



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Optimierung der Herstellung und Reinigung von PLGA-Nanopartikeln

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Verfasserin / Verfasser: Cornelia Teichmann

Studienrichtung /Studienzweig A449 Pharmazie
(lt. Studienblatt):

Betreuerin / Betreuer: Ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Franz Gabor

Wien, im Sommer 2010

Ich danke

Herrn Ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Franz Gabor für die sehr herzliche Aufnahme in seiner Arbeitsgruppe, die Bereitstellung meines Themas und die Unterstützung bei der Verfassung meiner Diplomarbeit sowie die Möglichkeit die Arbeit mit Nanopartikeln kennen zu lernen.

Der gesamten Arbeitsgruppe für ihre Hilfe und die freundschaftliche Atmosphäre.

Frau Dr. Vera Kerleta für die persönliche und fachliche Betreuung, ihre stete Aufmunterung und die schöne gemeinsame Zeit.

Meinen Studienkollegen und Freunden für die gegenseitige Unterstützung und die unvergesslichen Jahre.

Meiner Familie, besonders meinem Großvater, Anton Hejduk, für die Unterstützung während meiner gesamten Schulzeit.

Meinem Freund, Werner Sattler, für seine unendliche Geduld und Motivation in den letzten sechs Jahren.

Anmerkungen zur Urheberschaft

Die HPLC-Daten und der dazugehörige Text wurden freundlicherweise von Alice Kiwek zur Verfügung gestellt.

Inhaltsverzeichnis

1. Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	3
2. Allgemeiner Teil:.....	5
2.1 Nanotechnologie	5
2.2 Nanopartikel.....	6
2.3 Materialien	9
2.3.1 PLGA- Poly (D,L-lactid-co-glycolid)	9
2.3.2Tenside.....	10
2.3.3 Polyethylenglycol- PEG	13
3. Methoden und Geräte.....	15
3.1 Methoden	15
3.1.1 Die Herstellung von NP	15
3.1.2. Reinigung der Nanopartikel mittels Diafiltration.....	16
3.1.3 Derivatisierung von NP mit WGA.....	17
3.1.3 Pufferherstellung	18
3.2 Geräte	19
3.2.1 Herstellung von NP.....	19
3.2.2 Charakterisierung von NP	19
4. Spezieller Teil	30
4.1 Herstellung von PLGA-/ PEG-/ Tween- Nanopartikel.....	30
4.1.1a Variation 1 (Charge 1-6)	31
4.1.1b Variation 2 (Charge 7-13)	34
4.1.1c Variation 3 (Charge 20, 20a).....	36
4.1.2 Variation 4 (Charge 13)	39
4.1.3 Variation 5 (Charge 14-18)	41
4.1.4 Variation 6 (Charge 19-22)	43

Inhaltsverzeichnis

4.1.5 Variation 7 (Charge 26-28, 29-32)	48
4.1.6 Variation 8 (Charge 33-46)	52
4.1.7 Variation 9 (Charge 47-62)	64
4.2 Aufreinigung von PLGA- NP mit der Zentrifuge	71
4.3 Charakterisierung von fWGA- PLGA- NP im AF4:	77
5. Zusammenfassung	83
6. Anhang	86
6.1 Abkürzungsverzeichnis	86
6.2 Literaturverzeichnis	87
6.3 Lebenslauf	90

1. Einleitung

Die Erforschung der Anwendungen von Nanopartikeln hat sich in den letzten Jahren in der pharmazeutisch- technologischen Wissenschaft aufgrund ihrer physikalischen Besonderheiten, die einerseits die Applikation von Problemарzneistoffen und andererseits durch Oberflächenmodifikation einen zielgerichteten Transport ermöglichen, manifestiert. Eine aussichtsreiche Alternative sind nanopartikuläre Trägersysteme, die den Wirkstoff zielgerichtet, geschützt und unter Umständen mit gesteuerter Freisetzung an seinen Wirkort befördern. [1] Die enorme spezifische Oberfläche nanopartikulärer Wirkstoffe ermöglicht eine erhöhte Löslichkeit und somit auch einen beschleunigten Wirkungseintritt. [2] Zusätzlich ermöglicht die erhöhte Permeabilität von entzündetem und Tumorgewebe für Nanopartikel eine passive Anreicherung von Nanoарzneiformen in diesen erkrankten Geweben verbunden mit den Vorteilen einer Reduktion von Dosis und Nebenwirkungen. Da eine zunehmende Zahl an neuartigen Arzneistoffen weder in Wasser noch in organischen Lösungsmitteln löslich ist, hat die Entwicklung von Nanosphären diesbezüglich große Relevanz. Die Oberflächenmodifikation der Nanoарzneiformen mit biorekognitiven Proteinen ermöglicht eine zusätzliche aktiv zielgerichtete, organspezifische Therapie. Eine kovalente Kopplung von Weizenlektin (Wheat Germ Agglutinin, WGA) an Nanopartikel erhöht, aufgrund ihrer selektiven Affinität zur Glycokalix bestimmter Zellarten und Vermittlung von Endocytose, neben ihrem Effekt als Targeter auch die Aufnahmerate des Arzneistoffes in die Zelle. [3]

Die Interaktion von Polymerpartikeln mit Körperzellen ist von einer Reihe von unterschiedlichen Faktoren abhängig. Neben der Oberflächenbeschaffenheit stellen auch Größe, Ladung und Hydrophilie der Partikel wichtige Parameter dar.

Für die i.v. Injektion müssen die Partikel kleiner als 3µm sein, da die kleinsten Blutkapillaren einen Durchmesser von 5-6µm haben und es sonst zu Einschränkungen in der Zirkulation und Embolien kommen kann. PLGA-Mikropartikel mit einem Durchmesser von 1-2µm weisen eine sehr geringe Interaktion mit Zellen auf.

Einleitung

In einem Größenbereich von 600nm können Partikel in Haarfollikel eindringen und als Kontrastmittel für die Ultraschalldiagnostik eingesetzt werden. [4]

In einem Zellkulturmodell mit Dünndarmepithelzellen, sogenannten Caco-2-Zellen, konnte mithilfe der Konfokalmikroskopie gezeigt werden, dass PLGA- Nanosphären mit einem Durchmesser von 100nm intrazellulär lokalisiert sind, wogegen größere lediglich mit der apikalen Zellmembran assoziiert waren. Demnach kann man PLGA- Nanopartikel je nach Größe gezielt an und durch die Zellmembran leiten.

Nanopartikuläre Formulierungen wurden beispielsweise als mukoadhäsive Nanosuspensionen für die orale Therapie oder als Tween 80 oberflächenflächenmodifizierte NP zur Behandlung von parasiteninduzierten Infektionen des Zentralnervensystems und des Gastrointestinaltraktes vorgeschlagen. Die orale Applikation wird weiters für Dickdarmkrebs oder entzündliche Krankheiten wie Sprue angedacht. [5]

Im Rahmen dieser Diplomarbeit sollten durch Variation einzelner Herstellungsparameter der Doppelemulsionstechnik unterschiedliche Größenbereiche von Nanosphären hergestellt und deren Lagerstabilität untersucht werden. Dazu werden sowohl Tensidkonzentrationen und -arten als auch Mengen, Energieeinfluss und lipophile Phase variiert. Die hergestellten PLGA- Partikel werden weiters mit fluoreszierendem Weizenlektin oberflächenmodifiziert und der Anteil an gebundenem Weizenlektin mithilfe der AF4, HPLC und Fluorimetrie erfasst. Da nach der Kopplung von Proteinen an die Partikeloberfläche etwaige Polymer- und Tensidrückstände abzutrennen sind, sollte zusätzlich eine optimale Reinigungsmethode ausgearbeitet werden.

2. Allgemeiner Teil:

2.1 Nanotechnologie

Nanotechnologie definiert jegliche Technologie im nanoskaligen Bereich, die Anwendung in der realen Welt findet. [6] Nanopartikel können aus einem Atom bis zu einem Verbund von einigen tausend Atomen oder Molekülen bestehen und sind zwischen einem und tausend Nanometer klein. Ein Nanometer ist 10^{-9}m , das der Größe von 6 Kohlenstoffatomen, 10 Wasserstoffatomen oder 1/100 000 eines Haardurchmessers entspricht. Die Bezeichnung stammt vom griechischen Wort *nanos* für Zwerg. [7]

Die Anfänge

Die Nanotechnologie hat ihren Ursprung in den verschiedensten Gebieten der Naturwissenschaft wie der Quantenphysik, Biotechnologie, chemischen Kombinatorik, Elektronen- und Lasermikroskopie sowie in der Industrie. [8]

Das Nanopartikelkonzept im **Zusammenhang mit zielgerichteten Arzneiformen** geht auf den deutschen Arzt, Chemiker und Serologen **Paul Ehrlich** zurück. Er wurde von den „Freikugeln“, die in Carl Maria von Weber's Oper „Der Freischütz“ immer ihr Ziel trafen, zu den sogenannten „Zauberkugeln“ inspiriert. Paul Ehrlich hatte, aufgrund seines Fokus auf die Immunologie, ursprünglich nur Antikörper im Sinn, jedoch war dies die Geburtsstunde der heutigen Nanotechnologie. [9] In den **1950er und 1960er** beschäftigte sich erstmals **Prof. Peter Paul Speiser** an der ETH, der Eidgenössischen Technologischen Hochschule, in Zürich erstmals mit der Herstellung von Nanopartikeln aus Polyacrylverbindungen für die orale Applikation. Später legte er dann das Augenmerk auf Mikrokapseln für eine verzögerte Wirkstoffabgabe. In dieser Zeit diente die Nanopartikelforschung vor allem der Modifikation von Impfstoffen. Speiser's Diplomand **Helmut Kopf** entwickelte **Mitte der 1970er Jahre** Nanosphären für die verzögerte, intravenöse Applikation von Arzneistoffen. **Jörg Kreuter**, der ebenfalls bei Speiser diplomierte, versuchte zur gleichen Zeit in Bad Homburg, Deutschland, inaktive Influenzaviren und –antigene auf Nanopartikel zu binden.

Während Speiser sich in Europa diesem Thema widmete, sorgte der Physiker **Richard Feynman** mit seiner Idee, die Encyclopedia Britannica mithilfe der DIP PEN NANOLITHOGRAPHY auf einen Stecknadelkopf zu schreiben, in den USA für Aufruhr. Er meinte, dass Platz genug darauf wäre, man müsse ihn nur nutzen. Für diese und andere revolutionäre Geistesblitze wurde er sogar von einem Psychologen der U.S. Army für schwachsinnig erklärt. Nichts desto trotz verdanken wir diesem genialen Wissenschaftler unter anderem die Verbesserung der Auflösung von Elektronenmikroskopen.

1974 wurde der **Begriff Nanotechnologie** erstmals in **Tokyo** an der Tokyo Sciency University verwendet.

In den letzten 30 Jahren hat die Nanotechnologie die Pharmazeutische Technologie und die Pharmakologie im Bereich des Transports von biologisch aktiven Verbindungen revolutioniert. [10]

2.2 Nanopartikel

Nanopartikel entstehen sowohl auf natürlichem Wege bei Vulkanausbrüchen oder Waldbränden als auch künstlich in Form von Kfz- und Industrieabgasen.

Komponenten von NP:

NP aus Kohlenstoff	Fullerene, Nanoröhrchen, Carbon Black
Metalle und Halbmetalle, Oxide	SiO ₂ , TiO ₂ , Al ₂ O ₃ , Fe ₂ O ₃ , ZnO
Halbleiter	CdTe, CdSe
Metalle	Au, Ag, Fe
Metallsulfide	
Polymere	Dendrimere, Blockcopolymere

Allgemeiner Teil

Als Vorteile von NP können folgende Charakteristika aufgezählt werden:

- a) hohe chemische Reaktivität
- b) große chemische Oberfläche
- c) hohe Löslichkeit
- d) höhere Lösungsgeschwindigkeit und rascherer Wirkungseintritt
- e) erhöhte Bioverfügbarkeit
- f) niedrigere Dosierung von Wirkstoffen
- g) geringere Toxizität inkorporierter Wirkstoffe
- h) rasche Magenpassage
- i) Reduktion der Resorptionsunterschiede
- j) geringerer Einfluss von Massekräften
- k) erhöhter Einfluss von Oberflächenkräften
- l) ermöglichen stabile Suspensionen
- m) passive Targeting-Effekte

Ihre hohe chemische Reaktivität basiert auf der enormen spezifischen Oberfläche, die wiederum in einer erhöhten Löslichkeit und einem rascheren Wirkungseintritt von Arzneistoffen resultiert. Dies führt zu einer erhöhten Bioverfügbarkeit, einer Reduktion der notwendigen Dosierung und damit Toxizität bei gleicher Wirkung. Pharmakologische Bedeutung hat die durch die höhere Lösungsgeschwindigkeit verursachte Reduktion der Resorptionsunterschiede zwischen der Einnahme auf nüchternem Magen und der nach der Mahlzeit, da sie durch die schnelle Passage durch den Magen rasch in den Darm gelangen. Außerdem gibt es einen geringeren Einfluss von Massekräften, jedoch einen erhöhten Effekt von Oberflächenkräften, wie zum Beispiel den Van der Waals-Kräften. Ein weiterer Vorteil von Nanosphären ist die mögliche Herstellung von stabilen Suspensionen, die auf anderen Wegen nicht realisierbar wäre. Ein weiteres Merkmal sind spezifische optische Eigenschaften wie Opaleszenz, die durch Lichtstreuung an kleinen Strukturen entsteht.

Allgemeiner Teil

Bei NP zwischen 70nm und 200nm zeigt sich außerdem der **Enhanced Permeability And Retention- Effekt** – ein passiver Targeting Effekt. Da die Endothelzellschicht von Tumorblutgefäßen durch die Hypervaskularisierung sehr lückenhaft ist, können NP in das Tumorgewebe diffundieren. Da Tumoren kein ableitendes Lymphsystem besitzen, werden NP im Tumor angereichert.

Für die **Herstellung von Nanopartikeln** gibt es zahlreiche Verfahren und Methoden, die je nach Anwendungsbereich eingesetzt werden wie beispielsweise die Lithographie, die Sol-Gel-Methode, die Mikroemulsionstechnik, die Nassmahltechnologie, Nanoimprinting-Technologie oder die Hochdruckhomogenisation.

Die **Materialien** für die pharmazeutisch eingesetzte Nanosphären umfassen zwei Hauptgruppen: **natürliche** als auch **synthetische Polymere**. Zu den ersteren zählen Albumine, Fibrin, Kollagen, Stärke, Alginate und Chitosan. Mit Ausnahme von Chitosan, einem Polyaminosaccharid, das durch enzymatische oder alkalische Desacetylierung aus Chitin von Garnelenschalen gewonnen wird, und Humanserumalbumin finden diese Biopolymere kaum kommerzielle Anwendung, da sie durch die chemische Vernetzung immunogen werden und aufgrund von Antikörperinduktion nur eine gewisse Zeit verabreicht werden können. Aus diesem Grund werden künstlich hergestellte Polymere wie Polymilchsäure, Polyglycolsäure, Polycaprolacton und Polycyanacrylate bevorzugt. Die Polymere sollten den an sie gestellten Anforderungen wie Biokompatibilität und Bioabbaubarkeit entsprechen sowie nicht immunogen sein.

Die **Anwendungen** von NP sind zahlreich und sie sind in den unterschiedlichsten Sparten präsent. Einerseits als Schutz- oder Überzugsmaterial für Dachziegel, Autolackversiegelungen, als Bestandteil in schmutzabweisenden Farben für Gebäudefassaden und in Schiffslackierungen, um Korrosion zu verhindern. Außerdem sind unter anderem NP in schmutzabweisenden Beschichtungen für den sogenannten Lotusblüteneffekt verantwortlich, ein Beispiel dafür ist das ETC (easy to clean)-Glas.

In der Automobiltechnologie werden sogenannte Carbon Nanotubes für die Herstellung von leichteren Karosserien und Fahrgestellen genutzt.

Biopharmazeutische Anwendungen erfolgen aufgrund folgender spezieller Eigenschaften: Sie schützen den eingebauten bzw. umhüllten Wirkstoff. Inkorporiert werden Peptide, Proteine, Oligonukleotide und DNA. NP ermöglichen eine kontrollierte Wirkstofffreisetzung je nach Art und Zusammensetzung des Polymers bzw. der präsenten Hilfsstoffe. Ein weiterer Vorteil ist das Überwinden von Resorptionsbarrieren wie die des Gastrointestinaltraktes nach peroraler Verabreichung, der Bluthirnschranke nach intravenöser Applikation oder der Haut. Wirkstoffe, die in oberflächenmodifizierten NP inkorporiert sind, werden von Tumorzellen durch erhöhte Bindung an die Tumorzellen bzw. durch den EPR- Effekt eher aufgenommen.

2.3 Materialien

2.3.1 PLGA- Poly (D,L-lactid-co-glycolid)

Die 1:1 Mikroblöcke aus der hydrophileren Milchsäure und der hydrophoberen Glycolsäure wurden bereits in den 1960er Jahren als bioabbaubares Nahtmaterial, Schrauben und Bänder in der Chirurgie eingesetzt und werden heute wegen ihrer Biokompatibilität für die Nanopartikelherstellung verwendet. PLGA zerfällt durch hydrolytische Spaltung der Polymerketten im Organismus in die untoxischen Bestandteile Milchsäure und Glycolsäure. Milchsäure wird zu Pyruvat, welches als Acetyl-CoA oder Oxalacetat in den Krebszyklus eintritt, und Kohlendioxid abgebaut, das abgeatmet wird. Glycolsäure, die Hydroxyessigsäure, wird teilweise durch Glycolat-Oxidase und Glycin-Transaminase zu Glyoxylat oxidiert, das in Glycin, Serin und Pyruvat umgewandelt wird. Letzteres, wird wiederum über den Krebszyklus zu Kohlendioxid und Wasser metabolisiert. Der restliche Anteil der Glycolsäure wird direkt im Urin ausgeschieden.

Dieser Lactid- Glycolid- Copolyester ermöglicht neben dem Schutz von inkorporierten Stoffen auch eine kontrollierte Wirkstofffreisetzung, da die Polymerketten im Körper quellen und so zunächst Wirkstoffmoleküle freisetzen, die sich an der NP- Oberfläche befinden. Dieser erste Schritt im Freisetzungsprofil wird als „First Burst Effect“ bezeichnet. Es folgt als zweite Phase eine unspezifische Hydrolyse ohne enzymatische Beteiligung in wasserunlösliche Oligomere, die lange bestehen bleiben und so eine langsame Wirkstofffreisetzung durch Diffusion ermöglichen. Erst die Bildung wasserlöslicher Oligomere in der dritten Phase der Freisetzung bewirkt wieder eine raschere und schließlich vollständige Freisetzung des inkorporierten Wirkstoffes. Es liegt somit ein triphasisches Freisetzungsprofil vor. Nach ca. zwei Wochen ist die Nanosphäre vollständig abgebaut, wobei dies in-vivo etwa drei Mal schneller geschieht als ex-vivo, da die Matrix durch Blutfette weicher wird und so Wasser schneller in den Partikel eindringen kann. PLGA ist sterilisierbar, da durch Gammastrahlung nur eine vernachlässigbare Kettenverkürzung auftritt. Weiters kann es auch aufgrund seiner mechanischen Festigkeit implantiert werden. Einen erheblichen Vorteil stellt seine Derivatisierbarkeit dar, die durch mehr als 54µMol freie Carboxylgruppen pro Gramm Polymer zustande kommt. [11][12][13]

2.3.2Tenside

Diese Moleküle sind oberflächenaktiv, wobei sich der hydrophile Teil Richtung wässriger Phase ausrichtet und der hydrophobe Teil des amphiphilen Moleküls in Richtung lipophiler Phase orientiert ist. Sie ermöglichen durch Herabsetzen der Grenzflächenspannung zwischen den beiden unterschiedlich polaren Phasen eine Dispersionsbildung und so die Nanopartikelherstellung und –stabilisierung. Jedoch können vor allem anionische Lösungsvermittler Proteine aus der Zellmembran herauslösen, sodass die Tensidkonzentration so niedrig wie möglich gehalten werden soll, um toxische Auswirkungen zu vermeiden.

Eine Charakterisierung von Tensiden ist durch den **HLB- Wert** möglich, wobei HLB für das englische *hydrophilic- lipophilic- Balance* steht. Diese Methode wurde vom Chemiker W.C. Griffin entwickelt, um nichtionische Tenside gemäß ihres wasser- bzw. fettlöslichen Anteils zu charakterisieren. Mit diesem einfachen System brachte er in den 50er Jahren des 20. Jahrhunderts eine Übersicht in die wachsende Tensidindustrie.

Die HLB- Skala ist willkürlich von 0- 20 festgelegt, wobei 0 eine rein lipophile Verbindung beschreibt und 20 für eine chemische Verbindung mit nur hydrophilen Anteilen steht. Verbindungen mit einem HLB- Wert zwischen 8 und 18 stabilisieren W/O Emulsionen.

2.3.2.1 Poloxamer 188 (Pluronic® F-68)

Dieses Tensid ist ein nichtionisches, schaumarmes Blockcopolymer der Poloxamergruppe, das seine A-B-A Struktur durch Copolymerisation von Propylenoxid (B) und Ethylenoxid (A) erhält, wobei A den hydrophilen und B den durch eine zusätzliche Methylengruppe hydrophoben Anteil darstellt. Die Poloxamere werden mit zunehmendem Ethylenglycolanteil und steigender molarer Masse des Propylenglycolanteils in ihrer Konsistenz immer fester, sodass sie flüssig (L, liquid), pastös (P. paste) oder fest (F, flake) sind.

