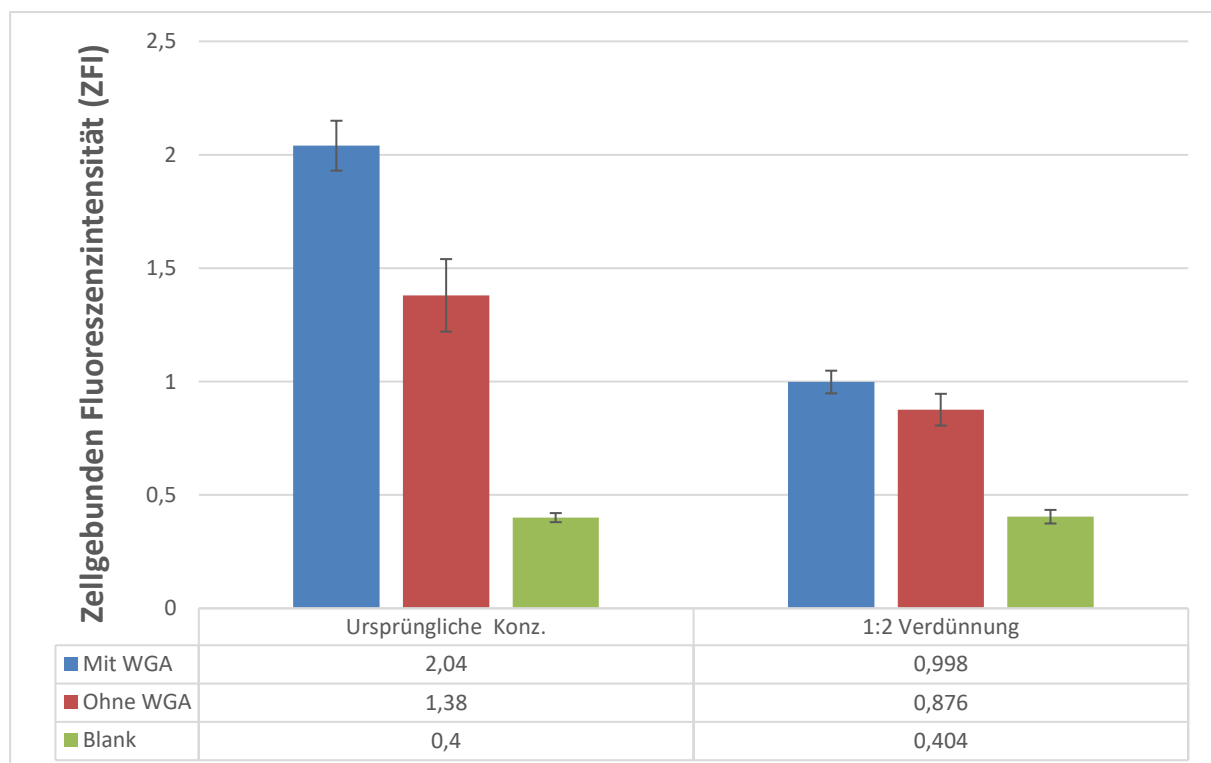


Abbildung 13: Einzelzellversuch mit fBSA-Partikelchargen bei ursprünglicher Konzentration und 1:2 Verdünnung.

Anhand der durchflussszytometrischen Ergebnisse in Abbildung 13 konnte erneut bestätigt werden, dass durch den Einbau von WGA in die Proteinhülle die Affinität zu den Zellen erheblich erhöht wird. Bei der Ausgangskonzentration der WGA/fBSA-Probe betrug der ZFI-Wert $2,04 \pm 0,11$ und sank durch die Verdünnung auf $1 \pm 0,05$. Die ZFI der nicht modifizierten Partikelsuspension lag unverdünnt lediglich bei $1,38 \pm 0,16$ und 1:2 verdünnt bei $0,88 \pm 0,07$. Diese Ergebnisse postulieren, dass aufgrund der Partikelmodifikation mit WGA eine 1,48-fach stärkere Wechselwirkung mit den Zellstrukturen zu erwarten ist – ähnlich zu den Messwerten beim Monolayersversuch mit den ORO-Partikeln (Abbildung 11). Des Weiteren konnte durch spezifische Bindungen an die Zellen via WGA eine konzentrationsabhängige Abnahme des ZFI von 2,04 auf 1,00 gezeigt werden. Dies konnte hingegen bei den unspezifischen Wechselwirkungen der Partikel ohne WGA nicht dargestellt werden.