Das toxikologisch unbedenkliche Poloxamer 188 ist fest und wird als feines, weißes, rieselfähiges Pulver, das aus nicht klebenden Mikroperlen besteht, beschrieben. Sein Molekulargewicht ist ca.8400Da und die molare Masse des wasserabstoßenden, zentralen Polypropylenglycolblocks beträgt 1750g/mol. Da der Polyethylenglycolanteil im Molekül 80% ausmacht, ist Poloxamer 188 gut wasserlöslich und nahezu unlöslich in organischen Lösungsmitteln. Dieses Blockcopolymer weist einen HLB-Wert von 24-26 auf. Erst bei 60°C zeigt Poloxamer 188, im Gegensatz zu allen anderen Tensiden der Poloxamergruppe, eine Abhängigkeit der Viskosität von der Temperatur. Die Lagerung sollte bei Raumtemperatur und luftdicht verschlossen erfolgen.

Aufgrund des amphiphilen Charakters werden diese Biopolymere in zahlreichen Industriezweigen eingesetzt. Sie finden ihre Verwendung in der Wasch- und Reinigungsmittelindustrie, wie zum Beispiel in Reinigern für Molkereien und Brauereien. Neben dem Einsatz in der Kunststoff- und Kautschukverarbeitung werden sie auch in der Pharma- und Kosmetikindustrie verwendet, da sie die Löslichkeit und Resorption von Arzneistoffen verbessern.

Poloxamere sind auch Bestandteile von halbfesten Zubereitungen wie Mikroemulsionsgelen, da sie die Benetzbarkeit und Haftfähigkeit auf Haut und Schleimhaut verbessern. Eine weitere wichtige Anwendung stellen parenterale Fettemulsionen dar.

2.3.2.2 Pluronic® L62

Dieses nichtionische, schaumarme Blockcopolymer gehört ebenfalls zur Gruppe der Poloxamere und wird als ungiftig eingestuft. Es handelt sich um eine farblose, klare Flüssigkeit mit einem Molekulargewicht von 2450Da und einem HLB- Wert von 1-7, der die geringe Wasserlöslichkeit (10% bei 25°C) erklärt.

2.3.2.3 Polysorbate, Tweens®

Tween® 20 und **Tween® 80** sind wie Poloxamere ebenfalls nichtionische Tenside und zählen zu den Polyethylenglycol-Sorbitan-Fettsäureestern, sogenannten Polysorbaten, wobei Sorbitanhydrid mit 4 Polyethylenoxid-Ketten aus zwanzig Ethylenoxideinheiten verethert ist und endständig mit einer Fettsäure aus zwölf bis achtzehn C- Atomen verestert ist. Sowohl Tween 20 als auch Tween® 80 sind wasserlöslich, aber unlöslich in hydrophoben Lösungsmitteln. Tween® 20 ist Polyoxyethylen(20)sorbitan-monolaurat mit HLB 16,7, Tween® 80 Polyoxyethylen(80)sorbitan-monooleat mit einem HLB- Wert von 15.

Tween® 80 gilt als gut verträglich und wurde von der FDA als unbedenklich eingestuft. Schon in den 1970ern wurde in Toxizitätsstudien mit Tween® 20 gezeigt, dass es als nicht ungefährlich angesehen werden kann, da es Auswirkungen auf die Verdauung und das Längenwachstum von Nagern hat. Bei Hamstern wurden nach einjährigem Futterzusatz von hohen Tween® 20 Konzentrationen Nephritis und andere Organveränderungen festgestellt. [14]

Außerdem wird durch Polysorbat 20 die Aufnahme von fettlöslichen Giftstoffen erhöht. Aus diesen Gründen werden die in der Lebensmittelindustrie als Emulgatoren, Lösungsvermittler und Schaumstabilisatoren eingesetzten Tweens® so niedrig wie möglich dosiert und vor möglichen Risiken infolge erhöhtem Konsums hingewiesen.

Die EU- Lebensmittelzusatzstoffnummer von Tween® 20 ist E432 und von Tween® 80 E433. Die Polysorbate werden als Emulgatoren und Netzmittel in Speiseeis, Soßen, Suppen, Süßwaren, Kaugummis und als Stabilisatoren für Bierschaum zugesetzt. Des Weiteren wird es in Wasch-, Futtermitteln und Kosmetika eingesetzt. [15][16]

2.3.3 Polyethylenglycol- PEG

Dieser chemisch inerte, wasserlösliche und atoxische Lösungsvermittler mit der Summenformel $C_{2n}H_{4n+2}O_{n+1}$, dessen Monomer Ethylenglycol darstellt, wurde in der Medizin als Macrogol® als Plasmaexpander verwendet. Je nach Kettenlänge ist der Aggregatzustand des Polymers, das durch alkalisch oder sauer katalysierte Polymerisation von Ethylenoxid hergestellt wird, fest oder flüssig.

PEG weist keine amphiphile Struktur auf, da es ein Homopolymer ist und kann daher auch nicht als Tensid bezeichnet werden. Aus diesem Grund muss bei der Nanopartikelherstellung durch die Doppelemulsionstechnik Poloxamer 188 als Tensid zugesetzt werden.

Seine Anwendung findet PEG in den unterschiedlichsten Bereichen der Technik und Industrie. PEGs werden beispielsweise, da sie nicht flüchtig sind, als Weichmacher oder Feuchthaltemittel in der Gummiherstellung, bei der Veredelung von Hölzern, in der Keramik- und Glasindustrie und als reaktive Komponente bei der Herstellung von Polyestern und Polyurethanen eingesetzt. Außerdem werden durch PEG Enzyme in Waschmitteln aktiv verfügbar gemacht.

Aufgrund ihrer Unbedenklichkeit werden Polyethylenglycole seit Jahrzehnten in der Galenik als Makrogol-suppositorien, als Salbengrundlage, in Tropfen- und Injektionspräparaten, in Tabletten und Dragees als Wirkstoffträger, Lösungsvermittler und Hilfsstoffe eingesetzt.

Allgemeiner Teil

Des Weiteren wird dieses Polymer als Diuretikum bei Obstipation und Macrogol 4000 zur Darmreinigung vor einer Koloskopie verabreicht.

PEG	HLB- Wert	Molekulargewicht (g/mol)	Aggregatzustand
PEG200	13,5	200	flüssig
PEG2000	9-18	2000	fest
PEG4000	15,5	4000	fest
PEG8000	13,5	8000	fest

Tab. 1: Charakteristika verschiedener Polyethylenglykole.

Die Zahlen beziehen sich auf die Kettenlänge, das heißt auf die Anzahl der Monomereinheiten.

[17][15]

3. Methoden und Geräte

3.1 Methoden

3.1.1 Herstellung von NP

Für die Herstellung von Nanosphären im Labormaßstab hat sich Doppelemulsionstechnik mithilfe von Polymerpräzipitation etabliert. Dabei wird eine Wasserphase (Wasserphase 1) mit gegebenenfalls einem hydrophilen Wirkstoff in einer voluminöseren Ethylacetatphase (Ölphase), die das Polymer und gegebenenfalls einen hydrophoben Wirkstoff enthält, durch Energieeintrag mittels Ultraschallstab emulgiert. Anschließend wird diese W/O- Emulsion in eine weitere hydrophile Phase (Wasserphase 2), die beispielsweise das Tensid Poloxamer 188 enthält, mittels Beschallen mit dem Ultraschallstab eingearbeitet. Es resultiert eine W/O/W- Emulsion, die in eine wässrige Stabilisierungsphase eingebracht wird, die ebenfalls tensidhaltig sein kann. Unter Rühren kommt es zur Aushärtung der bereits gebildeten Nanotröpfchen. Nach einer Stunde Rühren wird das noch nicht abgedampfte Ethylacetat in der Suspension durch Unterdruck entfernt.

Was genau geschieht beim Beschallen der Phasen?

Der Ultraschall verursacht durch seine hochfrequenten und energiereichen Schwingungen die Bildung kleiner Vakuumbälchen. Durch die hohe Druckdifferenz zwischen Außenmedium und Vakuumbälchen kommt es zur Implosion, zum Energieeintrag, höheren Dispergierung und damit zur Emulsionsbildung.

Die Herstellung von Nanopartikeln mittels Doppelemulsionstechnik:

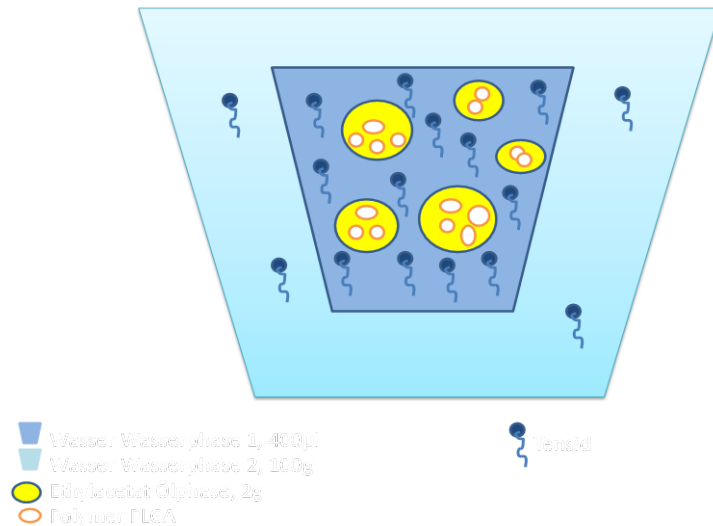


Abb. 1: Schematische Darstellung der einzelnen Phasen während der Herstellung von NP mittels Doppelemulsionstechnik.

3.1.2. Reinigung der Nanopartikel mittels Diafiltration (Vivaflow[®] 50 Kassette)

Um überschüssiges Tensid oder Aktivierungsreagentien aus der Suspension zu entfernen wird mit diesem tangentialen Einweg-Rezirkulationssystem gewaschen. Eine rasche Dialyse und Aufkonzentrierung von Lösungen wird mithilfe eines Flip-Flow-Flussweges erreicht, der trotz geringer Pumpenförderrate hohe Querströmungsturbulenzen ermöglicht. Die Membranfläche der Kassette beträgt 50 cm² und ist aus Polyethersulfon hergestellt, welches eine hohe Flussrate und eine geringe Proteinbindung möglich macht. Außerdem interagiert dieses Membranmaterial weder mit wasserlöslichen noch mit wasserunlöslichen Verbindungen und ist über einen breiten pH-Bereich stabil, jedoch ist die obere Grenze von auswaschbaren Substanzen mit 100 000Da festgelegt.

Die Vivaflow 50 Kassette (Vivascience, Sartorius) besteht aus mehreren Einzelteilen: Pumpe, Kassette mit inkorporierter Membran, Zu- und Abfuhrschlauch sowie einem Schlauch für überschüssiges Filtrat. Beim Konzentrieren der Probe münden Zu- und Abfuhrschlauch in einen Erlenmeyerkolben. Die Pumpe erzeugt einen Druck auf die Membran, sodass das Medium als Filtrat von den NP abgetrennt wird. Der NP-enthaltende Überstand wird durch Rezirkulieren auf das gewünschte Volumen eingeengt. [18]

3.1.3 Derivatisierung von NP mit WGA

An die Oberfläche von PLGA-Nanopartikeln werden sowohl zur Erhöhung der Resorption aus dem Darm nach peroraler Gabe als auch zur zielgerichteten Arzneistofftherapie Lektine kovalent gebunden.

Durch die Bindung der an der Nanopartikeloberfläche immobilisierten Proteine an die Glykokalix, den Kohlenhydratanteil der extrazellulären Seite der Zellmembran der Dünndarmzellen, wird der Diffusionsweg des Arzneistoffes zu den Enterozyten verkürzt und so die Aufnahme in die Enterozyten, die für die Resorption zuständig sind, erleichtert.

Weizenkeime aus *Triticum vulgare* enthalten ein Lektin (Wheat Germ Agglutinin, WGA), das eine besonders hohe Bindungsrate an die N-Acetylglucosamin- und Sialinsäureteilstrukturen der Glykokalix von Kolonkarzinomzellen und humanen Colonozyten aufweist. Die Erkennung von spezifischen Polysaccharidstrukturen durch Lektine und deren Bindung an die Epithelzelloberfläche erhöht die Endozytoseaktivität bestimmter Zellarten. Da dieses Lektin gegenüber Proteasen des Gastrointestinaltraktes stabil ist, kann es peroral verabreicht werden ohne seine Bioaktivität zu verlieren.

Die Proteinkopplung an die Oberfläche von PLGA-NP mit freien Carboxylgruppen erfolgt mittels **Carbodiimid-Technik**. [19]

Als Zwischenstufe erfolgt durch EDAC (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid) und NHS (N-Hydroxy-succinimid) die Bildung eines reaktiven Esters, der mit den freien Aminogruppen von Proteinen Amidbindungen eingeht.

Dazu werden 20ml PLGA-Nanopartikelsuspension in einer Vivaflow[®] 50 Kassette zweimal mit jeweils 40ml 20mM HEPES/NaOH-Puffer pH 7,4 gereinigt und die Carboxylatgruppen an der Partikeloberfläche mit EDAC und NHS, jeweils gelöst in HEPES/NaOH-Puffer pH 7,4 zwei Stunden bei Raumtemperatur durch „end-over-end“-Inkubation aktiviert.

Die aktivierte NP-Suspension wird zwei Mal mit je 40ml 20mM HEPES/NaOH-Puffer pH7,4 gewaschen, wobei beim zweiten Waschschrift 0,3% Poloxamer188 zugesetzt werden. Durch Zusatz von 18,518611nMol NH₂-Komponente, wie beispielsweise 0,66mg WGA bzw. fluoreszenzmarkiertem WGA, wird die Partikeloberfläche über Nacht bei Raumtemperatur unter „end-over-end“-Inkubation funktionalisiert. Eventuell noch freie, aktivierte Carboxylgruppen werden durch Zusatz von 300mg Glycin in 3ml 20mM HEPES/NaOH-Puffer pH 7,4 durch „end-over-end“-Inkubation eine Stunde bei Raumtemperatur abgesättigt. Abschließend werden die lektinhaltigen NP zwei Mal mit je 40ml 20mM HEPES/NaOH-Puffer pH 7,4 und ein Mal mit 40ml 20mM HEPES/NaOH-Puffer pH 7,4 unter Zusatz von 0,3% Poloxamer 188 gewaschen, auf 20ml eingengt und eventuell durch einen 0,1µm Membranfilter filtriert.

3.1.4Pufferherstellung

3.1.4.1 20mM HEPES/NaOH-Puffer

Für die Bereitung des Puffers werden 4,77g HEPES (4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure) pro Liter destilliertem Wasser eingewogen und anschließend mit NaOH der gewünschte pH-Wert eingestellt.

3.1.4.2 NovaChem Surfactant 100

Das bioabbaubare Detergensenkonzentrat SF105-1 der Firma Postnova Analytics besteht aus Na₂CO₃, Tetranatrium-ethylendiamintetraacetat, Polyethylenglycol und Wasser und kann zu allgemeinen Reinigungszwecken verwendet werden. Außerdem wird die mit destilliertem Wasser auf 0,2% verdünnte Tensidlösung als Lösungsmittel für die asymmetrische Flussfeldflussfraktionierung vorgeschlagen, da es die Membranen reinigt und diese vor Verstopfung schützt. Auch NP werden bevorzugt darin suspendiert, denn es verhindert die Aggregation der NP. Alle Lösungsmittel müssen durch einen 0,1µm Membranfilter mittels Vakuum stets frisch filtriert werden.

3.2 Geräte

3.2.1 Herstellung von NP

3.2.1.1 Der Ultraschallhomogenisator

Der Sonoplus HD 70 Ultraschallstab (Bandelin Electronics, Berlin, Deutschland) mit einer Leistung von 70 Watt besteht aus einem Hochfrequenzgenerator und einer rostfreien und thermoresistenten Sonotrode aus Titan. Durch den hohen Energieeintrag können sowohl Emulsionen und Suspensionen erzeugt als auch Medien homogenisiert werden. [20]

3.2.1.2 Der Ultra-Turrax

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein IKA T8 (IKA Werke, Staufen, Deutschland) verwendet. Es handelt sich um ein korrosionsfreies 100W Dispergiergerät aus glasfaserverstärktem Teflon und Titan, das für Volumina ab 0,5ml eingesetzt werden kann. Es besteht aus einem hohlzylindrischen Stator und einem sich darin befindlichen Rotor, dessen Geschwindigkeit von 5000 bis 25000UpM variiert werden kann. Aufgrund der hohen Drehzahl des Rotors wird das zu verarbeitende Medium axial in den Dispergierkopf gesaugt und so in den Spalt zwischen Rotor und Stator gezogen. Im Spalt ist das zu dispergierende Medium hohen Scherkräften ausgesetzt und wird anschließend wieder hinaus gepresst. Dadurch entstehen starke Scher-, Prall- und Schlageffekte, die für eine optimale Durchmischung der Suspension bzw. Emulsion bei einer Umwälzgeschwindigkeit von 10-24m/s sorgen, wobei sich der Grad der Dispergierung aus dem Produkt von Schergradient und Verweilzeit der Partikel im Scherfeld ergibt. [21]

3.2.2 Charakterisierung der NP

Die genaue Bestimmung der Partikelgröße und –morphologie sowie der Lagerstabilität ist unerlässlich für die Qualitätssicherung und -kontrolle von pharmazeutischen Formulierungen. Die wichtigsten Charakteristika von Nanosphären sind Größe, Molekulargewicht, Ladungszustand, Oberflächenstruktur und Partikelgrößenverteilung. Ihre Detektion kann mithilfe unterschiedlicher Geräte erfolgen.

3.2.2.1 PCS/DLS/QLS

Die **Photonenkorrelationsspektroskopie** wird auch als **Dynamic Light Scattering** oder **Quasi Elastic Light Scattering** bezeichnet. Die Firmenbezeichnung des Gerätes (Zetasizer Nano ZS, Malvern Ltd., UK) lautet jedoch Zetaziser - ein zusammengesetztes Wort aus Zetapotential und Size für Größe.

Ursprünglich wurde diese Methodik in der Militärtechnologie für die Radarerfassung von Flugzeugen in Großbritannien entwickelt. Die heutige Anwendung zur Partikelgrößenbestimmung existiert seit Ende der 1970er Jahre, jedoch konnte die für die praktische Anwendung erforderliche enorme Rechenleistung erst durch bessere und schnellere Computer erbracht werden. Die QLS Technologie besitzt den **Vorteil**, dass sie verschiedene Parameter wie Größe, Größenverteilung, Ladungszustand, elektrische Leitfähigkeit und Molmasse von Partikeln in einem relativ großen Bereich, nämlich von 2 - 1000nm, erfassen kann.

Im Laufe der Diplomarbeit wurden folgende wichtige Partikelcharakteristika ermittelt:

- a) Partikeldurchmesser
- b) PDI
- c) Zetapotential
- d) Konduktivität

Ad a) Die PCS misst die Brown'sche Molekularbewegung von NP und kann so den deren **Durchmesser** bestimmen. Die einzelnen Partikel werden mit einem Laserstrahl beleuchtet und das Licht in alle Richtungen gestreut. Kleinere Partikel bewegen sich schneller, es erfolgt eine rasche Änderung der Interferenzen. Dagegen zeigen große Partikel kleinere Positionsänderungen und dadurch ein ähnliches Interferenzbild im Vergleich zur vorangegangenen Messung. So werden Lichtwellen verstärkt oder, wenn sie gegenläufig sind, abgeschwächt. Mithilfe eines Korrelators werden die Streulichtintensitäten verglichen und über eine Korrelationsfunktion und die Stokes- Einstein Gleichung die Partikelgröße berechnet.

Allgemeiner Teil

Durch die Stokes-Einstein-Gleichung ergibt sich auch die Abhängigkeit des Messergebnisses von der Viskosität der Probe. Ist die Probe zu konzentriert oder zu viskos, bewegen sich die einzelnen Partikel langsamer als ihrer Größe entsprechen würde durch die Lösung und täuschen so höhere Partikelgrößen vor. Aus diesem Grund ist eine hohe Kolloidverdünnung ratsam. Sowohl die Viskosität der Lösung als auch die Beweglichkeit der NP sind temperaturabhängig. Außerdem beeinflusst die Ionenkonzentration das Messergebnis, da bei zu geringer Ionenstärke eine langsamere Bewegung der NP durch eine zu breite elektrische Doppelschicht um die Partikel resultiert und so ein größerer Radius berechnet wird. Umgekehrt werden die Partikel bei zu hoher Ionenstärke als zu klein detektiert.

Die Detektion des gestreuten Lichts kann je nach Verwendungszweck in verschiedenen Winkeln erfolgen. Wenn der Streuwinkel 90° beträgt, wird im sogenannten backscatter gemessen, was genaue Messungen ermöglicht. Der Nano ZS misst im Streuwinkel von 173° , da hier weniger Partikel interferieren. Zusätzlich kann bei variierenden Winkeln gemessen werden, sodass auch die Partikelform erfassbar ist.

Die Größenbestimmung von NP in der DLS erfolgt in Polystyrolküvetten, die durch ihre nach unten verengte Form die Messung von kleinen Volumina ermöglichen.

Ad b) Der **Polydispersitätsindex Pdl** gibt die Größenverteilung einer Suspension an. Eine Probe mit einem Pdl von 0 ist monodispers, d.h. es liegt nur eine Größe vor. Ein Pdl von 0,1- 0,2 charakterisiert eine enge, polydisperse Größenverteilung. Ab einem Pdl von 0,5 ist die Probe unbrauchbar, da zu viele unterschiedliche Partikelgrößen vorliegen.

Ad c) Das **Zetapotential** ist der Ladungszustand eines Partikels in Suspension und wird in mV angegeben. Partikel sind immer geladen, wobei sie an ihrer Oberfläche eine elektrische Doppelschicht aufweisen, an der das Oberflächenpotential bestimmt wird.

Das Zetapotential wird mittels Elektrophorese bestimmt. Die Küvetten haben beidseitig Elektroden. Wenn Spannung angelegt wird, wandern die Partikel in Gegenwart von Ionen zu der entgegengesetzt polarisierten Elektrode und je nach Größe der Ladung schneller oder weniger schnell. Die Geschwindigkeit der Wanderung ist unter anderem direkt proportional zur Oberflächenladung, sodass auf die Ladung des Partikels rückgeschlossen werden kann. Das Zetapotential wird an Hand der Henry Gleichung und durch Bestimmen der elektrophoretischen Mobilität berechnet. Die elektrophoretische Mobilität ist neben der tatsächlichen Partikelladung von der Feldstärke, der Dielektrizitätskonstanten und der Viskosität des Mediums abhängig.

Ab einem Ladungszustand von ± 30 mV kann die Suspension als stabil angesehen werden, da sich Partikel, die eine stärkere gleichsinnige Ladung aufweisen, gegenseitig abstoßen und so ein Aggregieren verhindert wird.

Ad d) Konduktivität ist die elektrische Leitfähigkeit. Sie wird in mS/cm angegeben. Die Konduktivität sollte während einer Bestimmung des Zetapotentials möglichst klein, jedenfalls unter 0,1mS/cm, sein.

Als **Nachteil** ist zu nennen, dass die PCS bei mehreren gleichzeitig vorliegenden Größen je nach Verhältnis dieser einen Mittelwert errechnet und so ein falsches Ergebnis liefert. Außerdem müssen unterschiedliche Verdünnungen untersucht werden, um den richtigen Feststoffgehalt zu erreichen. [22][23][24]

3.2.2.2 Feld-Fluss-Fraktionierung

Die **Feldflussfraktionierung (FFF)** ist seit den späten 1960ern die einzige Trennmethode für Moleküle bzw. Partikel vom Nanometer- bis in den zweistelligen Mikrometerbereich, die eine hohe Selektivität und Auflösung besitzt. Mit dieser Trenntechnik kann man sowohl große Polymere, Kolloide, Proteine und Partikel als auch kleinste Viren trennen und charakterisieren. Die FFF wurde im Laufe der Jahre modifiziert, wobei unterschiedliche physikalische Prinzipien die Basis bilden.

Die älteste Methode ist **Thermische FFF**, die die Komponenten einer Probe aufgrund ihrer unterschiedlichen Wanderung von wärmeren in kältere Regionen trennt und für Polymertrennungen gut geeignet ist.

Zum anderen wurde die **Sedimentationsfeldflussfraktionierung** entwickelt, deren Trennkanal sich in einer rotierenden Zentrifuge befindet und die Auftrennung aufgrund unterschiedlicher Dichtegradienten ermöglicht.

Die **Elektrische FFF** trennt Partikel aufgrund unterschiedlicher Oberflächenladungen, wird aber kontrovers diskutiert, da bei Vorliegen ähnlicher Oberflächenladungsdichten unterschiedliche Partikelgrößen nicht selektiv getrennt werden können.

Die vierte Technik ist die **Fluss FFF (F4)**, die Mitte der 1970er entwickelt wurde und eigentlich die „Symmetrische FFF“ darstellt. Die Wände des Trennkanals bilden zwei poröse Fritten, wobei eine von einer Ultrafiltrationsmembran bedeckt wird. Der entscheidende Unterschied zu den bisherigen FFF-Systemen ist der zum axialen Fluss zusätzliche vertikale Querstrom, der die Partikel je nach Größe auftrennt.

Die Abkürzung **AF4** steht für **Asymmetrische Fluss-Feld-Fluss-Fraktionierung** und ist die jüngste Entwicklung in der FFF. Dieses System von Postnova Analytics wurde erstmals 1984 von Prof. Wahlund und Prof. Giddings vorgestellt. Im Prinzip ist sie eine Verbesserung der F4, wobei die Unterschiede im asymmetrischen Aufbau des Trennkanals, der eine spezifische Auftrennung ermöglicht, und in nur einer permeablen Fritte bestehen.

Die Trennung findet, wie in Abb. 2 dargestellt, in einem flachen Kanal statt, der aus einer durchsichtigen, undurchlässigen Plexiglasplatte, durch die gefärbte Proben beobachtet werden können, einem Spacer, dessen Dicke die Kanalhöhe und damit den Trennbereich festlegt, und einer Membran mit variabler Porenweite, die auf einer durchlässigen Fritte platziert ist, besteht.

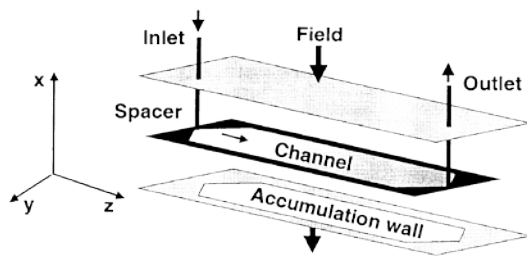


Abb. 2: Aufbau des Trennkanals eines FFF- Systems.

Die Probe wird durch eine Mikroliterspritze durch den Probeneinlass oben in den Kanal eingespritzt, daraufhin schalten sich TIP- und FOCUS-Fluss ein, wobei der von oben kommende Tip-Fluss die Partikel mitnimmt und der von weiter unten dem Tip-Fluss entgegen strömende Focus-Fluss diese an der breitesten Stelle des Spacers fokussiert. Danach schaltet sich der fokussierende Fluss aus und der laminare Tip-Fluss befördert die Partikel Richtung verengendem Auslass, der zum Detektor führt. Die Fokussierung der Probe ist in Abb.3 dargestellt.

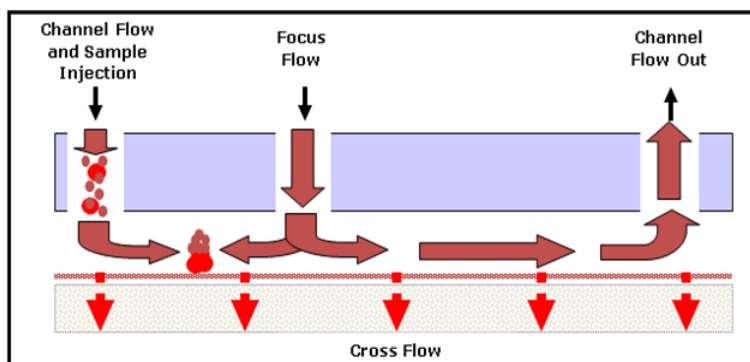


Abb. 3: Fokussierung der Probe bei der FFF-Technik.

Der dritte Fluss ist der Querfluss (CROSS-Flow), der die festen Probenteilchen im 90° Winkel zu ihrer Fließrichtung in Richtung Membran zieht. Die größeren bzw. breiteren Partikel werden wegen ihrer größeren Angriffsfläche stärker vom querziehenden Fluss zurückgehalten und eluieren später als Teilchen mit einer kleineren Angriffsfläche. Das parabolische Flussprofil des Tip-Flusses verstärkt zusätzlich zum Querfluss sehr kleine Größenunterschiede der einzelnen Partikel (Abb. 4).

So können noch Größendifferenzen im Bereich von nur 10% aufgetrennt werden. Die Retentionszeit der Partikel resultiert aus dem Diffusionskoeffizienten und dem Querfluss. [25] Die Flüsse können je nach Methode manuell eingestellt werden, um eine optimale Trennung zu ermöglichen.

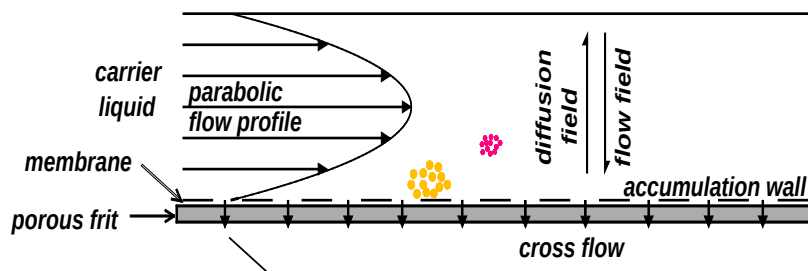


Abb. 4: Schematische Darstellung der Elution von Partikeln in der FFF.

Die Detektion erfolgt mittels MALS, Multi-Angle-Light-Scattering. Ein Laserstrahl trifft auf die Probe und die Partikel streuen das Licht in verschiedene Richtungen. Dieses Signal wird in 7 Winkeln von 35° bis 145° gemessen. Aus der entsprechenden Retentionszeit, die vom Partikeldurchmesser, der Kanalbreite, dem Querfluss und dem Kanalfloss abhängig ist, wird der Trägheitsradius R_{gyr} berechnet. Mithilfe des Trägheitsradius (Streumassenradius) kann die räumliche Ausdehnung unregelmäßig geformter Partikel bestimmt werden. Dessen Quadrat ist der Mittelwert der unterschiedlichen quadratischen Abstände gleichartiger Bausteine zum Partikelschwerpunkt. Aus diesem Radius wird der geometrische Radius R_{geo} für die Kugelform durch Dividieren durch 0.775 berechnet.

$$R_{geo} = R_{gyr} / 0.775$$

Als Ergebnis eines AF4-Experimentes erhält man ein Diagramm, wobei der erste Peak, der sogenannte Void-Peak, durch das Abschalten des Fokus-Flusses entsteht und die weiteren Peaks die einzelnen Partikelgrößen darstellen.

Zur Auswertung wird zuerst für alle Winkel die Basislinie ermittelt, danach werden die Regions of Interest (ROI) ausgewählt. Diese interessanten Regionen bzw. Peaks werden integriert und abschließend der geometrische Radius aus dem Trägheitsradius berechnet. Die Smart Stream Splitting Technique (SSST) ermöglicht zusätzlich eine 10fach stärkere Signaldetektion.

Als Lösungsmittel wird eine 0,2%ige Lösung von NovaChem[®] verwendet. Wasser und NaCl-Lösungen können ebenfalls eingesetzt werden. Alle Lösungsmittel müssen durch ein Filter mit 0,1µm Porenweite im Vakuum frisch partikelfrei filtriert werden.

Die **Vorteile** der asymmetrischen Flussfeldflussfraktion sind vielfältig. Erstens erfolgt eine nicht-destruktive Trennung, die in einer Phase abläuft. Zweitens ist keine aufwändige Probenvorbereitung erforderlich. Die einzelnen Fraktionen können gesammelt werden und mit weiteren, alternativen Methoden analysiert werden. Auch komplexe Proben können charakterisiert werden, die einzelnen Peaks zusätzlich in mehrere Fraktionen unterteilt und separat evaluiert werden. Außerdem sind sehr kleine Probenmengen (20-40µl) analysierbar. Bei der AF4 wirken keine Scherkräfte auf die Probe ein, die die Partikel zerstören könnten. Mit den entsprechenden Detektoren kann eine Reihe von wichtigen Parametern erfasst werden: Größe, Größenverteilung, Molmasse und Beladungskapazität.

Ein **Nachteil** ist die zeitintensive Methodenentwicklung und die notwendige Filtration der Lösungsmittel. Des Weiteren müssen die Filter der Pumpen und die Membran häufig gewechselt werden. [25][26]

3.2.2.3 *Infinite M200*

Fluoreszenz nennt man die spontane, kurzandauernde Emission von Licht, wenn ein angeregtes System in einen niedrigeren Energiezustand übergeht. Das emittierte Licht ist energieärmer als das zuvor absorbierte. Fluoreszierende Moleküle emittieren Licht einer bestimmten Wellenlänge, wenn sie vom Licht einer bestimmten niedrigeren Wellenlänge angeregt werden. Die mittlere Zeit, die ein Fluorophor im angeregten Zustand verbringt, nennt man Lebensdauer der Fluoreszenz und sie beträgt nur wenige Nanosekunden.

Die Fluoreszenzintensität ist die Photonenanzahl, die pro Zeiteinheit emittiert wird. Um diese zu messen müssen andere Störfaktoren ausgeschlossen werden. Es müssen beispielsweise Temperatur, pH-Bereich und Lösungsmittel optimiert werden.

Im Infinite M200 System (Tecan, Grödig, Österreich) werden fluoreszierende Moleküle mit einem Lichtstrahl aus einer Xenonlampe angeregt, der durch Kondensor und Filter für die Probe optimalen Wellenlängen-Bereich selektiert wird. Dieser Lichtstrahl einer selektierten Wellenlänge trifft auf einen Spiegel und wird auf die Probe fokussiert. Die Fluorophore werden angeregt und emittiertes, längerwelliges und damit energieärmeres Licht in den Photomultiplier geleitet. Dort werden die optischen Signale mithilfe von Dynoden in messbare, elektrische Impulse umgewandelt.

Mit diesem Gerät können Fluoreszenz, Absorption, Lumineszenz und deren Lösungen gemessen werden. Man kann Proben in Mikrotiterplatten sowohl von oben (Top System) als auch von unten (Bottom System) messen. [26]

3.2.2.4 HPLC

Der Gehalt an Poly-(D,L –Lactid- co- glykolid) (PLGA) in NP wurde mittels eines Hochleistungsflüssigkeitschromatographie(HPLC)-Verfahrens bestimmt, indem zunächst PLGA in seine monomeren Bestandteile, Glykol- und Milchsäure, hydrolysiert wurde. Zur Gehaltsbestimmung wurden die Monomere anschließend zu Derivaten mit verstärkter UV-Absorption umgesetzt, und in einer reversed-phase-Chromatographie aufgetrennt. Ein Vorteil dieser Methode ist, dass sowohl nicht-modifizierte als auch oberflächenmodifizierte PLGA-Partikel ohne vorherige Abtrennung von Störfaktoren quantifiziert werden können.

3.2.2.4.1 Materialien

Die zu untersuchenden Nano- bzw. Mikropartikel wurden aus PLGA nach dem oben beschriebenen Verfahren hergestellt. PLGA (RESOMER® RG 503H) für Vergleichsstandards wurde von der Firma Boehringer (Ingelheim, Deutschland) bezogen. Als Lösungsmittel diente Acetonitril E (Chromasolv far UV for HPLC, min. 99,9%; ACN) und als Derivatisierungsreagenzien wurden 4-omega-Dibromacetophenon (>98 %; p-BPB) und Triethylamin (R99%; TEA) (Sigma Aldrich, Wien, Österreich) eingesetzt. Alle weiteren Reagenzien waren von analytischer Reinheit.

3.2.2.4.2 Probenaufbereitung

3.2.2.4.2.1 Hydrolyse von PLGA

Ein Aliquot der Analysenlösung wurde in einem 2,0 ml WHEATON® Vial mit 200 µl ACN und 80 µl 1M Kaliumhydroxidlösung versetzt und 30 Minuten bei 30°C im Ultraschallbad bei 50%iger Intensität behandelt. Die Hydrolyse erfolgt unter ständigem Rühren bei 100°C 90 Minuten lang im Trockenschrank.

3.2.2.4.2.2 Neutralisation

Die auf Raumtemperatur erkaltete Probe wurde mit Hilfe des Indikators Bromthymolblau mit 1M Bromwasserstoff auf einen pH-Wert von 4,5 - 5,0 eingestellt.

3.2.2.4.2.3 Derivatisierung von Glykol- und Milchsäure

200 µl Analysenlösung wurden mit 800 µl ACN, 500µl 0,02M wässriger TEA-Lösung und 500µl 0,02M wässriger p-BPB-Lösung versetzt. Die Proben wurden bei 80°C im Trockenschrank 90 Minuten unter ständigem Rühren inkubiert.

3.2.2.4.2.4 Zentrifugation

Sofern die Proben in Lauge nicht lösliche Bestandteil beinhalten, ist es erforderlich, die Analyten vor der Einbringung in das HPLC-System bei 14000 UpM 30 Minuten lang zu zentrifugieren. In Kontrollversuchen wurde keine Beeinflussung der Analyse durch die Zentrifugation festgestellt.

3.2.2.4.2.5 HPLC-Analyse

Das HPLC System des Typs Agilent Technologies 1200Series (Agilent, Wien, Österreich) bestand aus einem Autosampler 1100 (20µl Injektionsvolumen), einer quaternären HPLC-Pumpe und einem UV-Dioden-Array Detektor. Als Säule wurde eine LiChrosphere® 1000RP-18e mit 5µm Packmaterial eingesetzt. Zur Datenanalyse wurde die vom Hersteller bereitgestellte Software (Agilent ChemStation for LC and LC/MS systems Rev. A. 09.01 [1206]) eingesetzt.

Als Mobile Phase diente ein 70:30 (v/v) Gemisch aus zuvor filtriertem und entgastem ACN und Wasser. Die Elution erfolgte nach einem Gradientenschema mit Zunahme auf 100% ACN. Die Flussrate betrug 1,5 ml/min. Die Absorption des Eluats wurde bei 254nm detektiert und durch Vergleich der Retentionszeiten mit externen Standards den Monomeren zugeordnet. Die Retentionszeit der Glykolsäurederivate lag bei 1.9 Minuten, die der derivatisierten Milchsäure bei 2,1 Minuten. Die Quantifizierung erfolgte durch Integration der jeweiligen Peakflächen unter Zuhilfenahme der jeweiligen externen Standards.

3.2.2.5 pH-Meter

Es handelt sich um ein elektronisches Instrument, an dessen Glaselektrode ein elektrisches Potential in direkter Abhängigkeit zur Protonenkonzentration aufgebaut wird. Aus der Potentialdifferenz zur Silber-Silberchloridhalbzelle entsteht eine Spannung, die dem pH-Wert von flüssigen Proben entspricht. Zur Erhaltung der Leitfähigkeit wurde die pH-Elektrode in einer KCl- Lösung aufbewahrt.

4. Spezieller Teil

4.1 Optimierung der Herstellung von PLGA-Nanopartikel

Anhand diverser Variationen der NP-Herstellung soll herausgefunden werden inwiefern der Nanopartikeldurchmesser, der Ladungszustand und die Lagerstabilität sowohl von der Art als auch der Konzentration von Tensiden in den einzelnen Phasen der W/O/W- Doppelemulsion abhängig ist.

Dazu wurden unterschiedliche Konzentrationen von Pluronic[®] F68, Pluronic[®] L62, Polyethylenglycol 200/2000/4000/8000 und Tween[®] 20/80 bei der Nanopartikelherstellung eingesetzt. Die Lagerstabilitätsparameter Größen- und Zetapotential wurden mithilfe der PCS bestimmt und sechs Monate regelmäßig optisch und mittels Zetasizer überprüft.

Standardprotokoll:

Herstellung von PLGA- NP nach der Doppelemulsionstechnik

Lösungen, die vor der Partikelherstellung zu bereiten sind:

- 1) 2. wässrige Phase: 6g 10% Poloxamer 188 Lösung in einem 10ml Becherglas herstellen, am Magnetrührer bei Raumtemperatur lösen.
- 2) Lipophile Phase: 400mg PLGA (Poly-D,L-lactid-co-glykolid) in ein 20ml Becherglas einwiegen, 2g Ethylacetat und ein Magnetstäbchen hinzugeben, mit Parafilm verschließen und im Kühlschrank am Magnetrührer lösen.
- 3) Stabilisierungsphase: 100g 1% Poloxamer 188 Lösung herstellen, am Magnetrührer bei ca. 600UpM bei Raumtemperatur lösen.

Herstellung:

- 1) 400µl destilliertes Wasser (1. wässrige Phase) seitlich in die lipophile Phase einlaufen lassen und 60 Sekunden unter Kühlung im Wasserbad mit dem Ultraschallstab bei 70 Watt und 90% Intensität beschallen.
- 2) Die 2. wässrige Phase zügig seitlich einlaufen lassen und 50 Sekunden unter Kühlung mit dem Ultraschallstab bei 70 Watt und 90% Intensität beschallen.
- 3) Die Doppelemulsion rasch in die gerührte Stabilisierungsphase kippen und weitere 60 Minuten bei ca. 600UpM am Magnetrührer rühren.

Spezieller Teil

- 4) Das verbliebene Ethylacetat 30 Minuten bei 170UpM und Raumtemperatur bei 100mbar abrotieren.
- 5) Die Suspension durch ein Glasfaser Membranfilter (Millipore, Billerica, MA, U.S.A.) mit 1,0µm Porenweite filtrieren.

Stabilität:

Die Größe und das Zetapotential der hergestellten Partikel wurden im Zetaziser bestimmt und danach gleiche Aliquote bei 4°C und bei -80°C gelagert. Die Stabilität der im Kühlschrank gelagerten Partikel wurden über 6 Monate mithilfe der PCS anfangs wöchentlich, ab Woche 8 monatlich geprüft.