4.3.3. Mikroskopische Analyse und Kolokalisationsstudien

Um die oben gezeigten Ergebnisse auch visuell darzustellen, wurden Kolokalisationsstudien mit WGA/fBSA und BSA Partikel an der 5637-Zelllinie durchgeführt (Abschnitt 3.10.3.). Zur Unterscheidung und Sichtbarkeit wurden der Zellkern blau (HOECHST) und die Zellmembran rot (α-WGA) gefärbt.

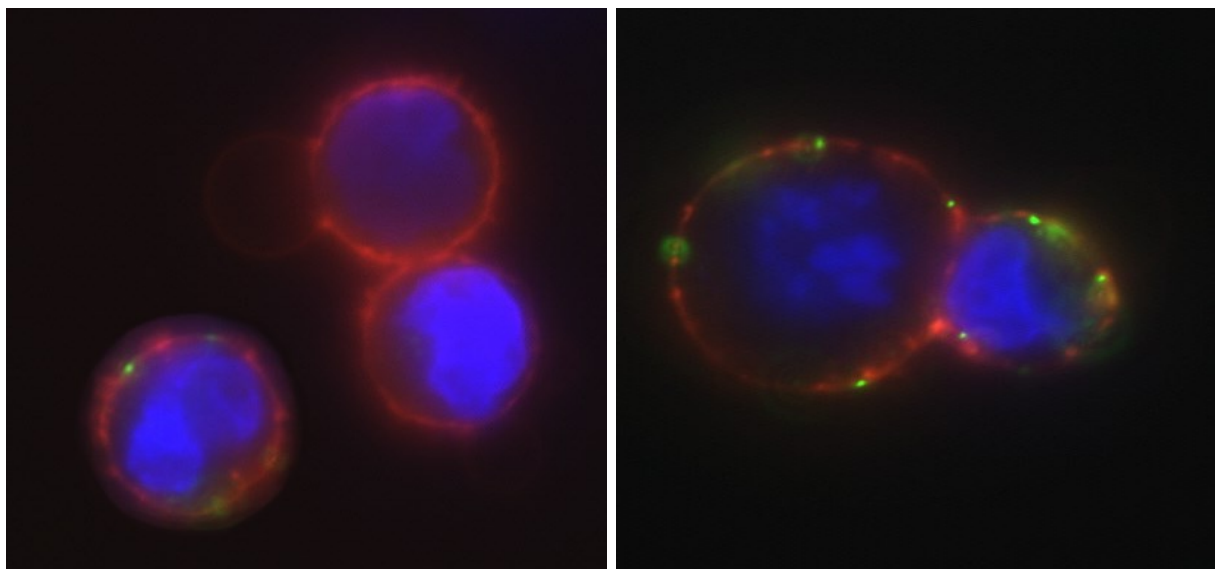


Abbildung 14: Aufnahmen mittels Fluoreszenzmikroskop von fBSA-Partikeln ohne WGA (links) und mit WGA (rechts) bei 4 °C.

Durch die Inkubation der Zellen mit den jeweiligen Partikelchargen bei 4 °C kommt es lediglich zur Anlagerung der grün gefärbten Partikel an der Zellmembran (rot), da bei dieser Temperatur aktive Transportprozesse in die Zelle minimiert werden.

Wie in Abbildung 14 (links) ersichtlich ist, binden Partikel ohne WGA nur sehr schwach an die Zelloberfläche. Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen (Abbildung 14, rechts) der WGA/fBSA-Partikel belegen hingegen, dass die Adhäsion der Proteinpartikel an der Zelloberfläche signifikant stärker ist. Dies bestätigt die Ergebnisse der Zellversuche und die Annahme, dass durch die WGA-Modifikation der Proteinhülle die Affinität der Partikel zu urothelialen Karzinomzellen zunimmt.