4.1.1a Variation der 2. wässrigen Phase – 1 - 20% Poloxamer 188-Lösung (Charge 1-6)

In dieser Versuchsreihe sollte die Nanopartikelgröße durch Variation der Poloxamer 188-Konzentration der 2. wässrigen Phase modifiziert werden. Der Polydispersitätsindex und das Zetapotential, welche auch Stabilitätsparameter darstellen, sollten möglichst klein sein, um eine optimale Stabilität zu erreichen. Eine möglichst große Bandbreite an unterschiedlichen, jedoch reproduzierbaren Partikelgrößen ist essentiell für die verschiedenen Anwendungen in der pharmazeutischen Nanotechnologie. Es wurden jeweils zwei idente Chargen gleichzeitig hergestellt, um Reproduzierbarkeit zu gewährleisten.

Spezieller Teil

Durchführung: Es wurde bei **halbem Ansatz** und in **10ml Bechergläsern** gearbeitet.

Lösungen, die vor der Partikelherstellung zu bereiten sind:

- 1) **2. wässrige Phase:** 3g je **1%, 2%, 5%, 10%, 15%, 20% Poloxamer 188-Lösung** in einem 10ml Becherglas herstellen, am Magnetrührer bei Raumtemperatur lösen.
- 2) **Lipophile Phase:** 200mg PLGA (Poly-D,L-lactid-co-glykolid) in ein 10ml Becherglas einwiegen, 1g Ethylacetat und Magnetstäbchen hinzugeben, mit Parafilm verschließen und im Kühlschrank am Magnetrührer lösen.
- 3) **Stabilisierungsphase:** 50g 1% Poloxamer 188 Lösung herstellen, am Magnetrührer bei ca. 600UpM bei Raumtemperatur lösen.

Herstellung:

- 1) 200µl destilliertes Wasser (1. wässrige Phase) seitlich in die lipophile Phase einlaufen lassen und 60 Sekunden unter Kühlung im Wasserbad mit dem Ultraschallstab bei 70 Watt und 90% Intensität beschallen.
- 2) Die 2. wässrige Phase zügig seitlich einlaufen lassen und 50 Sekunden unter Kühlung mit dem Ultraschallstab bei 70 Watt und 90% Intensität beschallen.
- 3) Die Doppelemulsion rasch in die rührende Stabilisierungsphase kippen und weitere 60 Minuten bei ca. 600UpM am Magnetrührer rühren.
- 4) Das verbliebene Ethylacetat 30 Minuten bei 170UpM und Raumtemperatur bei 100mbar abrotieren.
- 5) Die Suspension durch ein Glasfaser Membranfilter (Millipore, Billerica, Ma, U.S.A.) mit 1,0µm Porenweite filtrieren.

Ergebnisse:

Tabelle 1: Abhängigkeit des Nanopartikeldurchmessers, Pdl und Zetapotentials von der Poloxamerkonzentration in der 2.wässrigen Phase (Charge 1-6).

Konzentration Poloxamer 188 (%)	Größe (nm)	Pdl	Zetapotential (mV)
1	194,00 ± 1,20	0,11 ± 0,02	-40,00 ± 0,50
2	170,00 ± 1,40	0,10 ± 0,02	-35,00 ± 0,25
5	137,00 ± 1,00	0,09 ± 0,01	-30,00 ± 1,80
10	79,00 ± 0,14	0,11 ± 0,01	-35,00 ± 2,32
15	80,00 ± 1,95	0,15 ± 0,01	-35,00 ± 2,02
20	-	-	-

Eine 20%ige Poloxamer 188-Lösung stellt eine übersättigte Lösung dar und trotz der Verlängerung der Rührzeit auf 90 Minuten konnte keine vollständige Lösung erreicht werden. NP, die mit 15%iger Poloxamer 188-Lösung als 2. wässriger Phase hergestellt wurden, ergaben zwar Partikel mit identer Größe und Ladung, jedoch einen höheren Polydispersitätsindex und eine geringere Stabilität verglichen mit der Standardkonzentration von 10% Poloxamer 188. Diese Partikel agglomerierten bereits zwei Wochen nach der Herstellung.

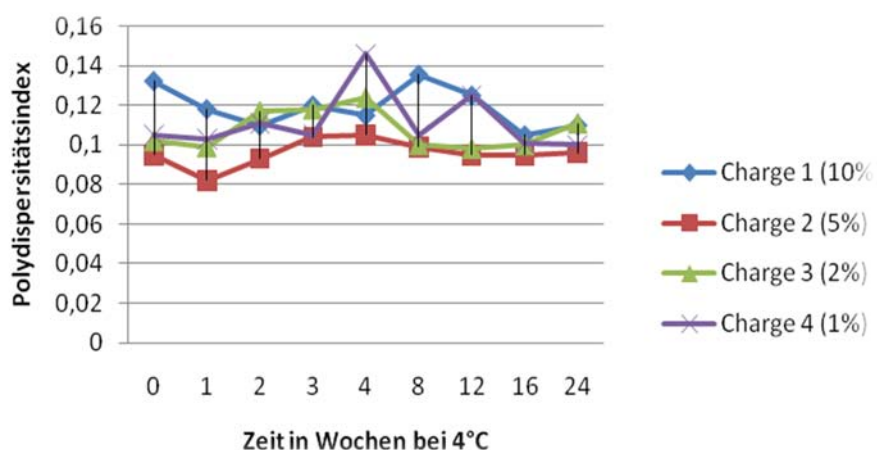


Abb.5: Lagerstabilität der Nanopartikelchargen 1-4 über sechs Monate bei 4°C.

Diskussion: Mit steigender Poloxamer 188-Konzentration in der 2. wässrigen Phase nimmt der Durchmesser der Nanopartikel ab. Bedingt durch die molekulare Struktur des Polymers Poloxamer 188 und die höhere Konzentration nimmt die Viskosität der Suspension zu und damit werden die nicht ausgehärteten „Nanotröpfchen“ stabilisiert, wodurch eine Koaleszenz zu größeren Emulsionströpfchen verhindert wird. Chargen 1-4 (1%, 2%, 5%, 10% Poloxamer in der 2. wässrigen Phase) sind sechs Monate stabil, da sich ihr Pdl nicht wesentlich verändert hat.

4.1.1b Variation der 2. wässrigen Phase – 0 - 1% Poloxamer 188-Lösung (Charge 7-13)

Lösungen, die vor der Partikelherstellung zu bereiten sind:

- 1) 2. wässrige Phase: 6g je **1%, 0,5%, 0,05%*, 0,1%, 0,05%, 0,01%, 0% Poloxamer 188- Lösung** in einem 10ml Becherglas herstellen, am Magnetrührer bei Raumtemperatur lösen.
- 2) Lipophile Phase: 400mg PLGA (Poly-D,L-lactid-co-glykolid) in ein 10ml Becherglas einwiegen, 2g Ethylacetat und Magnetstäbchen hinzugeben, mit Parafilm verschließen und im Kühlschrank am Magnetrührer lösen.
- 3) Stabilisierungsphase: 100g 1% Poloxamer 188 Lösung herstellen, am Magnetrührer bei ca. 600UpM bei Raumtemperatur lösen.

Herstellung:

- 1) 400µl destilliertes Wasser (1. wässrige Phase) seitlich in die lipophile Phase einlaufen lassen und 60 Sekunden unter Kühlung im Wasserbad mit dem Ultraschallstab bei 70 Watt und 90% Intensität beschallen.
- 2) Die 2. wässrige Phase zügig seitlich einlaufen lassen und 50 Sekunden unter Kühlung mit dem Ultraschallstab bei 70 Watt und 90% Intensität beschallen.
- 3) Die Doppelemulsion rasch in die rührende Stabilisierungsphase kippen und weitere 60 Minuten bei ca. 600UpM am Magnetrührer rühren.
- 4) Das verbliebene Ethylacetat 30 Minuten bei 170UpM und Raumtemperatur bei 100mbar abrotieren.

Spezieller Teil

5) Die Suspension durch ein Glasfaser Membranfilter (Millipore, Billerica, Ma, U.S.A.) mit 1,0µm Porenweite filtrieren.

*100sec statt 50sec Ultraschall

Ergebnisse:

Tabelle 2: Abhängigkeit des Nanopartikeldurchmessers, Pdl's und Zetapotentials von der Poloxamerkonzentration in der 2.wässrigen Phase (Charge 7-12).

Konzentration Poloxamer 188 (%)	Größe (nm)	Pdl	Zetapotential (mV)
1	195,00 ± 2,32	0,14 ± 0,01	-35,00 ± 0,61
0,5	250,00 ± 1,73	0,20 ± 0,01	-40,00 ± 0,35
0,1	354,00 ± 7,36	0,20 ± 0,32	-38,00 ± 0,26
0,05	300,00 ± 11,54	0,37 ± 0,24	-26,00 ± 3,52
0,05*	250,00 ± 4,29	0,37 ± 0,17	-28,00 ± 2,11
0,01	365,00 ± 5,70	0,26 ± 0,30	-31,00 ± 0,45
0	-	-	-

*100sec statt 50 sec Ultraschall

Diskussion:

Wie bereits im vorangegangenen Versuch beobachtet, bewirkt auch hier eine weitere Verminderung der Poloxamerkonzentration eine weitere Zunahme der Partikelgröße. Gleichzeitig nimmt auch der Polydispersitätsindex zu, was auf eine zunehmend heterogene Partikelgrößenverteilung hinweist. Insgesamt könnte die Konzentration des Tensids auf ein Zehntausendstel des Standardprotokolls reduziert werden bei gleichzeitiger Zunahme der Größe um einen Faktor 2,5. Zur Herstellung von NP ist jedoch eine Mindestmenge an Tensid unabdingbar, da PLGA ohne Tensidzusatz ausflockt. Eine Erhöhung der Beschalldauer bewirkt eine Verkleinerung der Partikel, wie die Parallelansätze mit 0,05%iger Poloxamer 188-Lösung zeigen.

Spezieller Teil

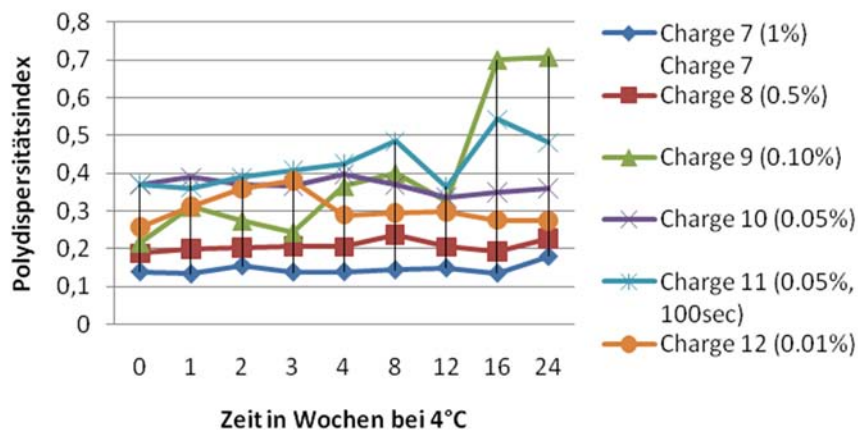


Abb.6: Lagerstabilität der Nanopartikelchargen 7-12 über sechs Monate bei 4°C.

Die Chargen 7,8,10,11 mit 1%, 0,5%, 0,05% und 0,01% Poloxamer 188 in der 2. wässrigen Phase waren aufgrund des konstanten PdIs sechs Monate stabil. Die Charge 9 mit 0,5% Poloxamer 188 in der 2. wässrigen Phase und einer Beschallungszeit von 100sec und Charge 12 mit 0,1% Poloxamer 188 in der 2. wässrigen Phase können als instabil bezeichnet werden, da ihr Pdl ab Woche 12 auf über 0,4 anstieg und dies eine zu breite Größenverteilung widerspiegelt.

4.1.1c Pluronic®L-62 als Tensid zur Herstellung von NP nach der Doppalemulsionsmethode (Charge 20, 20a)

Im Rahmen dieses Versuches sollte die Eignung des für pharmazeutische Zwecke zugelassenen Poloxamers Pluronic®L-62 für die Herstellung von PLGA-NP nach der Doppalemulsionsmethode überprüft werden. Dazu wurden Partikel mit der Standardansatzmenge nach dem Standardprotokoll hergestellt.

Herstellung von PLGA- Nanopartikeln nach der Doppalemulsionstechnik:

Lösungen, die vor der Partikelherstellung zu bereiten sind:

- 1) 2. wässrige Phase: 6g 10% **Pluronic®L-62** Lösung in einem 10ml Becherglas herstellen, am Magnetrührer bei Raumtemperatur lösen.
- 2) Lipophile Phase: 400mg PLGA (Poly-D,L-lactid-co-glykolid) in ein 10ml Becherglas einwiegen, 2g Ethylacetat und Magnetstäbchen hinzugeben, mit Parafilm verschließen und im Kühlschrank am Magnetrührer lösen.
- 3) Stabilisierungsphase: 100g 1% **Pluronic®L-62** Lösung herstellen, am Magnetrührer bei ca. 600UpM bei Raumtemperatur lösen.

Herstellung:

- 1) 400µl destilliertes Wasser (1. wässrige Phase) seitlich in die lipophile Phase einlaufen lassen und 60 Sekunden unter Kühlung im Wasserbad mit dem Ultraschallstab bei 70 Watt und 90% Intensität beschallen.
- 2) Die 2. wässrige Phase zügig seitlich einlaufen lassen und 50 Sekunden unter Kühlung mit dem Ultraschallstab bei 70 Watt und 90% Intensität beschallen.
- 3) Die Doppalemulsion rasch in die rührende Stabilisierungsphase kippen und weitere 60 Minuten bei ca. 600UpM am Magnetrührer rühren.
- 4) Das verbliebene Ethylacetat 30 Minuten bei 170UpM und Raumtemperatur bei 100mbar abrotieren.
- 5) Die Suspension durch ein Glasfaser Membranfilter (Millipore, Billerica, Ma, U.S.A.) mit 1,0µm Porenweite filtrieren.

Ergebnisse:

Tabelle3: Vergleich des Einflusses von Pluronic®L-62 und Pluronic®F68 auf Nanopartikelgröße, -größenverteilung und Zetapotential.

10%Pluronic® in der 2. wässrigen Phase	Größe (nm)	PdI	Zetapotential (mV)
Pluronic®L62	435,13 ± 55,00	0,43 ± 0,25	-25,20 ± 1,50
Pluronic®F68	105,00 ± 0,80	0,13 ± 0,01	-40,00 ± 2,67

Diskussion:

Pluronic® L-62 ist ein flüssiges, wasserlösliches Tensid mit einem 20%igen Anteil von Polyethylenglycol, einem HLB- Wert von 1-7 und ist wesentlich hydrophober als das bisher eingesetzte Pluronic® F-68, das einen Gehalt an hydrophilen Monomeren von 80% aufweist. Es ist eine farblose, klare Flüssigkeit, die sowohl bei Raumtemperatur als auch bei 35°C weniger schäumt als Pluronic® F-68. Aufgrund seiner geringen Wasserlöslichkeit verteilt sich das Tensid in die lipophile Phase, sodass kein Pluronic® L-62 an der Oberfläche der Nanotröpfchen zur Stabilisation zurückbleiben dürfte. So koaleszieren die PLGA-hältigen Tröpfchen und es entstehen NP mit einem mittleren Durchmesser von 435nm und einem Pdl von 0,4. Auch kleinere Probenvolumina, höhere und niedrigere Konzentrationen an Pluronic® L-62 und eine voluminösere 1. Wasserphase bewirkten keine Verbesserung des Pdl. Insgesamt ist daher Pluronic® L-62 für die Herstellung von PLGA-NP nach der Doppelemulsionsmethode nicht geeignet.

4.1.2 Variation der Stabilisierungsphase – 0% bzw. 1% Poloxamer 188 (Charge 1 und 13)

In diesem Versuch sollte die Auswirkung der Poloxamer 188-Konzentration in der Stabilisierungsphase auf die Charakteristik der PLGA-NP überprüft werden.

Es wurden wieder je zwei idente Chargen gleichzeitig hergestellt, damit die Reproduzierbarkeit bewiesen werden konnte. Bei **halbem Ansatz** und in **10ml Bechergläsern** wurde der Tensidanteil der Stabilisierungsphase auf 0% verringert:

Herstellung von PLGA- Nanosphären nach der Doppelemulsionstechnik: (Charge 13)

Lösungen, die vor der Partikelherstellung zu bereiten sind:

- 1) 2. wässrige Phase: 3g 10% Poloxamer 188 Lösung in einem 10ml Becherglas herstellen, am Magnetrührer bei Raumtemperatur lösen.
- 2) Lipophile Phase: 200mg PLGA (Poly-D,L-lactid-co-glykolid) in ein 10ml Becherglas einwiegen, 1g Ethylacetat und Magnetstäbchen hinzugeben, mit Parafilm verschließen und im Kühlschrank am Magnetrührer lösen.
- 3) Stabilisierungsphase: **50g destilliertes Wasser (0% Poloxamer 188)**, am Magnetrührer bei ca. 600UpM bei Raumtemperatur lösen.

Herstellung:

- 1) 200µl destilliertes Wasser (1. wässrige Phase) seitlich in die lipophile Phase einlaufen lassen und 60 Sekunden unter Kühlung im Wasserbad mit dem Ultraschallstab bei 70 Watt und 90% Intensität beschallen.
- 2) Die 2. wässrige Phase zügig seitlich einlaufen lassen und 50 Sekunden unter Kühlung mit dem Ultraschallstab bei 70 Watt und 90% Intensität beschallen.
- 3) Die Doppelemulsion rasch in die rührende Stabilisierungsphase kippen und weitere 60 Minuten bei ca. 600UpM am Magnetrührer rühren.

Spezieller Teil

- 5) Das verbliebene Ethylacetat 30 Minuten bei 170UpM und Raumtemperatur bei 100mbar abrotieren.
- 6) Die Suspension durch ein Glasfaser Membranfilter (Millipore, Billerica, Ma, U.S.A.) mit 1,0µm Porenweite filtrieren

Ergebnisse:

Tabelle 4: Abhängigkeit des Nanopartikeldurchmessers, Pdl's und Zetapotentials von der Poloxamer 188-Konzentration in der Stabilisierungsphase (Charge 1,13).

Konzentration Poloxamer 188 (%)	Größe (nm)	Pdl	Zetapotential (mV)
1	79,00 ± 0,14	0,11 ± 0,01	-35,00 ± 2,32
0	80,00 ± 0,60	0,10 ± 0,05	-35,00 ± 0,61

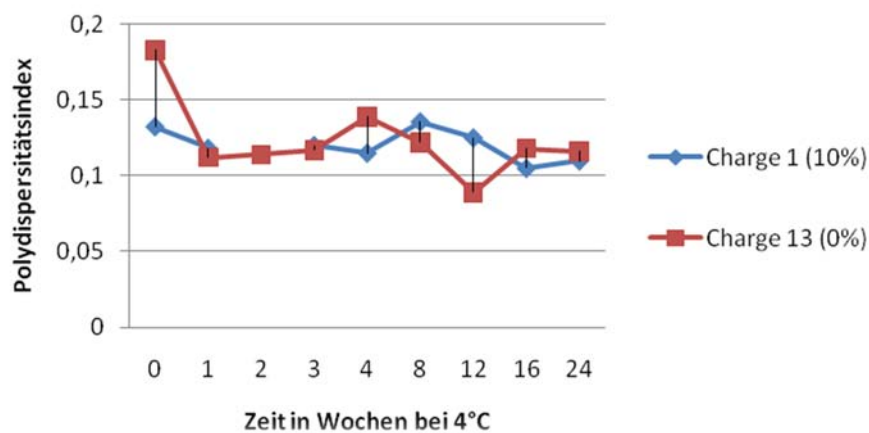


Abb.7: Stabilität der Nanopartikelchargen 1 und 13 nach Lagerung über sechs Monate bei 4°C.

Diskussion:

PLGA-NP, die mithilfe einer polymerfreien Stabilisierungsphase hergestellt wurden, zeigen keinen Unterschied in der Größe, Größenverteilung und Zetapotential zu jenen Partikeln, die mit Hilfe einer 1%igen Poloxamer 188-Lösung als Stabilisierungsphase hergestellt wurden. Auch die Lagerstabilität ist vergleichbar. Somit ist kein Tensid zur weiteren Stabilisierung der gebildeten Tröpfchen bei der Aushärtung notwendig.

4.1.3 Variation der lipophilen Phase – 0,7 – 1,2g Ethylacetat (Charge 14-18)

Diesmal wurde die Ethylacetatmenge in der lipophilen Phase variiert, um einen möglichen Einfluss auf die NP-Charakteristik zu überprüfen. Die Versuche wurden mit **halbem Ansatz** und in **10ml Bechergläsern** durchgeführt.

Herstellung von PLGA- Nanosphären nach der Doppalemulsionstechnik (Charge 14-18): Lösungen, die vor der Partikelherstellung zu bereiten sind:

- 1) 2. wässrige Phase: 3g 10% Poloxamer 188 Lösung in einem 10ml Becherglas herstellen, am Magnetrührer bei Raumtemperatur lösen.
- 2) Lipophile Phase: 200mg PLGA (Poly-D,L-lactid-co-glykolid) in ein 10ml Becherglas einwiegen, **1,2g, 1,0g, 0,9g , 0,8g , 0,7g Ethylacetat** und Magnetstäbchen hinzugeben, mit Parafilm verschließen und im Kühlschrank am Magnetrührer lösen.
- 3) Stabilisierungsphase: **50g destilliertes Wasser**, am Magnetrührer bei ca. 600UpM bei Raumtemperatur lösen.

Herstellung:

- 1) 200µl destilliertes Wasser (1. wässrige Phase) seitlich in die lipophile Phase einlaufen lassen und 60 Sekunden unter Kühlung im Wasserbad mit dem Ultraschallstab bei 70 Watt und 90% Intensität beschallen.
- 2) Die 2. wässrige Phase zügig seitlich einlaufen lassen und 50 Sekunden unter Kühlung mit dem Ultraschallstab bei 70 Watt und 90% Intensität beschallen.
- 3) Die Doppalemulsion rasch in die rührende Stabilisierungsphase kippen und weitere 60 Minuten bei ca. 600UpM am Magnetrührer rühren.

Spezieller Teil

- 4) Das verbliebene Ethylacetat 30 Minuten bei 170UpM und Raumtemperatur bei 100mbar abrotieren.
- 5) Die Suspension durch ein Glasfaser Membranfilter (Millipore, Billerica, Ma, U.S.A.) mit 1,0µm Porenweite filtrieren

Ergebnisse:

Tabelle 5: Einfluss der Ethylacetatmenge auf Durchmesser, Pdl und Zetapotential von PLGA-NP (Charge 14-18).

Ethylacetatmenge (g)	Größe (nm)	Pdl	Zetapotential (mV)
1,2	55,00 ± 0,60	0,15 ± 0,16	-30,00 ± 1,50
1,0	80,00 ± 0,14	0,10 ± 0,01	-35,00 ± 2,32
0,9	160,00 ± 1,20	0,15 ± 0,01	-40,00 ± 0,45
0,8	240,00 ± 1,55	0,17 ± 0,01	-45,00 ± 1,89
0,7	230,00 ± 2,15	0,25 ± 0,01	-45,00 ± 1,31

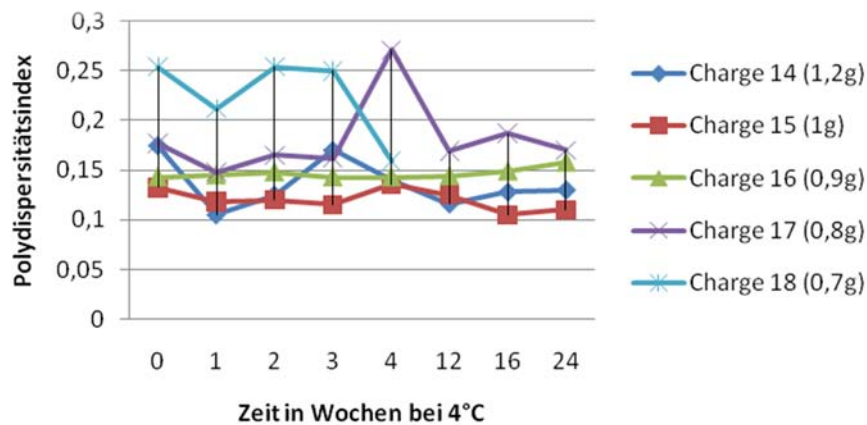


Abb.8: Lagerstabilität der Nanopartikelchargen 14-18 über sechs Monate bei 4°C.

Diskussion:

Mit zunehmendem Volumen und damit Menge an Ethylacetat nimmt die Partikelgröße ab. Bei gleichbleibender Polymermenge liegt mit zunehmendem Volumen der lipophilen Phase immer weniger Matrixmaterial vor, sodass beim Aushärten der „Nanotröpfchen“ zum Feststoff kleinere Nanopartikel entstehen. Zusätzlich besteht ein indirekt proportionaler Zusammenhang zwischen Volumen an lipophiler Phase und Zetapotential, der möglicherweise auf den erhöhten Gehalt an carboxyliertem PLGA an der Oberfläche größerer Partikel beruhen könnte.

Die Stabilitätsuntersuchungen ergaben, dass 0,7g Ethylacetat bei halber Gesamtansatzmenge die untere Grenze für die Anwendbarkeit von PLGA-NP darstellen dürfte, da die NP der beiden Parallel-Chargen nach 2 bzw. 3 Wochen Lagerung bei 4°C aggregiert sind. Die Stabilität der übrigen Chargen wurde über sechs Monate untersucht und beweist die Lagerstabilität dieser Partikel, da sich der PDI kaum änderte.

4.1.4 Variation der Chargengröße – 0,5 - bis dreifach (Charge 19-22):

Im Laufe der Untersuchungen von unterschiedlichsten Modifikationen zur Herstellung von Nanopartikeln stellte sich heraus, dass die Ansatzgröße direkt proportional zum Durchmesser der Nanopartikel ist. Außerdem zeigte sich, dass auch die Becherglasgröße bzw. dessen Durchmesser einen Einfluss auf die Partikelgröße ausübt. Somit dürfte die resultierende unterschiedliche Füllhöhe des Becherglases bei der Beschallung die NP-Charakteristik beeinflussen.

Herstellung von PLGA- Nanopartikeln nach der Doppalemulsionstechnik

(Charge 19-22)

Lösungen, die vor der Partikelherstellung zu bereiten sind:

- 1) 2. wässrige Phase: **3g/6g/9g/12g/18g 10% 10% Poloxamer 188** Lösung in einem 15ml Becherglas mit einem Durchmesser von 25mm herstellen, am Magnetrührer bei Raumtemperatur lösen.
- 2) Lipophile Phase: **200mg/400mg/600mg/800mg/1200mg PLGA** PLGA (Poly-D,L-lactid-co-glykolid) in ein 15ml Becherglas mit einem Durchmesser von 25mm einwiegen, **1g/2g/3g/4g/6g Ethylacetat** und Magnetstäbchen hinzugeben, mit Parafilm verschließen und im Kühlschrank am Magnetrührer lösen.
- 3) Stabilisierungsphase: **50g/100g/150g/200g/300g 1% Poloxamer 188 Lösung**, am Magnetrührer bei ca. 600UpM bei Raumtemperatur lösen.

Herstellung:

- 1) **200µl/400µl/600µl/800µl/1200µl destilliertes Wasser** (1. wässrige Phase) seitlich in die lipophile Phase einlaufen lassen und 60 Sekunden unter Kühlung im Wasserbad mit dem Ultraschallstab bei 70 Watt und 90% Intensität beschallen.
- 2) Die 2. wässrige Phase zügig seitlich einlaufen lassen und 50 Sekunden unter Kühlung mit dem Ultraschallstab bei 70 Watt und 90% Intensität beschallen.
- 3) Die Doppalemulsion rasch in die rührende Stabilisierungsphase kippen und weitere 60 Minuten bei ca. 600UpM am Magnetrührer rühren.
- 4) Das verbliebene Ethylacetat 30 Minuten bei 170UpM und Raumtemperatur bei 100mbar abrotieren.
- 5) Die Suspension durch ein Glasfaser Membranfilter (Millipore, Billerica, Ma, U.S.A.) mit 1,0µm Porenweite filtrieren

Spezieller Teil

Die **halbe Menge** entspricht 50g 1. wässrige Phase, 3g 2.wässrige Phase, 1g Ethylacetat in der lipophilen Phase, alle weiteren Mengen sind ebenfalls halbiert.

Die **einfache Menge** entspricht 100g 1. wässrige Phase, 6g 2.wässrige Phase, 2g Ethylacetat in der lipophilen Phase, alle weiteren Mengen sind einfach vorhanden.

Die **eineinhalbfache Menge** entspricht 150g 1. wässrige Phase, 9g 2. wässrige Phase, 3g Ethylacetat in der lipophilen Phase, alle weiteren Mengen sind im gleichen Verhältnis anzusehen.

Die **zweifache Menge** entspricht 200g 1. wässrige Phase, 12g 2.wässrige Phase, 4g Ethylacetat in der lipophilen Phase, alle weiteren Mengen sind auch verdoppelt.

Die **dreifache Menge** entspricht 300g 1. wässrige Phase, 18g 2.wässrige Phase, 6g Ethylacetat in der lipophilen Phase, die übrigen Mengen sind dreifach.

Ergebnisse:

Tabelle 6: Abhängigkeit des Nanopartikeldurchmessers, Pdl und Zetapotentials von der Chargengröße bei einheitlicher Becherglasgröße mit konstantem Durchmesser (15ml, Durchmesser 25mm; Charge 19-22).

Chargengröße	Größe (nm)	Pdl	Zetapotential (mV)
0,5x	90,00 ± 0,68	0,12 ± 0,01	-40,00 ± 0,61
1x	105,00 ± 0,80	0,13 ± 0,01	-40,00 ± 2,67
2x	140,00 ± 1,82	0,13 ± 0,02	-40,00 ± 2,60
3x	200,00 ± 2,28	0,20 ± 0,02	-45,00 ± 1,20

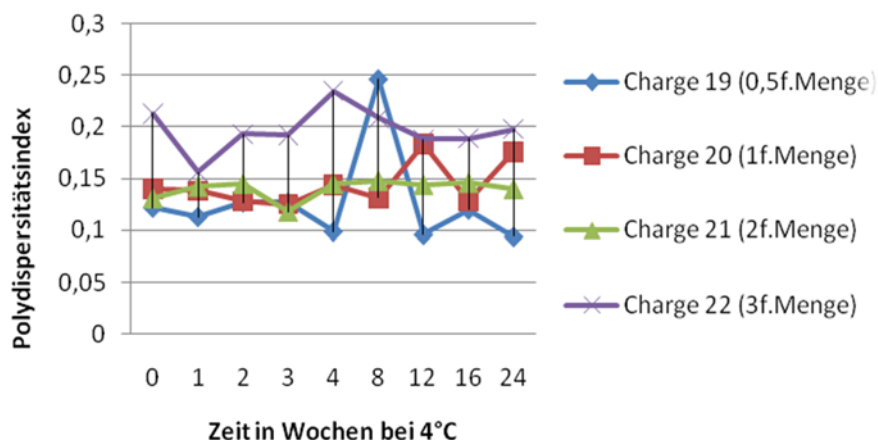


Abb.9: Lagerstabilität der Nanopartikelchargen 19-22 über sechs Monate bei 4°C.

Spezieller Teil

Bei der Nanopartikelherstellung mit halbem, einfachem und eineinhalbfachen Ansatz wurden **unterschiedliche Bechergläser**, je nach Ansatzmenge mit **10ml** bzw. **20ml** Fassungsvermögen, verwendet.

Tabelle 7: Abhängigkeit des Nanopartikeldurchmessers, Pdl und Zetapotentials von der Chargengröße bei unterschiedlicher Becherglasgröße (Charge 23-25).

Chargengröße	Becherglas	Größe (nm)	Pdl	Zetapotential (mV)
0,5-fache. Menge	10ml	75,00 ± 1,10	0,12 ± 0,02	-35,00 ± 1,95
einfache. Menge	20ml	130,00 ± 0,85	0,12 ± 0,12	-40,00 ± 1,60
1,5-fache Menge	20ml	145,00 ± 0,92	0,15 ± 0,01	-45,00 ± 0,18

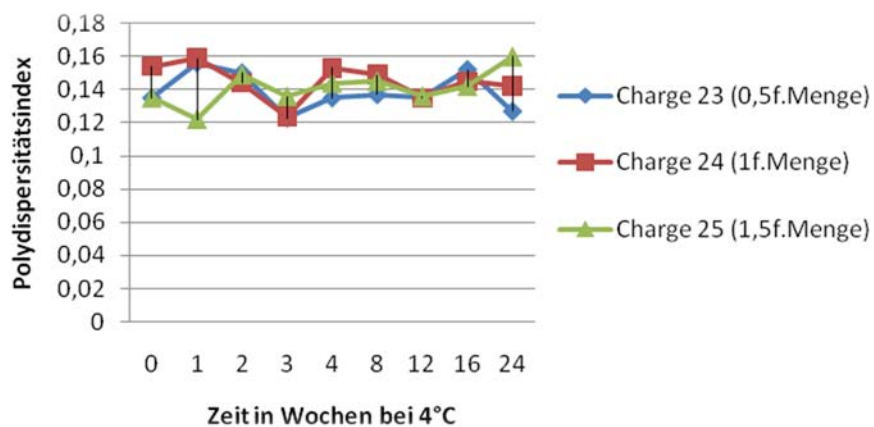


Abb.10: Lagerstabilität der Nanopartikelchargen 23-25 über sechs Monate bei 4°C

Diskussion:

Mit steigendem Gesamtvolumen der Charge nimmt die Partikelgröße nahezu linear zu. Bei konstantem Becherglasdurchmesser mit gleichbleibender Flüssigkeitsoberfläche, jedoch 1,5 fachem Gesamtvolumen nimmt die Partikelgröße um nur etwa 15nm zu, zusätzlich steigt mit zunehmendem Partikeldurchmesser auch der Polydispersitätsindex und das Zetapotential. Je kleiner das Volumen der zu beschallenden Phasen ist, desto kleiner sind die luftfreien Kügelchen und demnach auch die Nanotröpfchen, die durch Implosion entstehen. Nach der Aushärtung resultieren dann auch kleinere Nanopartikel.

Die Partikel aller unterschiedlichen Chargengrößen sind ebenfalls 6 Monate lagerstabil bei 4°C.

4.1.5 Variation der Dispergiermethode - Ultraturrax und Ultraschall (Charge 26-28 und 29-32)

Hier wurde der Einfluss der Art und damit auch der Intensität des Energieeintrages mittels Sonotrode bzw. Ultraturrax auf die Nanopartikelherstellung untersucht. Sowohl Dauer als auch Intensität der Energie wurden variiert. Die 2.wässrige Phase enthielt entweder 5% oder 15% Poloxamer 188.

Herstellung von PLGA-Nanopartikeln nach der Doppelemulsionstechnik (Charge 26-28 und 29-32)

Lösungen, die vor der Partikelherstellung zu bereiten sind:

- 1) 2. wässrige Phase: 6g **5%/15% Poloxamer 188 Lösung** in einem 10ml Becherglas herstellen, am Magnetrührer bei Raumtemperatur lösen.
- 2) Lipophile Phase: 400mg PLGA (Poly-D,L-lactid-co-glykolid) in ein 10ml Becherglas einwiegen, 2g Ethylacetat und Magnetstäbchen hinzugeben, mit Parafilm verschließen und im Kühlschrank am Magnetrührer lösen.
- 3) Stabilisierungsphase: 100g 1% Poloxamer 188 Lösung herstellen, am Magnetrührer bei ca. 600UpM bei Raumtemperatur lösen.

Herstellung:

- 1) 400µl destilliertes Wasser (1. wässrige Phase) seitlich in die lipophile Phase einlaufen lassen und 60 Sekunden unter Kühlung im Wasserbad mit dem Ultraschallstab bei 70 Watt und 90% Intensität beschallen.
- 1) 2) Die 2. wässrige Phase zügig seitlich einlaufen lassen und **1min/8min** unter Kühlung **Energieeintrag mittels Ultraturrax (Stufe 1/3/6)**.
- 3) Die Doppelemulsion rasch in die rührende Stabilisierungsphase kippen und weitere 60 Minuten bei ca. 600UpM am Magnetrührer rühren.
- 4) Das verbliebene Ethylacetat 30 Minuten bei 170UpM und Raumtemperatur bei 100mbar abrotieren.
- 5) Die Suspension durch ein Glasfaser Membranfilter (Millipore, Billerica, Ma, U.S.A.) mit 1,0µm Porenweite filtrieren.

Ergebnisse:

Tabelle 7: Abhängigkeit des Nanopartikeldurchmessers, Pdl und Zetapotentials von der Dauer und Intensität des Energieeintrags mittels Ultraturrax bei der Herstellung der Doppelemulsion (5% Poloxamer 188 in der 2.wässrigen Phase; Charge 26-28)

Dauer und Intensität des Energieeintrags	Größe (nm)	Pdl	Zetapotential (mV)
8min, Stufe 1	430,00 ± 101,80	0,45 ± 0,10	-30,00 ± 2,28
1min, Stufe 3	350,00 ± 29,06	0,30 ± 0,02	-35,00 ± 3,01
1min, Stufe 6	350,00 ± 32,95	0,30 ± 0,12	-35,00 ± 1,89

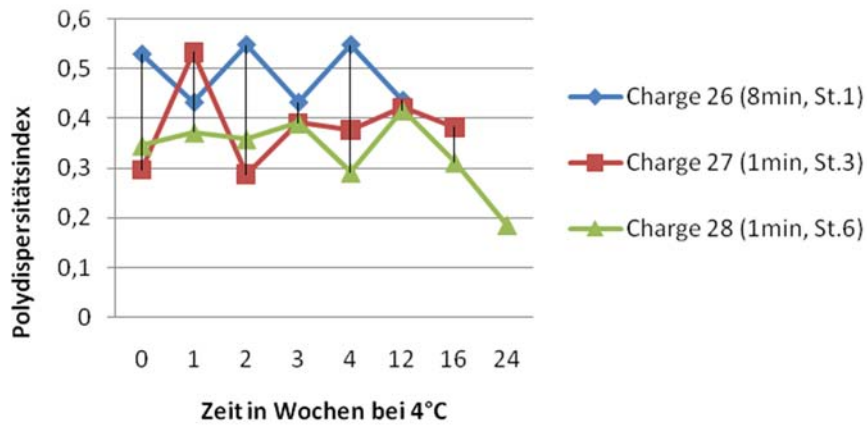


Abb.11: Lagerstabilität der Nanopartikelchargen 26-28 über sechs Monate bei 4°C.

Spezieller Teil

Tabelle 8: Abhängigkeit des Nanopartikeldurchmessers, Pdl's und Zetapotentials von der Dauer und Intensität des Energieeintrages mittels Ultraturrax bei der Herstellung der Doppelemulsion (15% Poloxamer 188 in der 2.wässrigen Phase; Charge 29-32).

Dauer und Intensität des Energieeintrags	Größe (nm)	Pdl	Zetapotential (mV)
1min, Stufe 6	300,00 ± 2,48	0,15 ± 0,01	-40,00 ± 0,96
3min, Stufe 6	240,00 ± 2,21	0,14 ± 0,02	-38,00 ± 1,59
3min, Stufe 5	250,00 ± 0,91	0,14 ± 0,02	-38,00 ± 1,21
3min, Stufe 4	420,00 ± 7,46	0,18 ± 0,02	-40,00 ± 0,68
3min, Stufe 3	550,00 ± 19,71	0,15 ± 0,065	-48,00 ± 0,50

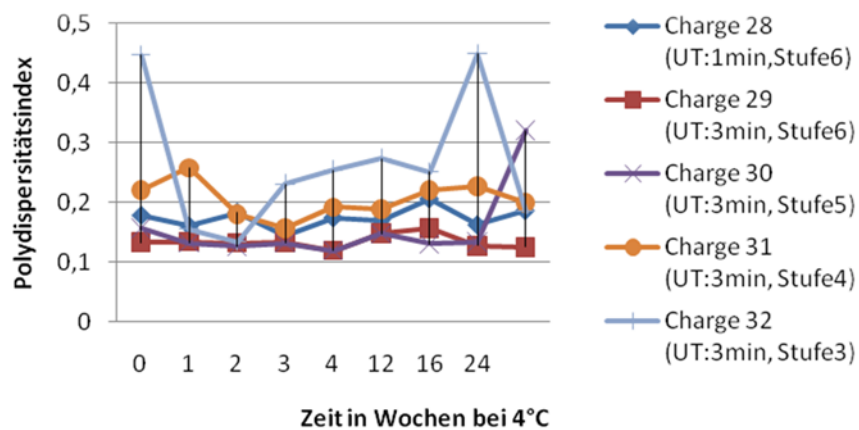


Abb.12: Lagerstabilität der Nanopartikelchargen 28-32 über sechs Monate bei 4°C.

Diskussion:

Wie die Ergebnisse zeigen, bestimmt die Intensität des Energieeintrages den Dispergierungsgrad und das Volumen der „Nanotröpfchen“ in der Doppelemulsion und damit ganz wesentlich die Größe der NP. Während mit Hilfe von Ultraschall NP mit einem mittleren Durchmesser von 140 nm (5% Poloxamer 188) bzw. 80 nm (15% Poloxamer 188) entstehen, werden mit dem Ultraturrax zum Dispergieren Partikel mit einem mittleren Durchmesser von 350 – 430nm (5% Poloxamer 188) bzw. 240 - 550nm (15% Poloxamer 188) gebildet.