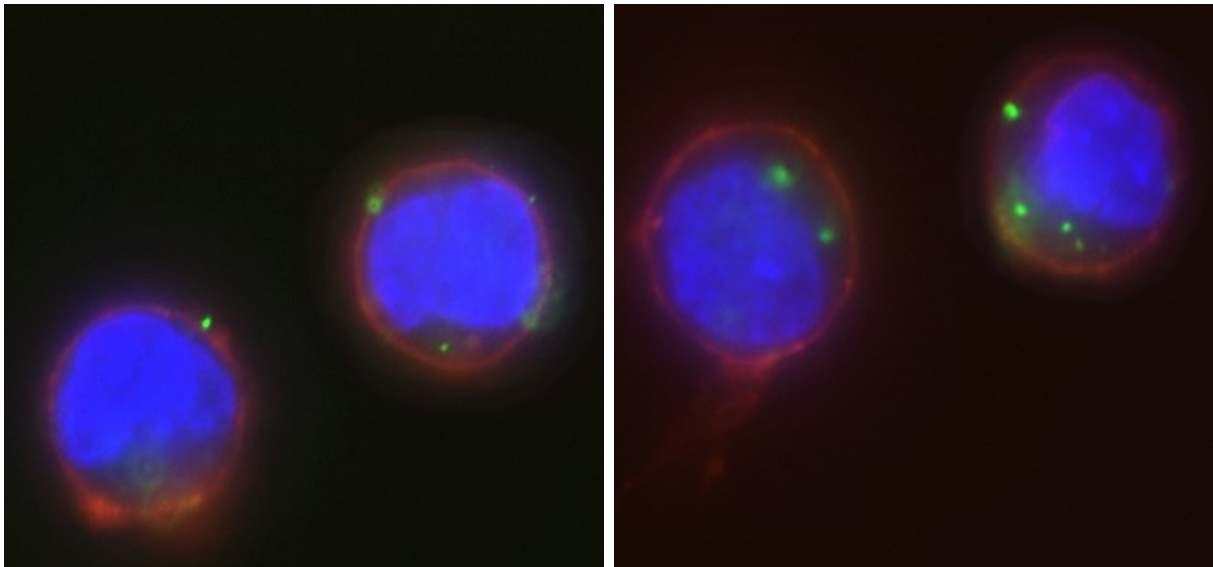


Abbildung 15: Aufnahmen mittels Fluoreszenzmikroskop von fBSA-Partikeln ohne WGA (links) und mit WGA (rechts) bei 37 °C.

Um eine Internalisation der Proteinpartikel in das Zellinnere zu gewährleisten, wurden die Zellen mit den jeweiligen Partikelsuspensionen in einem Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Dadurch ist der Stoffwechsel der Zelle aktiv und über die Transportprozesse sollte schließlich die Aufnahme der Nanopartikel erfolgen. Wie in Abbildung 15 (links) zu sehen ist, wurden Partikel ohne WGA lediglich vereinzelt von der Zelle aufgenommen. Die Fluoreszenzaufnahmen der WGA/fBSA-Partikelchargen (Abbildung 15, rechts) zeigten ebenfalls, dass die an die Membran anhaftenden Partikel in das Zellinnere aufgenommen werden.

Basierend auf den Ergebnissen der Fluoreszenzmikroskopie lässt sich feststellen, dass sowohl WGA/fBSA-, als auch unbehandelte fBSA-Partikel an den 5637-Zellen binden und bei 37 °C internalisiert werden. Es gibt jedoch einen signifikanten Unterschied in der Menge an Partikel, die mit den Zellen interagieren. Bei nicht modifizierten Partikelchargen binden nur vereinzelte Proteinpartikel unspezifisch an die Zelloberfläche und werden in weiterer Folge aufgenommen. Die Implementierung von WGA in die Partikelhülle ermöglicht eine spezifische Bindung an Zuckerkomponenten auf der Zelloberfläche und somit eine höhere

Affinität zu Karzinomzellen. Die Aufnahmen veranschaulichen deutlich, dass durch den Lektineinbau in die Partikelhülle die Adhäsion und die Aufnahme der Partikel beträchtlich gesteigert werden kann.