Ein Vergleich der eingesetzten Poloxamer 188 Konzentrationen in der 2. wässrigen Phase zeigt, dass eine 15%ige Lösung einer 5%igen Lösung vorzuziehen ist, da die Partikelgrößen innerhalb einer Charge wesentlich homogener verteilt sind. Wie bereits oben beobachtet, besitzt die Viskosität und damit die Konzentration der Poloxamerlösung einen Einfluss auf die sterische Stabilisierung der Nanotröpfchen, sodass die resultierenden NP trotz vergleichbarem Energieeintrag bei Verwendung einer 15%igen Tensidlösung um 50nm kleiner sind als bei Einsatz einer 5%igen Lösung. Zusätzlich bewirkt bei vergleichbarem Energieeintrag die höhere Poloxamermenge eine Halbierung des Pdl und somit eine 50%ige Zunahme der Homogenität der Größenverteilung. Das Zetapotential der NP mit höherer Tensidkonzentration nimmt ebenfalls um 5mV ab, was eine geringfügige Zunahme der Stabilität bedeuten könnte. Sowohl die Dauer als auch die Intensität des Energieeintrages mittels Ultraturrax beeinflussen nicht nur Größe sondern auch Stabilität der NP. Je geringer der Energieeintrag, desto größer und instabiler sind die Partikel. NP, die mit den Intensitätsstufen 3 und 4 des Ultraturrax hergestellt wurden, sind lagerinstabil, während mit Intensitätsstufe 5 und 6 hergestellte Doppelemulsionen lagerstabile NP ergeben.

Insgesamt können jedoch durch geringeren Energieeintrag reproduzierbar „große NP“ im Bereich von 250 – 550nm hergestellt werden, die im Vergleich mit ihren kleineren Pendanten im Bereich von etwa 80 – 180nm deutlich unterschiedliche biopharmazeutische Eigenschaften erwarten lassen.

4.1.6 Variation der zweiten wässrigen Phase – Polyethylenglykol (Charge 33-46)

Neben dem nichtionogenen Tensid Poloxamer 188 sollte auch Polyethylenglykol als möglicher Stabilisator für PLGA-NP untersucht werden. Insbesondere im Hinblick auf den sogenannten „Tarnkappen-Effekt“ von Polyethylenglykol, der eine vorzeitige Inaktivierung von NP durch Makrophagen verhindert, ist die Verwendung als Stabilisator und damit die mögliche irreversible Anlagerung von Polyethylenglykol an der Partikeloberfläche von großem Interesse. Da Polyethylenglycole aufgrund ihrer Struktur bestenfalls als sterische Stabilisatoren und nicht als Tenside fungieren können, ist ein Minimum von 1% Poloxamer 188 in der 2. wässrigen Phase notwendig, um die Bildung einer Doppelemulsion zu ermöglichen. Wie Vorversuche ergaben, flockt PLGA in Abwesenheit von Poloxamer 188 aus und ist in der wässrigen Phase nicht dispergierbar.

Im Rahmen der folgenden Versuche sollte einerseits die Eignung unterschiedlicher Polymerisationsgrade von PEG - Polyethylenglykol 200/2000/4000/8000 – für die Partikelherstellung, aber auch der Einfluss auf die Charakteristika der entstandenen NP untersucht werden.

4.1.5.1 Herstellung von PLGA- Nanopartikeln nach der Doppelemulsionstechnik mit 1% PEG 200 bzw. 2000/1% Poloxamer 188 in der 2.wässrigen Phase (Charge 33,34):

Lösungen, die vor der Partikelherstellung zu bereiten sind:

- 1) 2. wässrige Phase: 6g **1% PEG200/PEG2000/1% Poloxamer 188 Lösung** in einem 10ml Becherglas herstellen, am Magnetrührer bei Raumtemperatur lösen.
- 2) Lipophile Phase: 400mg PLGA (Poly-D,L-lactid-co-glykolid) in ein 10ml Becherglas einwiegen, 2g Ethylacetat und Magnetstäbchen hinzugeben, mit Parafilm verschließen und im Kühlschrank am Magnetrührer lösen.
- 3) Stabilisierungsphase: 100g 1% Poloxamer 188 Lösung herstellen, am Magnetrührer bei ca. 600UpM bei Raumtemperatur lösen.

Herstellung:

- 1) 400µl destilliertes Wasser (1. wässrige Phase) seitlich in die lipophile Phase einlaufen lassen und 60 Sekunden unter Kühlung im Wasserbad mit dem Ultraschallstab bei 70 Watt und 90% Intensität beschallen.
- 2) Die 2. wässrige Phase zügig seitlich einlaufen lassen und 50 Sekunden unter Kühlung mit dem Ultraschallstab bei 70 Watt und 90% Intensität beschallen.
- 3) Die Doppelemulsion rasch in die rührende Stabilisierungsphase kippen und weitere 60 Minuten bei ca. 600UpM am Magnetrührer rühren.
- 4) Das verbliebene Ethylacetat 30 Minuten bei 170UpM und Raumtemperatur bei 100mbar abrotieren.
- 5) Die Suspension durch ein Glasfaser Membranfilter (Millipore, Billerica, Ma, U.S.A.) mit 1,0µm Porenweite filtrieren.

Ergebnisse:

Tabelle 9: Abhängigkeit des Nanopartikeldurchmessers, Pdl und Zetapotentials von der Polyethylenglycolart (1% PEG200/PEG2000/1% Poloxamer 188 in der 2. wässrigen Phase; Charge 33, 34)

1% PEG/ 1% Poloxamer 188, in der 2. wässrigen Phase	Größe (nm)	Pdl	Zetapotential (mV)
PEG200	195,00 ± 1,64	0,12 ± 0,01	-45 ± 1,21
PEG2000	195,00 ± 2,43	0,13 ± 0,03	-40 ± 4,63

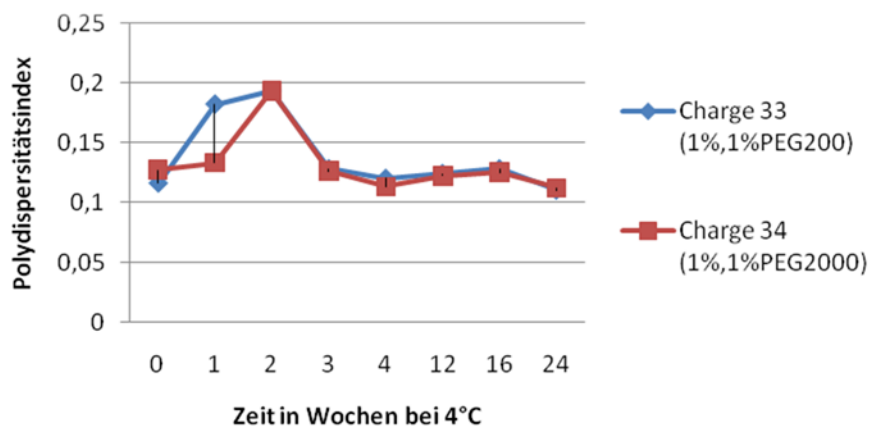


Abb 13: Lagerstabilität der Nanopartikelchargen 33,34 über sechs Monate bei 4°C

Diskussion: Da der Einsatz einer 1% PEG200 bzw. PEG2000/ 1% Poloxamer 188 Lösung als zweite wässrigen Phase bei der Doppelemulsionstechnik Partikel mit identer Größe und vergleichbarem PDI ergab, kann eine Abhängigkeit des Ausmaßes der Stabilisierung vom Polymerisationsgrad des PEG ausgeschlossen werden.

4.1.5.2 Herstellung von PLGA- Nanopartikeln nach der Doppelemulsionstechnik mit Polyethylenglycol unterschiedlicher Molmasse als Komponente der 2.wässrigen Phase (10% PEG; Charge 35-38):

Lösungen, die vor der Partikelherstellung zu bereiten sind:

- 1) 2. wässrige Phase: 6g **10% PEG200/PEG2000/PEG4000/PEG8000/1% Poloxamer 188 Lösung** in einem 10ml Becherglas herstellen, am Magnetrührer bei Raumtemperatur lösen.
- 2) Lipophile Phase: 400mg PLGA (Poly-D,L-lactid-co-glykolid) in ein 10ml Becherglas einwiegen, 2g Ethylacetat und Magnetstäbchen hinzugeben, mit Parafilm verschließen und im Kühlschrank am Magnetrührer lösen.
- 3) Stabilisierungsphase: 100g 1% Poloxamer 188 Lösung herstellen, am Magnetrührer bei ca. 600UpM bei Raumtemperatur lösen.

Herstellung:

- 1) 400µl destilliertes Wasser (1. wässrige Phase) seitlich in die lipophile Phase einlaufen lassen und 60 Sekunden unter Kühlung im Wasserbad mit dem Ultraschallstab bei 70 Watt und 90% Intensität beschallen.
- 2) Die 2. wässrige Phase zügig seitlich einlaufen lassen und 50 Sekunden unter Kühlung mit dem Ultraschallstab bei 70 Watt und 90% Intensität beschallen.
- 3) Die Doppelemulsion rasch in die rührende Stabilisierungsphase kippen und weitere 60 Minuten bei ca. 600UpM am Magnetrührer rühren.
- 4) Das verbliebene Ethylacetat 30 Minuten bei 170UpM und Raumtemperatur bei 100mbar abrotieren.
- 5) Die Suspension durch ein Glasfaser Membranfilter (Millipore, Billerica, Ma, U.S.A.) mit 1,0µm Porenweite filtrieren.

Spezieller Teil

Ergebnisse:

Tabelle 9: Abhängigkeit des Nanopartikeldurchmessers, Pdl und Zetapotentials vom Polymerisationsgrad und Konzentration von PEG (10% PEG200/PEG2000/PEG4000/PEG8000 1% Poloxamer 188 in der 2. wässrigen Phase; Charge 35-38).

10%PEG, 1% Poloxamer 188, in der 2. wässrigen Phase	Größe (nm)	Pdl	Zetapotential (mV)
PEG200	180,00 ± 1,66	0,10 ± 0,01	-40,00 ± 0,70
PEG2000	175,00 ± 1,90	0,10 ± 0,03	-45,00 ± 0,81
PEG4000	175,00 ± 1,30	0,10 ± 0,02	-40,00 ± 0,36
PEG8000	165,00 ± 1,25	0,10 ± 0,01	-40,00 ± 1,41

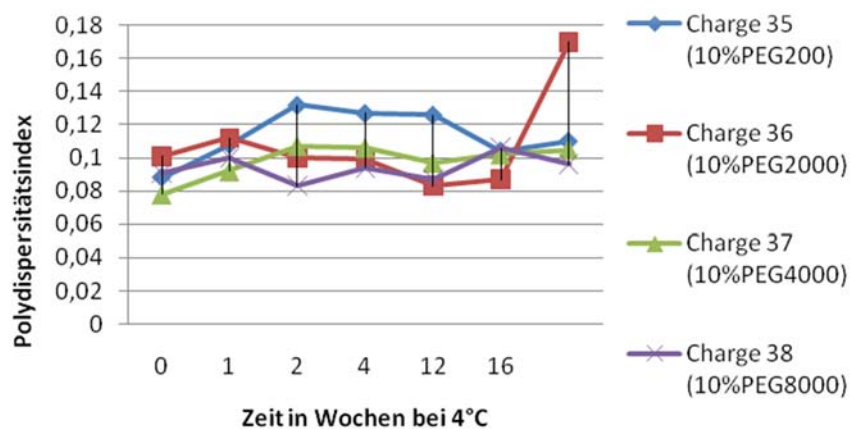


Abb 14: Lagerstabilität der Nanopartikelchargen 35-38 über sechs Monaten bei 4°C

Diskussion:

Wie die in Tabelle 9 dargestellten Werte zeigen, nimmt der Partikeldurchmesser mit zunehmendem Polymerisationsgrad von PEG geringfügig ab, was auf eine zunehmende sterische Stabilisierung durch die erhöhte Viskosität von PEG mit höherer Molmasse hinweist. Der Unterschied beträgt insgesamt jedoch nur 15nm bei vergleichbarem PDI und Zetapotential. Das mit -40mV bestimmte Zetapotential ist mit dem von NP vergleichbar, die nur mit Poloxamer 188 hergestellt wurden. Daher dürfte kein ladungsabschirmender Effekt vorliegen, der Voraussetzung für den „Tarnkappen-Effekt“ von PEG ist. Die Partikel weisen jedoch einen sehr konstanten PDI nach Lagerung über sechs Monate auf und können somit als stabil bezeichnet werden.

4.1.5.3 Herstellung von PLGA- Nanopartikeln nach der Doppelemulsionstechnik mit Polyethylenglycol unterschiedlicher Molmasse in der 2.wässrigen Phase (15% PEG; Charge 39-42):

Lösungen, die vor der Partikelherstellung zu bereiten sind:

- 1) 2. wässrige Phase: 6g **15% PEG200/PEG2000/PEG4000/PEG8000/1% Poloxamer 188 Lösung** in einem 10ml Becherglas herstellen, am Magnetrührer bei Raumtemperatur lösen.
- 2) Lipophile Phase: 400mg PLGA (Poly-D,L-lactid-co-glykolid) in ein 10ml Becherglas einwiegen, 2g Ethylacetat und Magnetstäbchen hinzugeben, mit Parafilm verschließen und im Kühlschrank am Magnetrührer lösen.
- 3) Stabilisierungsphase: 100g 1% Poloxamer 188 Lösung herstellen, am Magnetrührer bei ca. 600UpM bei Raumtemperatur lösen.

Herstellung:

- 1) 400µl destilliertes Wasser (1. wässrige Phase) seitlich in die lipophile Phase einlaufen lassen und 60 Sekunden unter Kühlung im Wasserbad mit dem Ultraschallstab bei 70 Watt und 90% Intensität beschallen.
- 2) Die 2. wässrige Phase zügig seitlich einlaufen lassen und 50 Sekunden unter Kühlung mit dem Ultraschallstab bei 70 Watt und 90% Intensität beschallen.
- 3) Die Doppelemulsion rasch in die rührende Stabilisierungsphase kippen und weitere 60 Minuten bei ca. 600UpM am Magnetrührer rühren.
- 4) Das verbliebene Ethylacetat 30 Minuten bei 170UpM und Raumtemperatur bei 100mbar abrotieren.
- 5) Die Suspension durch ein Glasfaser Membranfilter (Millipore, Billerica, Ma, U.S.A.) mit 1,0µm Porenweite filtrieren.

Ergebnisse:

Tabelle 10: Abhängigkeit des Nanopartikeldurchmessers, Pdl und Zetapotentials von der Polyethylenglykolkonzentration der 2.wässrigen Phase (15% PEG200/PEG2000/PEG4000/PEG8000/1% Poloxamer 188 in der 2. wässrigen Phase; Charge 39-42).

15%PEG, 1% Poloxamer 188 in der 2. wässrigen Phase	Größe (nm)	Pdl	Zetapotential (mV)
PEG200	175,00 ± 0,55	0,10 ± 0,01	-45,00 ± 0,59
PEG2000	160,00 ± 1,15	0,10 ± 0,02	-45,00 ± 083
PEG4000	160,00 ± 1,15	0,10 ± 0,02	-35,00 ± 0,83
PEG8000	180,00 ± 0,66	0,15 ± 0,01	-50,00 ± 141,00

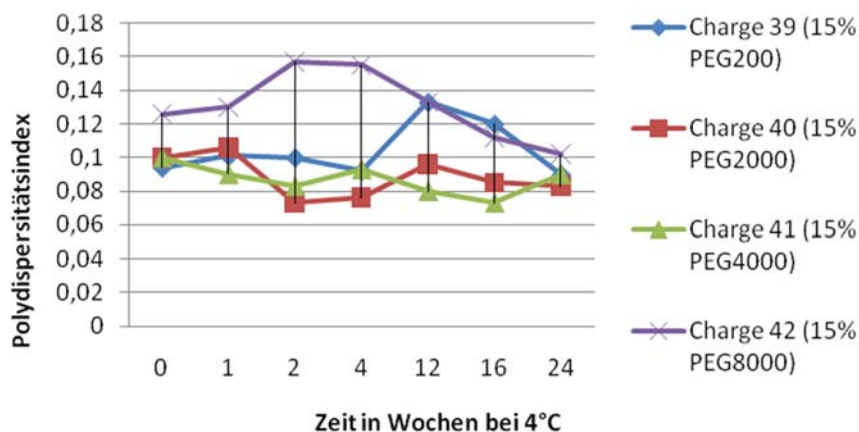


Abb 15: Lagerstabilität der Nanopartikelchargen 39-42 über sechs Monate bei 4°C.

Diskussion:

Während im vorhergehenden Versuch eine geringe Abhängigkeit der NP-Größe von der Kettenlänge beobachtet wurde, zeigt diese Versuchsreihe mit einer von 10% auf 15% erhöhten PEG-Konzentration keinen derartigen Einfluss. Ebenso sind die weiteren Partikelcharakteristika wie PDI und Zetapotential vergleichbar, sodass ein Ladungs-abschirmender Effekt durch eine erhöhte PEG-Konzentration nicht gegeben sein dürfte. Auch die Partikel der Chargen 39-42 waren sechs Monate stabil, da sie einen sehr konstanten Pdl aufwiesen.

4.1.5.4 Herstellung von PLGA- Nanopartikeln nach der Doppelemulsionstechnik mit Polyethylenglycol in der 2.wässrigen Phase (20%; Charge 44,45):

Lösungen, die vor der Partikelherstellung zu bereiten sind:

- 1) 2. wässrige Phase: 6g **20% PEG2000/PEG8000/1% Poloxamer 188 Lösung** in einem 10ml Becherglas herstellen, am Magnetrührer bei Raumtemperatur lösen.
- 2) Lipophile Phase: 400mg PLGA (Poly-D,L-lactid-co-glykolid) in ein 10ml Becherglas einwiegen, 2g Ethylacetat und Magnetstäbchen hinzugeben, mit Parafilm verschließen und im Kühlschrank am Magnetrührer lösen.
- 3) Stabilisierungsphase: 100g 1% Poloxamer 188 Lösung herstellen, am Magnetrührer bei ca. 600UpM bei Raumtemperatur lösen.

Herstellung:

- 1) 400µl destilliertes Wasser (1. wässrige Phase) seitlich in die lipophile Phase einlaufen lassen und 60 Sekunden unter Kühlung im Wasserbad mit dem Ultraschallstab bei 70 Watt und 90% Intensität beschallen.
- 2) Die 2. wässrige Phase zügig seitlich einlaufen lassen und 50 Sekunden unter Kühlung mit dem Ultraschallstab bei 70 Watt und 90% Intensität beschallen.
- 3) Die Doppelemulsion rasch in die rührende Stabilisierungsphase kippen und weitere 60 Minuten bei ca. 600UpM am Magnetrührer rühren.
- 4) Das verbliebene Ethylacetat 30 Minuten bei 170UpM und Raumtemperatur bei 100mbar abrotieren.
- 5) Die Suspension durch ein Glasfaser Membranfilter (Millipore, Billerica, Ma, U.S.A.) mit 1,0µm Porenweite filtrieren.

Ergebnisse:

Tabelle 11: Abhängigkeit des Nanopartikeldurchmessers, Pdl und Zetapotentials von der Polyethylenglykolkonzentration der 2.wässrigen Phase (20% PEG2000/PEG8000/1% Poloxamer 188 in der 2. wässrigen Phase; Charge 44, 45).

20%PEG, 1% Poloxamer 188, in der 2. wässrigen Phase	Größe (nm)	Pdl	Zetapotential I (mV)
2000	170,00 ± 1,15	0,10 ± 0,02	-43,00 ± 0,78
8000	200,00 ± 1,15	0,22 ± 0,02	-42,00 ± 0,82

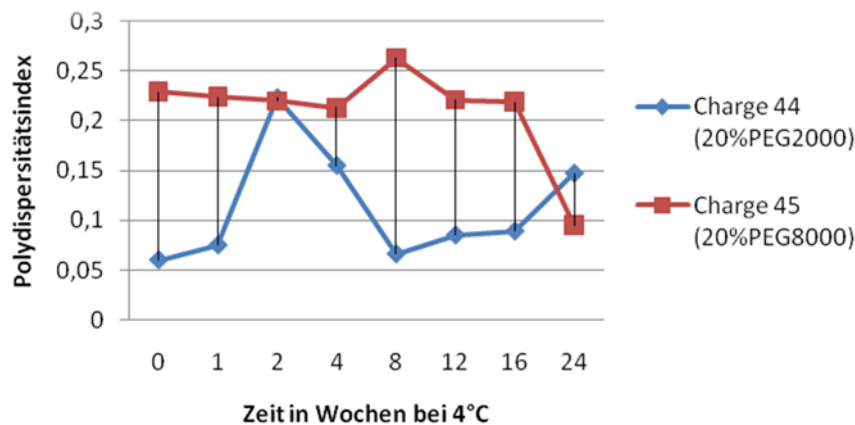


Abb 16: Lagerstabilität der Nanopartikelchargen 44,45 über sechs Monate bei 4°C

Diskussion:

Während das Zetapotential der NP von der Menge an zugesetztem PEG 2000 weitgehend unabhängig ist, zeigt ein Vergleich der Partikelgrößen der mit unterschiedlichen PEG 2000-Mengen hergestellten NP, dass mit zunehmender Stabilisatorkonzentration die Partikelgröße abnimmt. Die Durchmesser der Partikel betragen 195nm (1% PEG 2000-Zusatz), 175nm (10% PEG 2000-Zusatz) und 160nm (15% PEG 2000-Zusatz), sodass die Größe der „Nanotröpfchen“ auch in dieser Reihenfolge abnimmt. Höhere Konzentrationen an PEG 2000 bewirken jedoch keine weitere Änderung des Partikeldurchmessers.

4.1.5.5 Herstellung von PLGA- Nanopartikeln nach der Doppelemulsionstechnik mit Polyethylenglycol in der 2.wässrigen Phase (30% PEG; Charge 46):

Lösungen, die vor der Partikelherstellung zu bereiten sind:

- 1) 2. wässrige Phase: 6g 30% **PEG8000/1% Poloxamer 188 Lösung** in einem 10ml Becherglas herstellen, am Magnetrührer bei Raumtemperatur lösen.
- 2) Lipophile Phase: 400mg PLGA (Poly-D,L-lactid-co-glykolid) in ein 10ml Becherglas einwiegen, 2g Ethylacetat und Magnetstäbchen hinzugeben, mit Parafilm verschließen und im Kühlschrank am Magnetrührer lösen.
- 3) Stabilisierungsphase: 100g 1% Poloxamer 188 Lösung herstellen, am Magnetrührer bei ca. 600UpM bei Raumtemperatur lösen.

Herstellung:

- 1) 400µl destilliertes Wasser (1. wässrige Phase) seitlich in die lipophile Phase einlaufen lassen und 60 Sekunden unter Kühlung im Wasserbad mit dem Ultraschallstab bei 70 Watt und 90% Intensität beschallen.
- 2) Die 2. wässrige Phase zügig seitlich einlaufen lassen und 50 Sekunden unter Kühlung mit dem Ultraschallstab bei 70 Watt und 90% Intensität beschallen.
- 3) Die Doppelemulsion rasch in die rührende Stabilisierungsphase kippen und weitere 60 Minuten bei ca. 600UpM am Magnetrührer rühren.
- 4) Das verbliebene Ethylacetat 30 Minuten bei 170UpM und Raumtemperatur bei 100mbar abrotieren.
- 5) Die Suspension durch ein Glasfaser Membranfilter (Millipore, Billerica, Ma, U.S.A.) mit 1,0µm Porenweite filtrieren

Spezieller Teil

Ergebnisse:

Tabelle 12: Abhängigkeit des Nanopartikeldurchmessers, Pdl und Zetapotentials von der Konzentration an PEG 8000 der 2.wässrigen Phase (30% PEG8000/1% Poloxamer 188 in der 2. wässrigen Phase; Charge 46).

PEG8000,1% Poloxamer 188, in der 2. wässrigen Phase	Größe (nm)	Pdl	Zetapotential (mV)
15%	180,00 ± 0,66	0,15 ± 0,01	-50,00 ± 141
20%	200,00 ± 1,15	0,22 ± 0,02	-42,00 ± 0,82
30%	180,00 ± 1,52	0,13 ± 0,03	-35,00 ± 2,82

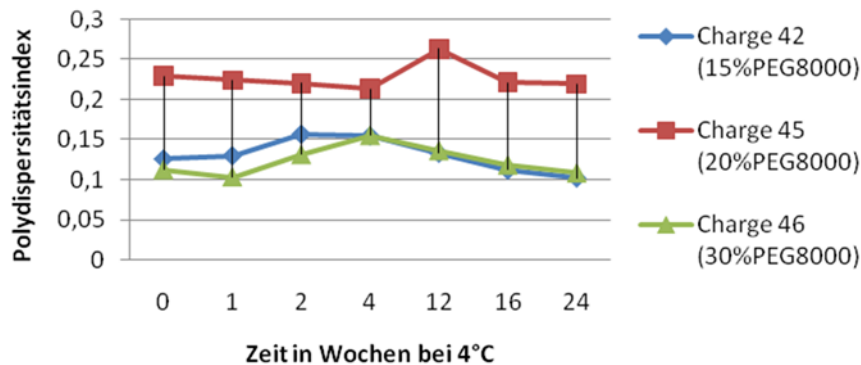


Abb 17: Lagerstabilität der Nanopartikelcharge 46 über sechs Monate bei 4°C

Diskussion:

Das Ergebnis dieses Versuches und die entsprechenden Resultate der vorangegangenen Versuche mit PEG 8000 zeigen in Gegensatz zu PEG 2000 keine Abhängigkeit der Partikelgröße von der eingesetzten PEG 8000-Menge. Auch das Zetapotential bleibt im Wesentlichen unverändert, sodass eine Ladungsabschirmung und damit eine unspezifische Anlagerung von opsonierenden Proteinen unwahrscheinlich sein dürfte. Die Verwendung von 20% bzw. 30% PEG 8000 erhöht jedoch die Lagerstabilität der NP.

4.1.7 Variation 9 (Charge 47-62)

Herstellung von nichtionischen Tween®-Nanopartikeln mit Variation der 2. wässrigen Phase:

Herstellung von PLGA- Nanopartikeln nach der Doppelemulsionstechnik mit Tween® 20 oder Tween® 80 in der 2.wässrigen Phase

Durch diese weitere Versuchsreihe sollten weitere Informationen über den Einfluss der Struktur und des HLB-Wertes von Tween® auf die Charakteristika der NP gesammelt werden. Im Gegensatz zu PEG besitzen Tween®20 bzw. 80 einen deutlich ausgeprägte amphiphile Eigenschaften und könnten an Stelle von Poloxamer 188 zur Stabilisierung der intermediär hergestellten Emulsionströpfchen beitragen.

Um diese Hypothese experimentell zu verifizieren wurde die Tween® 20 bzw. 80-Konzentration in der zweiten wässrigen Phase variiert und enthielt kein Poloxamer 188.

Protokoll zur Herstellung von PLGA-NP nach der Doppelemulsionstechnik mit Tween® 20 bzw. 80 in der zweiten wässrigen Phase (0,1 – 20%; Charge47-60):

Lösungen, die vor der Partikelherstellung zu bereiten sind:

- 1) 2. wässrige Phase: 6g **0,1%/0,5%/1%/10%/15%/20% Tween®20 und Tween®80** in einem 10ml Becherglas herstellen, am Magnetrührer bei Raumtemperatur lösen.
- 2) Lipophile Phase: 400mg PLGA (Poly-D,L-lactid-co-glykolid) in ein 10ml Becherglas einwiegen, 2g Ethylacetat und Magnetstäbchen hinzugeben, mit Parafilm verschließen und im Kühlschrank am Magnetrührer lösen.
- 3) Stabilisierungsphase: 100g 1% Poloxamer 188 Lösung herstellen, am Magnetrührer bei ca. 600UpM bei Raumtemperatur lösen.

Spezieller Teil

Herstellung:

- 1) 400µl destilliertes Wasser (1. wässrige Phase) seitlich in die lipophile Phase einlaufen lassen und 60 Sekunden unter Kühlung im Wasserbad mit dem Ultraschallstab bei 70 Watt und 90% Intensität beschallen.
- 2) Die 2. wässrige Phase zügig seitlich einlaufen lassen und 50 Sekunden unter Kühlung mit dem Ultraschallstab bei 70 Watt und 90% Intensität beschallen.
- 3) Die Doppelemulsion rasch in die rührende Stabilisierungsphase kippen und weitere 60 Minuten bei ca. 600UpM am Magnetrührer rühren.
- 4) Das verbliebene Ethylacetat 30 Minuten bei 170UpM und Raumtemperatur bei 100mbar abrotieren.
- 5) Die Suspension durch ein Glasfaser Membranfilter (Millipore, Billerica, Ma, U.S.A.) mit 1,0µm Porenweite filtrieren.

Ergebnisse:

Tabelle 13: Abhängigkeit des Nanopartikeldurchmessers, Pdl und Zetapotentials von der Tween[®] 20- Konzentration der 2.wässrigen Phase (0,1%,0,5%,1%,10%,15%,20% Tween[®] 20 in der 2. wässrigen Phase; Charge 47,49,51,53,55,57).

Tween[®] 20 in der 2. wässrigen Phase	Größe (nm)	Pdl	Zetapotential (mV)
0,1% Tween [®] 20	295,00 ± 50,99	0,44 ± 0,09	-32,00 ± 1,55
0,5% Tween [®] 20	340,00 ± 6,91	0,25 ± 0,01	-45,00 ± 0,95
1% Tween [®] 20	220,00 ± 4,41	0,16 ± 0,02	-40,00 ± 0,42
10% Tween [®] 20	165,00 ± 0,35	0,11 ± 0,01	-35,00 ± 0,3
15% Tween [®] 20	166,00 ± 0,35	0,11 ± 0,01	-45,00 ± 0,30
20% Tween [®] 20	400,00 ± 77,25	0,50 ± 0,09	-40,00 ± 1,36

Spezieller Teil

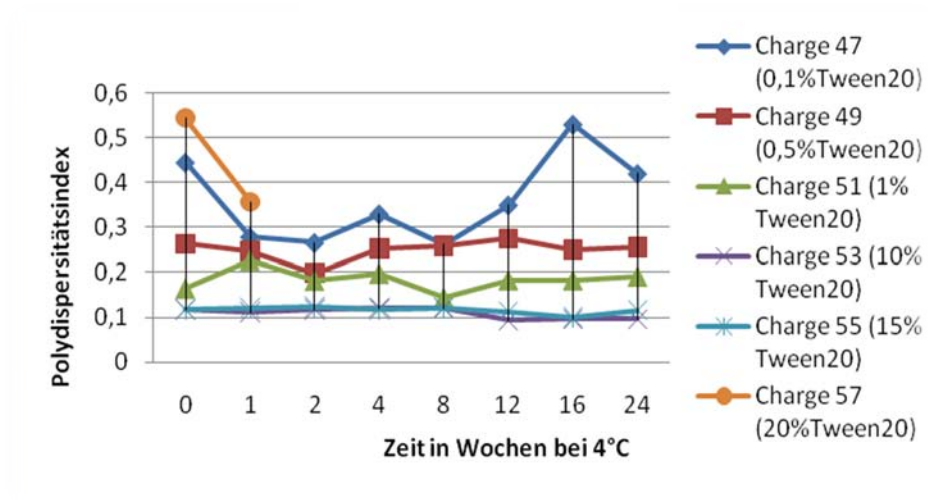


Abb 18: Lagerstabilität der Nanopartikelchargen 47,49,51,53,55,57 über sechs Monate bei 4°C

Diskussion:

Eine Variation der Menge an Tween® 20 ergab keine Abhängigkeit der NP-Charakteristika von der Tensidkonzentration. Von allen hergestellten NP-Präparationen zeichneten sich die mit 10% bzw. 15% Tween® 20 in der zweiten wässrigen Phase hergestellten NP durch einen Partikeldurchmesser mit 165nm und einer engen Größenverteilung aus. Zusätzlich waren nur diese NP sechs Monate bei 4°C lagerstabil. Darüber hinaus zeigten auch NP mit 1% Tween® 20 mit 220nm Durchmesser eine enge Größenverteilung. Somit lagen NP, die mit 1%, 10% und 15% Tween® 20 hergestellt wurden im Größenbereich der mit PEG dargestellten NP.

Tabelle 14: Abhängigkeit des Nanopartikeldurchmessers, Pdl und Zetapotentials von der Tween® 80-Konzentration der 2.wässrigen Phase (0,1%,0,5%,1%,10%,15%,20%; Charge 48,50,52,54,56,58).

Tween® 80 in der 2. wässrigen Phase	Größe (nm)	Pdl	Zetapotential (mV)
0,1% Tween® 80	320,00 ± 26,69	0,45 ± 0,02	-34,00 ± 0,29
0,5% Tween® 80	315,00 ± 1,18	0,25 ± 0,01	-45,00 ± 0,59
1% Tween® 80	230,00 ± 1,15	0,18 ± 0,01	-42,00 ± 1,08
10% Tween® 80	180,00 ± 1,69	0,15 ± 0,02	-45,00 ± 0,64
15% Tween® 80	177,00 ± 0,51	0,13 ± 0,01	-45,00 ± 0,66
20% Tween® 80	280,00 ± 73,65	0,40 ± 0,11	-30,00 ± 3,87

Spezieller Teil

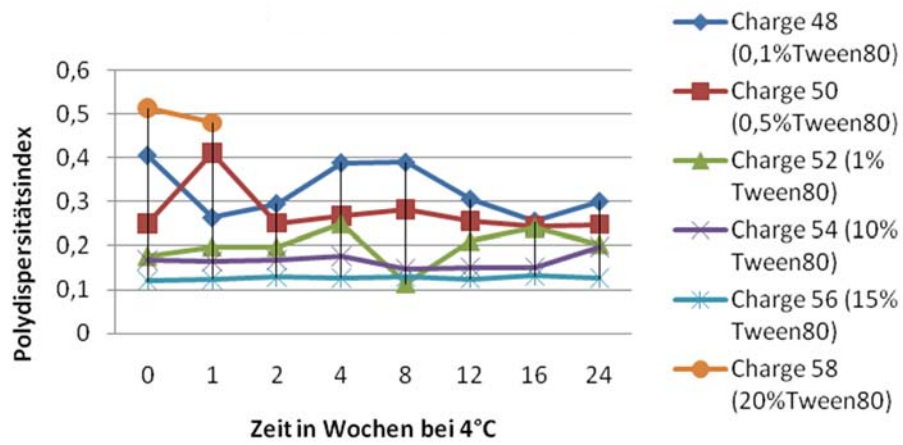


Abb 19: Lagerstabilität der Nanopartikelchargen 48,50,52,54,56,58 über sechs Monate bei 4°C

Diskussion:

Wie die Ergebnisse in Tab.14 zeigen, dürfte Tween® 80 als Stabilisator bei der NP-Herstellung nur im Bereich zwischen 1% und 15% geeignet sein, da ein Unter- bzw. Überschreiten dieser Grenzen inhomogene Größenverteilungen und damit geringe Lagerstabilität bewirkt. Wie bereits bei Tween® 20 als Stabilisator beobachtet, zeigten auch die mit 1%, 10% und 15% Tween® 80 hergestellten NP mit der Konzentration 230nm, 180nm bzw. 177nm Durchmesser eine mit der Tensidkonzentration abnehmende Größe, eine homogene Partikelgrößenverteilung und Lagerstabilität. Mit diesen Eigenschaften lagen sie ebenfalls im Größenbereich der PEG-NP. Insgesamt ergeben Tween® 20 und Tween® 80 als Komponenten in der zweiten wässrigen Phase NP in einem ähnlichen Größenbereich.

Zusätzlich wurde der additive Effekt von **1% Poloxamer 188 in der 2. wässrigen Phase** zusätzlich zu 1% Tween® 20 bzw. 80 auf die NP-Eigenschaften untersucht.

Ergebnisse:

Tabelle 15: Abhängigkeit des Nanopartikeldurchmessers, Pdl und Zetapotentials von der Zusammensetzung der zweiten wässrigen Phase (1%Tween® 20 bzw. Tween® 80 und 1% Poloxamer 188 in der 2. wässrigen Phase; Charge 59,60).

1% Tween® 20 oder 80 und 1% Poloxamer 188 in der 2. wässrigen Phase	Größe (nm)	Pdl	Zetapotential (mV)
1% Tween® 20	180,00 ± 4,41	0,12 ± 0,02	-50,00 ± 0,42
1% Tween® 80	190,00 ± 1,15	0,13 ± 0,01	-45,00 ± 1,08

Spezieller Teil

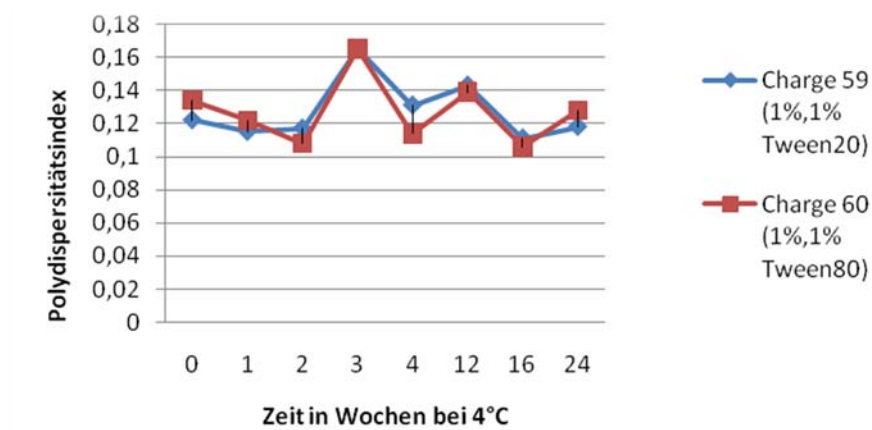


Abb 19: Lagerstabilität der Nanopartikelchargen 59,60 über sechs Monaten bei 4°C

Diskussion:

Ein Vergleich der Ergebnisse mit und ohne Poloxamer in der zweiten wässrigen Phase zeigt, dass 1% Poloxamer 188 die Bildung von NP mit einem um 50nm kleineren Durchmesser bewirkt. Zusätzlich weisen diese NP eine enge Partikelgrößenverteilung und ausreichende Lagerstabilität auf.

4.2 Aufreinigung von PLGA- NP durch Zentrifugieren

Nanopartikel werden derzeit zur Reinigung von überschüssigen Komponenten nach der Herstellung oder nach Derivatisierung der Oberfläche durch Diafiltration mithilfe der Vivaflow® 50 Apparatur laufend unter Zusatz von frischem Lösungsmittel von ihrem Überstand getrennt und können durch Diafiltration auch konzentriert werden. Diese Methode zur Aufreinigung von PLGA-NP besitzt jedoch den Nachteil, dass einerseits der Porendurchmesser der Membran die Anwendbarkeit begrenzt und andererseits ein unvermeidlicher Verlust an NP auftritt. Darüber hinaus erfordert diese „cross-flow Dialyse“ eine aufwändige Probenvorbereitung, große Lösungsmittelmengen und einen hohen Zeitaufwand.

Deshalb sollte eine alternative Reinigungsmethode für PLGA-NP auf Basis einer Zentrifugation entwickelt werden. Zusätzlich sollte untersucht werden, ob Glycerin als Dichte-erhöhender und Poloxamer 188 als stabilisierender Zusatz nötig sind.

Durchführung: Der Versuch wurde sowohl mit 12 Wochen gelagerten als auch mit neu hergestellten 150nm PLGA-NP wiederholt durchgeführt, um etwaige Stabilitätsunterschiede aufgrund der Lagerungsdauer ausschließen zu können. Die NP-Chargen wurden jeweils nach dem Standardprotokoll mit 10% Poloxamer 188 in der 2. wässrigen Phase, sowie 1% Poloxamer 188 in der Stabilisierungsphase in der 1,5fachen Menge hergestellt und deren detaillierte Charakteristika sind in Tab. 16 angeführt.

Versuch 1: Untersuchung des Effekts von Glycerin auf die NP-Reinigung durch Zentrifugieren:

1,5ml Nanopartikelsuspension und 0,5ml einer Mischung aus 7 Teilen Glycerin und 3 Teilen - 20mM HEPES/NaOH-Puffer pH 7,0 mit 1% Poloxamer 188 oder 10 Teilen (0,5ml) 20mM HEPES/NaOH-Puffer pH 7,0 / 1%Poloxamer 188 werden in einem 2ml Eppendorf-Gefäß 20 Minuten bei 14000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert und anschließend die Charakteristika der NP im Pellet mittels PCS bestimmt.

Spezieller Teil

Tabelle16: Durchmesser und Polydispersitätsindex der nach dem Standardprotokoll hergestellten PLGA- NP.

NP2	Größe (nm)	PDI	NP1	Größe (nm)	PDI
	151	0,14		148	0,15

NP1...12 Wochen gelagerte NP, NP2...neu hergestellte NP.

Ergebnisse:

Tabelle 17: Größe und Polydispersitätsindex der beiden NP-Chargen nach wiederholtem Zentrifugieren (20 Minuten, 14.000 UpM) und Resuspendieren des Pellets in 10 Teilen 20mM HEPES/NaOH-PufferpH 7,0 mit 1%Poloxamer 188 mit (NP1, NP2) und ohne Glycerinzusatz (NPG1, NPG2).

	NP1		NP2	
	Größe (nm)	Pdl	Größe (nm)	Pdl
1. Zentrifugation	164,3	0,109	154,1	0,115
2. Zentrifugation	162,2	0,104	168,4	0,121
3. Zentrifugation	169,8	0,089	170,3	0,121
4. Zentrifugation	165,3	0,086	169,9	0,107
5. Zentrifugation	165,3	0,086	169,9	0,107
	NP1G		NP2G	
	Größe (nm)	Pdl	Größe(nm)	Pdl
1. Zentrifugation	174,6	0,071	164,9	0,092
2. Zentrifugation	164,5	0,107	168,1	0,085
3. Zentrifugation	171,9	0,076	173,9	0,089
4. Zentrifugation	174,8	0,087	178,5	0,074
5. Zentrifugation	190,4	0,071	188,5	0,071

Spezieller Teil

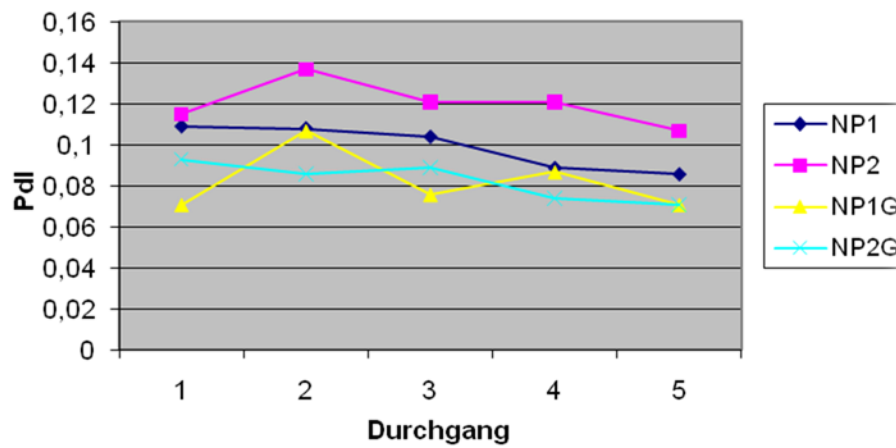


Abb.20: PDI von zwei Nanopartikelchargen nach wiederholter Zentrifugation (20 Minuten, 14.000 UpM) und Resuspendieren des Pellets in 10 Teilen 20mM HEPES/NaOH-PufferpH 7,0 mit 1%Poloxamer 188 mit (NP1, NP2) und ohne Glycerinzusatz (NPG1, NPG2).