5. Zusammenfassung

In der Pharmazeutischen Technologie lag in den letzten Jahren vermehrt ein Fokus auf dem Einsatz von Proteinpartikeln als Transporter diverser Arzneistoffe. Proteine eignen sich sehr gut als Hüllmaterial, da sie biologisch abbaubar sind und keine toxischen Reaktionen im Organismus induzieren. Im Zuge der Diplomarbeit erfolgte zunächst eine Optimierung eines bereits etablierten Herstellungsverfahrens für Proteinkapseln hinsichtlich der Aufreinigung und Partikelausbeute. Mit Hilfe der optimierten Methode konnten aus bovinem Serumalbumin als Hüllmaterial und Dodecan als lipophilem Kern Partikel im Nanometerbereich produziert werden. Die hergestellten Proteinpartikel wurden hinsichtlich Größe, Polydispersitätsindex und Zetapotential charakterisiert. Durch die Partikelcharakterisierung wurde festgestellt, dass die Verwendung unterschiedlicher organischer Lösungsmittel (Bsp. Hexan) als Kernmaterial Einfluss auf die chemisch-physikalischen Parameter und in weiterer Folge Auswirkungen auf die Stabilität dieser Partikel hatte.

Zusätzlich konnten die Nanopartikel im Zuge der Diplomarbeit mit Weizenkeimlektin erfolgreich funktionalisiert werden. WGA interagiert mit N-acetyl-D-Glucosamin- und Sialinsäureresten, die vor allem an der Glykokalyx von Karzinomzellen vermehrt exprimiert vorliegen. Diese Modifikation sollte daher eine verstärkte Bindung der Proteinpartikel an Tumorzellen ermöglichen. Um diese spezifische Bindung zu analysieren, wurden Einzelzell- und Monolayersversuche an 5637-Zellen durchgeführt. Die erhöhte Affinität zu kanzerogenen Zellen konnte sowohl fluorimetrisch (fBSA) mit Hilfe der Durchflusszytometrie als auch über Absorptionsmessungen (Oil Red O) mittels TECAN bestätigt werden. Zur visuellen Darstellung wurden fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der behandelten 5637-Zellen gemacht und WGA modifizierte sowie unbehandelte Proteinpartikel miteinander verglichen. Abschließend wurde das Verhalten der Partikel an Zellen bei physiologischen Bedingungen untersucht. Hierbei konnte beobachtet werden, dass die Nanokapseln bei 37 °C in das Zellinnere aufgenommen werden. Dabei war das Ausmaß der Internalisation der Proteinpartikel nach Modifikation mit WGA deutlich erhöht, wodurch ein „aktives drug targeting“ dieser Arzneiform möglich wäre. In der vorliegenden Arbeit konnte somit ein Grundstein für eine neuartige Arzneiformulierung zur Anwendung in der instillativen Therapie bei Blasenkarzinomen gelegt werden.

6. Abstract

In recent years, the focus of the pharmaceutical- technological science has increased to the use of proteinaceous particles as a transporter for various active substances. Proteins perfectly fit as shell material. They are biodegradable and not causing any toxic reactions. In this diploma thesis an established manufacturing process of proteinaceous particles was optimized regarding to purification and particle yielding. After the optimization process it was possible to produce nanoparticles with bovine serum albumin as shell material and dodecane as lipophilic core. The particles were also defined in terms of size, size distribution and zetapotential. The determination reveals that the use of different organic solvents (e.g. hexane) as core material do have an impact on the chemical-physical parameters and subsequently on stability of proteinaceous particles. In addition, the nanoparticles could successfully be functionalized with wheat germ agglutinin (WGA). WGA interacts with N-acetyl-D-glucosamin- and sialin-acid-terminated glycoproteins, which are found on the membrane of urinary bladder cancer cells. This kind of modification enables an improved binding of the proteinaceous particles to cancer cells. To analyse the specific interactions, single cell and monolayer experiments were carried out on 5637-cells. The increased affinity to the cancer cells has been shown by fluorescence measurements (fBSA) and by absorption measurements (Oil Red O). A fluorescence microscope was used to visualize the increased binding affinity of the functionalized particles. Finally, the behavior of the particles on cells under physiological conditions were analyzed. The bound nanoparticles are further internalized into the cell at 37 °C. By incorporating WGA in the particle matrix the internalization rate of the proteinaceous particles could be increased significantly. Based on these results a new drug delivery vehicle with targeting properties to cancer cells could be developed and it can constitute a novel dosage form for the treatment of urinary bladder cancer.

7. Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Beschreibung
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
aWGA	Alexa-Weizenkeimlektin
BCA	Bicinchonin acid
BSA	Bovines Serumalbumin
cm ²	Quadratzenimeter
DLS	Dynamische Lichtstreuung
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FACS	Fluorescence-activated cell scanning
FCS	Fetales Kälberserum
fWGA	Fluorescein-Weizenkeimlektin
g	Gramm
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HSA	Humanes Serumalbumin
L	Liter
M	Molar
ml	Milliliter
mM	Millimolar
nm	Nanometer
ORO	Oil Red O
PBS	Phosphate-buffered saline
PDI	Polydispersitätsindex
PLGA	Polylactid-co-Glycolid
REM	Rasterelektronenmikroskopie
RFI	Relative Fluoreszenzintensität
RPM	Rounds per minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
WGA	Weizenkeimlektin
µm	Mikrometer
ZFI	Zellgebundenen Fluoreszenzintensität

8. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Kalibrationsgerade von BSA in Kaliumphosphatpuffer (100 mM, pH 7,4).	19
Abbildung 2: Strukturformel von „Oil Red O“	24
Abbildung 3: Vergleich der Proteinkonzentrationen nach den jeweiligen Waschschritten.	26
Abbildung 4: Verhältnis der eingesetzten BSA-Menge zum hülle-bildenden Anteil.....	27
Abbildung 5: Grafischer Vergleich der Dodecan-Partikelchargen.	29
Abbildung 6: Elektronenmikroskopische Aufnahme der Dodecan-Proteinpartikel.	30
Abbildung 7: Änderungen der Partikelgröße bei Raumtemperatur.....	32
Abbildung 8: Änderungen der Partikelgröße im Kühlschrank bei 4 °C.....	33
Abbildung 9: Vergleich der Stabilitätsmessungen bei Raumtemperatur und 4 °C.	33
Abbildung 10: Stabilitätsverlauf bezüglich der homogenen Verteilung der Partikel.	34
Abbildung 11: Bindungsstudie an Zell-Monolayern mit ORO-Partikelchargen.	36
Abbildung 12: Bindungsstudie an Zell-Monolayern mit fBSA-Partikelchargen.	36
Abbildung 13: Einzelzellversuch mit fBSA-Partikelchargen.	36
Abbildung 14: Aufnahmen mittels Fluoreszenzmikroskop bei 4 °C.	36
Abbildung 15: Aufnahmen mittels Fluoreszenzmikroskop bei 37 °C.	36

9. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Vergleich von Größe und Größenverteilung der Partikelchargen	28
Tabelle 2: Vergleich der Zetapotentiale unterschiedlicher Partikelchargen.	31
Tabelle 3: Größenveränderungen beim Frier-Tau-Experiment.....	35
Tabelle 4: Änderungen des Polydispersitätsindex beim Frier-Tau-Experiment.	35

10. Literaturverzeichnis

- [1] **Fahr A.**; Voigt Pharmazeutische Technologie für Studium und Beruf 12. Auflage 2015, Deutscher Apotheker Verlag, 70191 Stuttgart, Deutschland; Kapitel 1 – Die Arzneiform als Applikationssystem, S. 3 – 4
- [2] **Bauer K., Frömming K., Führer C.**; Pharmazeutische Technologie – Mit Einführung in Biopharmazie und Biotechnologie 10. Auflage 2017, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, 70191 Stuttgart, Deutschland; Kapitel 15 – Mikropartikel und Nanopartikuläre Systeme als Wirkstoffträger, S. 571 – 573
- [3] **Bareford L. M., Swaan P.**; Endocytic mechanisms for targeted drug delivery; Advanced Drug Delivery Reviews 59 (2007), S. 748 – 758
- [4] **Hillaireau H. Couvreur P.**; Nanocarriers' entry into the cell: relevance to drug delivery; Cellular and Molecular Life Sciences (2009), S. 2873 - 2896
- [5] **Maeda H., Wu J., Sawa T., Matsumura Y., Hori K.**; Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review; Journal of Controlled Release 65 (2000), S. 271 – 284
- [6] **Golombek S. K., May J., Theek B., Appold L., Drude N., Kiessling F., Lammers T.**; Tumor Targeting via EPR: Strategies to Enhance Patient Responses; Advanced Drug Delivery Reviews 130 (2018), S. 17 – 38
- [7] **Haley B., Frenkel E.**; Nanoparticles for drug delivery in cancer treatment; Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations 26 (2008) S. 57 – 64
- [8] **Cormode D. P., Naha P. C., Fayad Z. A.**; Nanoparticle Contrast Agents for Computed Tomography: A Focus on Micelles; Contrast Media Mol Imaging (2014) S. 571 – 573
- [9] **Boysen E., Boysen N.**; Nanotechnologie für Dummies 1. Auflage 2016, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Deutschland; Kapitel 2 – Wer macht was?
- [10] **Rezvantab S., Drude N. I., Moraveji M. K., Güvener N., Koons E. K., Shi Y., Lammers T., Kiessling F.**; PLGA-Based Nanoparticles in Cancer Treatment; frontiers in Pharmacology (2018), S. 1 – 19
- [11] **Elzoghby A. O., Samy W. M., Elgindy N. A.**; Protein-based nanocarriers as promising drug and gene delivery systems; Journal of Controlled Release 161 (2012), S. 38 – 49
- [12] **Lomis N., Westfall S., Farahdel L., Malhotra M., Shum-Tim D., Prakash S.**; Human Serum Albumin Nanoparticles for Use in Cancer Drug Delivery: Process Optimization and In Vitro Characterization; Nanomaterials (2016), S. 1 – 17
- [13] **Löffler G. Petrides P. E.**; Biochemie und Pathobiochemie 7. Auflage 2003, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Deutschland; Kapitel 32 – Blut, S. 1009 – 1014
- [14] **Fahr A.**; Voigt Pharmazeutische Technologie für Studium und Beruf 12. Auflage 2015, Deutscher Apotheker Verlag, 70191 Stuttgart, Deutschland; Kapitel 20 – Mikro- und nanodisperse Systeme, S. 456 – 457
- [15] **Silva R., Ferreira H., Cavaco-Paulo A.**; Sonoproduction of Liposomes and Protein Particles as Templates for Delivery Purposes; Biomacromolecules (2011), S. 3353 – 3368

- [16] **Apfelthaler C., Gassenbauer P., Weisse S., Gabor F., Wirth M.;** A lectin mediated delivery system for the intravesical treatment of bladder diseases using poly-(L)-glutamic acid as polymeric backbone; *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 111 (2018), S. 376 – 382
- [17] **Sticher O., Heilmann J., Zündorf I.;** Hänsel/Sticher *Pharmakognosie Phytopharmazie* 10. Ausgabe 2015, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, 70191 Stuttgart, Deutschland; Kapitel 15 – Pflanzliche Lectine: Vorkommen, Eigenschaften, Analytik und Bewertung ihrer immunmodulatorischen Aktivität, S. 440 – 448
- [18] **Wright C. S., Kellogg E.;** Differences in hydropathic properties of ligand binding at four independent sites in wheat germ agglutinin-oligosaccharide crystal complexes; *Protein Science* 5 (1996), S. 1466 – 1476
- [19] **Neutsch L., Plattner V. E., Polster-Wildhofen S., Zidar A., Chott A. Borchard G., Zechner O., Gabor F., Wirth M.;** Lectin mediated biorecognition as a novel strategy for targeted delivery to bladder cancer; *The Journal of Urology* 186 (2011), S. 1481 – 1488
- [20] **Neutsch L., Eggenreich B., Herwig E., Marchetti-Deschmann M., Allmaier G., Gabor F., Wirth M.;** Lectin bioconjugates trigger urothelial cytoinvasion – A glycotargeted approach for improved intravesical drug delivery; *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmazeutics* 82 (2012), S. 367 – 375
- [21] **AWMF;** S3-Leitlinie Früherkennung, Diagnose, Therapie und Nachsorge des Harnblasenkarzinoms [ONLINE – abgerufen am: 14.10.2020 um 17:30]: https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/032-038OLI_S3_Harnblasenkarzinom_2020-04.pdf
- [22] **GuhaSarkar S., Banerjee R.;** Intravesical drug delivery: Challenges, current status, opportunities and novel strategies; *Journal of Controlled Release* 148 (2010), S. 147 – 159
- [23] **Tyagi P., Wu P., Chancellor M., Yoshimura N., Huang L.;** Recent Advances in Intravesical Drug/Gene Delivery; *Molecular Pharmazeutics* (2006), S. 369 – 379
- [24] **Rollet A., Reiter T., Nogueira P., Cardinale M., Loureiro A., Gomes A., Cavaco-Paulo A., Moreira A., Carmo A. M., Guebitz G. M.;** Folic acid-functionalized human serum albumin nanocapsules for targeted drug delivery to chronically activated macrophages; *International Journal of Pharmaceutics* 427 (2012) S. 460 – 466
- [25] **Bronze-Uhle E. S., Costa B. C., Ximenes V. F., Lisboa-Filho P. N.;** Synthetic nanoparticles of bovine serum albumin with entrapped salicylic acid; *Nanotechnology Science and Applications* (2017) S. 11 – 21
- [26] **Thermo Fischer Scientific;** Micro BCA™ Protein Assay Kit – Reagents A (MA): [ONLINE – abgerufen am: 17.10.2020 um 10:19]: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/23231#/23231>
- [27] **Thermo Fischer Scientific;** Micro BCA™ Protein Assay Kit – Reagent B (MB): [ONLINE – abgerufen am: 17.10.2020 um 10:20]: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/23232#/23232>
- [28] **Thermo Fischer Scientific;** Micro BCA™ Protein Assay Kit – Reagent C (MC): [ONLINE – abgerufen am: 17.10.2020 um 10:20]: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/23234#/23234>

- [29] **Thermo Fischer Scientific**; Micro BCA™ Protein Assay Kit: [ONLINE – abgerufen am: 17.10.2020 um 10:20]: https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https%3A%2F%2Fassets.thermofisher.com%2FTFS-Assets%2FLSG%2Fmanuals%2FMAN0011237_Micro_BCA_Protein_Asy_UG.pdf&title=VXNlciBHdWlkZTogI1pY3JvIEJDQSBQcm90ZWlulEFzc2F5IEtpdA==
- [30] **Sokolik C. G., Ben-Shabat-Binyamini, R., Gedanken A., Lellouche J.**; Proteinaceous microspheres as a delivery system for carvacrol and thymol in antibacterial applications; *Ultrasonics – Sonochemistry* 41 (2018), S. 288 – 296
- [31] **Mehlem A., Hagberg C. E., Muhl L., Eriksson U., Falkevall A.**; Imaging of neutral lipids by oil red O for analyzing the metabolic status in health and disease; *Nature Protocols* 8 (2013) S. 1149 – 1154
- [32] **Sigma Aldrich**; Oil Red O: [ONLINE – abgerufen am: 15.10.2020 um 15:43]: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/substance/oilredo40849132006511?lang=de®ion=AT>
- [33] **Suslick K.S., Grinstaff M.W., Kolbeck K.J., Wong M.**; Characterization of sonochemically prepared proteinaceous microspheres; *Ultrasonics – Sonochemistry* Vol 1 No 1 (1994) S. 65 – 68
- [34] **Malvern Panalytical**; Dynamic Light Scattering (DLS): [ONLINE – abgerufen am: 13.10.2020 um 13:09]: <https://www.malvernpanalytical.com/en/products/technology/light-scattering/dynamic-light-scattering/>
- [35] **Muller R. H., Schuhmann R.**; Teilchengrößenmessung in der Laborpraxis 1996, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, Deutschland; Kapitel 3.1 – Theorie und Meßanordnung, S. 25
- [36] **Phan H. T., Haes A, J.**; What Does Nanoparticle Stability Mean?; *J Phys Chem C Nanomater Interfaces* (2019) S. 1 – 29
- [37] **Muller R. H., Schuhmann R.**; Zetapotential und Partikelladung in der Laborpraxis 1996, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, Deutschland; Kapitel 2.1 – Zetapotential – Theorie, S. 46
- [38] **Carl Roth**; n-Dodecan: [ONLINE – abgerufen am: 17.10.2020 um 10:21]: <https://www.carlroth.com/at/de/von-a-bis-z/n-dodecan/p/8786.1>
- [39] **Abdelwahed W., Degobert G., Stainmesse S., Fessi H.**; Freeze-drying of nanoparticles: Formulation, process and storage considerations; *Advanced Drug Delivery Reviews* 58 (2006) S. 1688 – 1713