Spezieller Teil

Versuch 2: Untersuchung des Effekts von Poloxamer 188 auf die NPreinigung durch Zentrifugieren:

Eine Mischung aus 1,5ml Nanopartikelsuspension und 0,5ml 1% Poloxamer 188, 0,5 ml 20mMHEPES/NaOH-Puffer pH 7,0 oder 0,5 ml destilliertem Wasser wird in einem 2ml Eppendorf-Gefäß 20 Minuten bei 14000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert und anschließend die Charakteristika der NP im Pellet mittels PCS bestimmt.

Ergebnisse:

Tabelle 18: Partikelgrößen und Pdl in den abgehobenen Überständen und in den Rückständen.

Überstand 1	1% Poloxamer 188	Aqua dest.	20mMHEPES/NaOH-Puffer pH 7,0
Größe (nm)	68,86	68,85	70,89
Pdl	0,25	0,25	0,30
Rückstand 1			
Größe (nm)	181,60	169,12	158,77
Pdl	0,27	0,32	0,13
Rückstand 2			
Größe (nm)	222,81	-	156,37
Pdl	0,23	-	0,13

Spezieller Teil

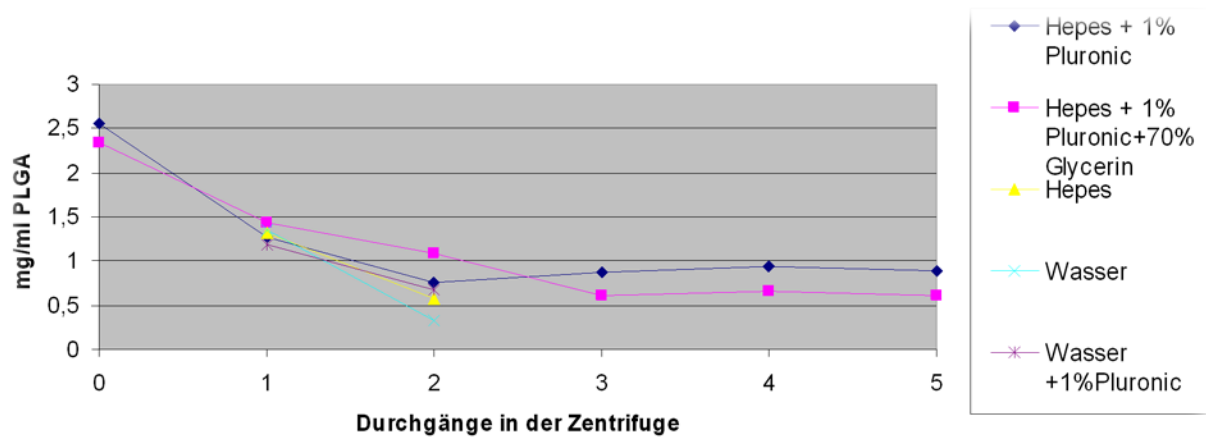


Abb.21: Mittels HPLC bestimmte Menge an PLGA (mg/ml) in den verschiedenen Zentrifugationsmedien (HEPES + 1% Pluronic®...20mM HEPES/NaOH-Puffer pH 7,0 mit 1% Poloxamer 188; HEPES + 1% Pluronic® + 70% Glycerin...20mM HEPES/NaOH-Puffer pH 7,0 mit 1% Poloxamer 188;HEPES...20mM HEPES/NaOH-Puffer pH 7,0; Wasser...dest. Wasser;Wasser + 1% Pluronic®...dest. Wasser + 1% Poloxamer 188) nach unterschiedlicher Anzahl von Zentrifugierschritten.

Diskussion:

Die wiederholte Zentrifugation von PLGA-NP in unterschiedlichen Dispersionsmedien ergibt, dass 20mM HEPES/NaOH-Puffer pH7,0 die geringste Zunahme von Partikelgröße und Partikelgrößenverteilung bewirkt. Dabei ist ein Zusatz des nichtionischen Tensids Poloxamer 188 nicht erforderlich und selbst eine Zentrifugation in der Tensidlösung bewirkt eine höhere Zunahme von Größe und PDI als Puffer allein. Entgegen Literaturangaben bewirkt Glycerin aufgrund seiner Viskosität möglicherweise eine verbesserte Zentrifugierbarkeit, das gebildete NP-Pellet ist jedoch bei Glycerinzusatz weniger kompakt und auch leichter resuspendierbar, was aber andererseits auch einen erheblichen PLGA-Verlust beim Abheben des Überstandes zur Folge hat. Ein durch Zentrifugieren einer wässrigen NP-Dispersion gewonnenes NP-Pellet ist bereits nach einmaligem Zentrifugieren trotz Anwendung von Ultraschall nicht mehr resuspendierbar, was sich in einer Zunahme des mittleren Partikeldurchmessers mit gleichzeitiger Erhöhung der Dispersität widerspiegelt. Daher ist ein gewisser Ionenanteil notwendig, um die irreversible Aggregation der NP zu verhindern.

Die Bestimmung des NP-Verlustes durch Quantifizierung der PLGA-Menge mittels HPLC zeigt, dass innerhalb von zwei Zentrifugierschritten ein erheblicher Massenverlust an Polymer und NP auftritt, die PLGA-Menge danach aber gleich bleibt. Da der PDI nach zwei Zentrifugierschritten in 20mMHEPES/NaOH-Puffer pH 7,0/1% Poloxamer 188 Lösung mit und ohne Glycerinzusatz abnimmt, könnte zusätzlich auch eine Abtrennung von kleinsten NP erfolgt sein. Insgesamt beträgt der Verlust an NP bei allen Nanopartikelsuspension nach zwei Zentrifugationsdurchgängen (je 30 Minuten, 14.000 UpM) in allen Dispersionsmedien etwa 50%. Nach fünf Zentrifugierschritten in 20mM HEPES/NaOH-Puffer pH 7,0 mit 1% Poloxamer 188 ist nur mehr ein Drittel, in einer Mischung aus 3 Teilen 20mM HEPES/NaOH-Puffer pH 7,0/1%Poloxamer 188 und sieben Teilen Glycerin hingegen nur mehr ein Fünftel der ursprünglich eingesetzten PLGA-Menge vorhanden.

4.3 Charakterisierung von F-WGA-PLGA-NP im AF4.

In diesem Versuch soll die Menge an fluoreszierendem Weizenlektin (F-WGA) bestimmt werden, die nach Immobilisierung und Reinigung im Vivaflow® 50-System an PLGA-NP gebunden ist. Dazu werden 80nm PLGA-NP nach der Doppelemulsionstechnik hergestellt und anschließend F-WGA entsprechend einem in der Arbeitsgruppe etablierten Protokoll (siehe Kapitel 3.1.3) an deren Oberfläche gebunden. Um noch eventuell vorhandene Reste an freien PLGA-Molekülen und ungebundenem F-WGA abzutrennen, wird die Probe durch asymmetrische Fluss-Feld-Fluss-Fraktionierung aufgetrennt. Ein auftretender Peak sollte F-WGA modifizierten PLGA-NP entsprechen. Diese Fraktion wird gesammelt und die Fluoreszenzintensität im Mikroplattenfluorimeter bestimmt.

Durchführung:

Vor Beginn der Fluss-Feld-Fluss-Fraktionierung wird die PLGA-Menge in der NP-Suspension aus Aliquoten zu je 750µl in einer 1:2 Verdünnung durch eine HPLC-Dreifachbestimmung ermittelt. Danach wurde die Fluoreszenzintensität der unverdünnten und verdünnten Probe bestimmt, um die Korrelation des Fluoreszenzlöschungseffektes zu bestätigen. Die Fluoreszenzlöschung („Quenching“) beschreibt eine Abnahme der Fluoreszenzintensität eines Fluorophors ohne dessen Zerstörung. Dieser Effekt kann auf Komplexbildung, reversibler Energieübertragung auf andere Moleküle oder interner Konversion beruhen. Außerdem kann die Fluoreszenz aufgrund hoher Anregungsintensitäten oder Oxidation verringert werden.

20µl Probe, 1:4 in 80µl 0,2% NovaChem® verdünnt, wurden drei Mal in die AF4 eingespritzt, die Eluate fraktioniert gesammelt und deren Fluoreszenzintensität bei 480/525nm und Gain 240 im Mikroplattenfluorimeter bestimmt. An Hand einer F-WGA-Eichgeraden wurde der Mindestgehalt an immobilisiertem F-WGA bezogen auf die PLGA- Menge berechnet.

Spezieller Teil

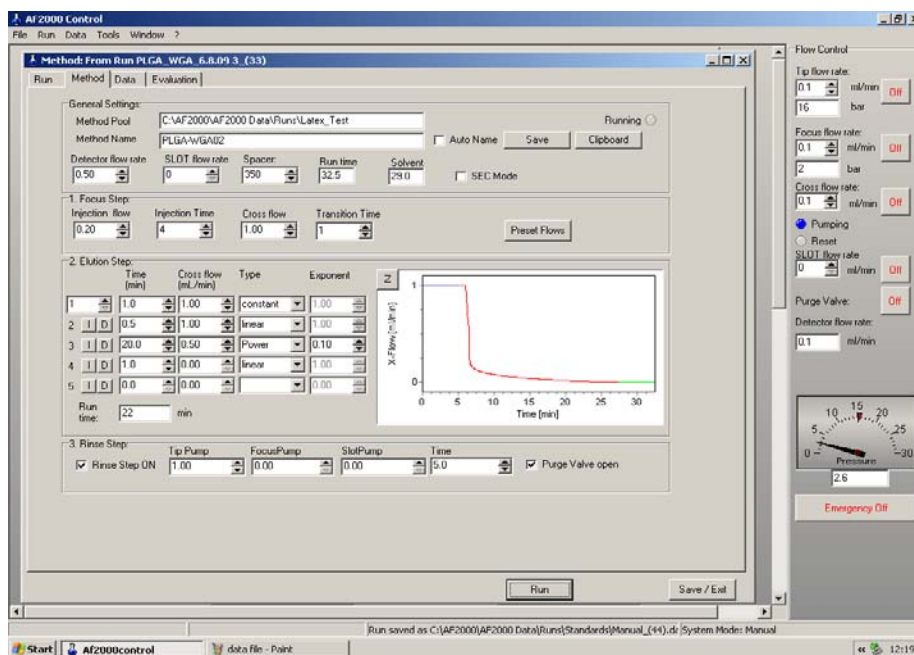


Abb. 24: Parameter der AF-4 Methode zur Charakterisierung von F-WGA modifizierten PLGA-NP.

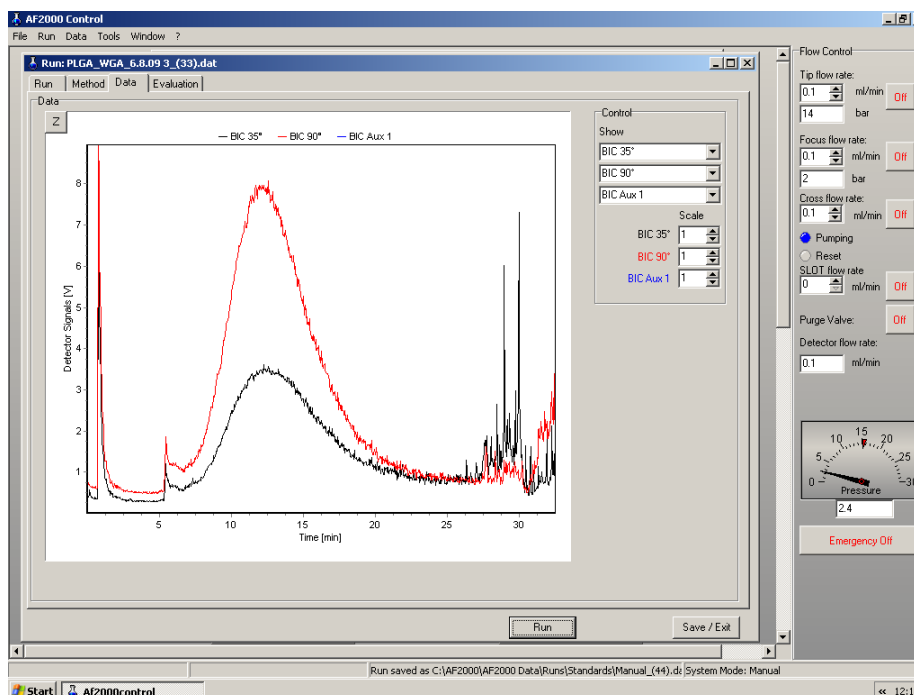


Abb. 25: Histogramm nach Elution der Probe mit Void- (Minute 5) und Probenpeak (8.–20.Minute)

Spezieller Teil

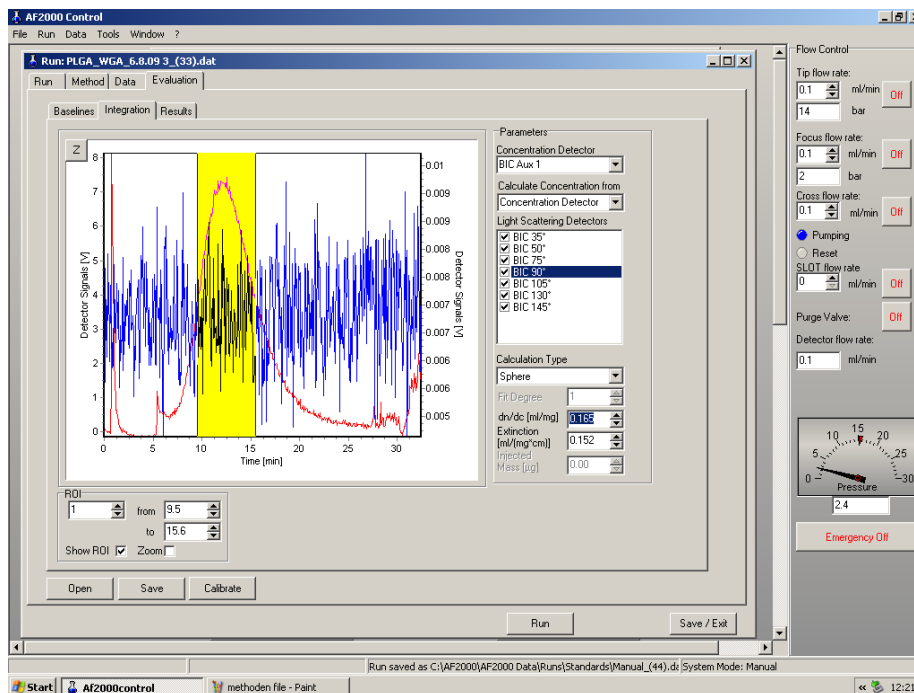


Abb.26: Festlegung der ROI (Region of Interest, gelb markierter Bereich) innerhalb des Probenpeaks auf Minute 9,5- 15,5.

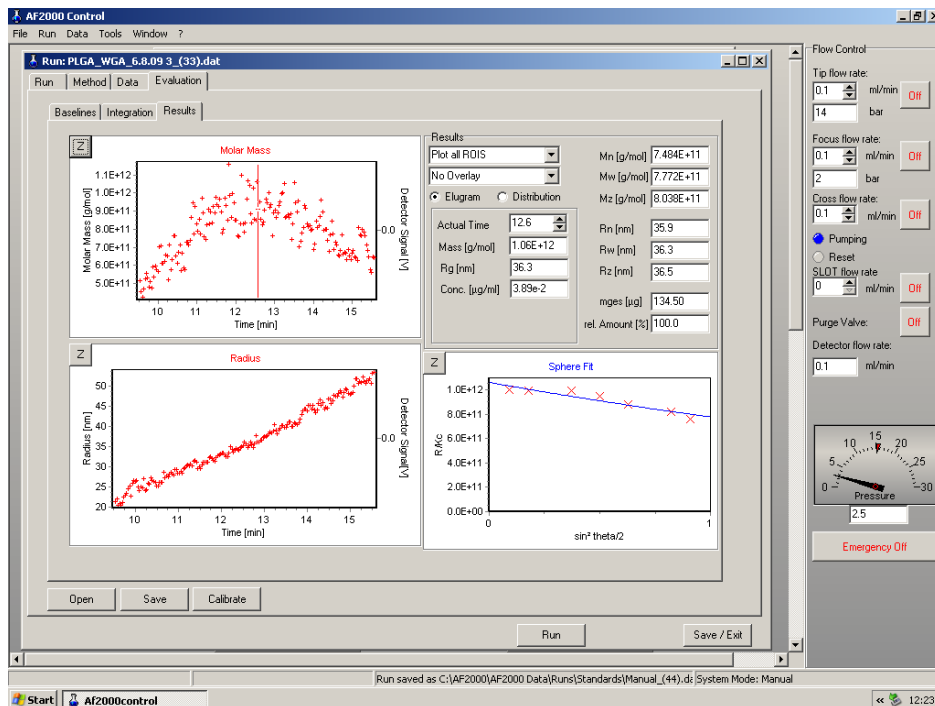


Abb. 27: Berechnung des geometrischen Radius (R_{geo}) aus dem Trägheitsradius (R_{gyr}) von Partikeln im Probenpeak

Der geometrische Radius R_{geo} für die Kugelform wird entsprechend der Gleichung $R_{geo} = R_{gyr} / 0.775$ berechnet. Dementsprechend beträgt der Nanopartikelradius 46,84 nm, was einem Durchmesser der NP von 93,68 nm entspricht.

Ergebnisse:

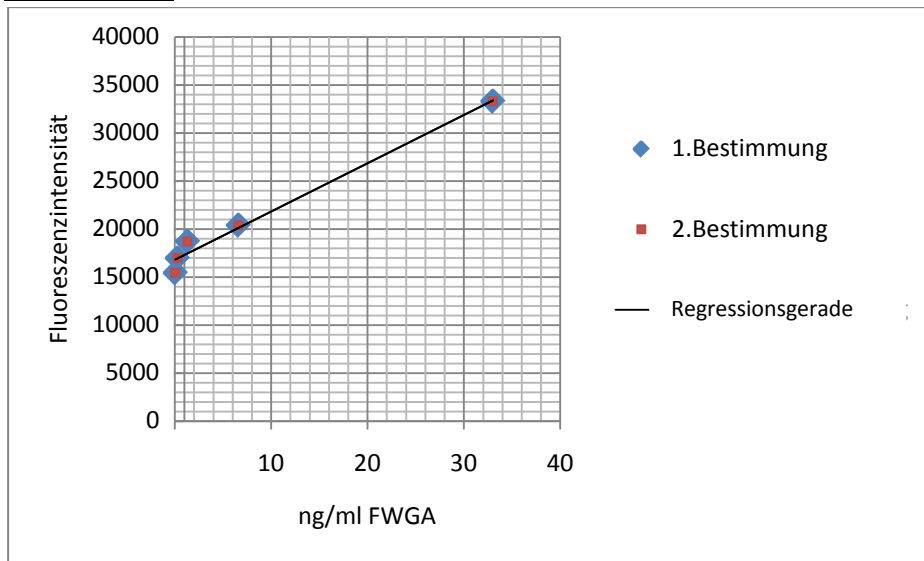


Abb.28: Eichgerade zur Quantifizierung des F-WGA-Gehaltes in den Fraktionen des AF4-Probenpeaks.

Tabelle 20: Fluoreszenzintensität von F-WGA modifizierten NP.

	Relative Fluoreszenzintensität
1. Bestimmung	20699±350
2. Bestimmung	28503±394
3. Bestimmung	23499±525
4. Bestimmung	20926±498
Mittelwert	23407±442

Anhand der F-WGA-Eichgeraden konnte der Gehalt an immobilisiertem Lektin ermittelt werden. Entsprechend den Ergebnissen sind 4,8ng (1.Bestimmung), 8,5ng (2.Bestimmung) bzw. 5,3ng F-WGA/ μ g PLGA-NP (3.Bestimmung) gebunden, was einer Kopplungseffizienz von 25-50% entspricht, sodass die 1.Bestimmung einen Gehalt von 161ng F-WGA / 33,54 μ g PLGA, das mittels HPLC in den 20 μ l NP-Suspension nachgewiesen werden konnte, ergab. Die 2.Bestimmung ergab eine Bindung von 285ng F-WGA / 33,54 μ g PLGA. Bei der 3.Bestimmung wurde eine Bindung von 178ng F-WGA / 33,54 μ g PLGA festgestellt. Somit wurden durchschnittlich 208ng F-WGA / 33,54 μ g PLGA immobilisiert. Das entspricht einem Drittel des bei der Proteinkopplung an die Oberfläche von PLGA-NP mittels **Carbodiimid-Technik** eingesetzten F-WGA.

Spezieller Teil

Der geometrische Radius der F-WGA-NP wurde an Hand des Trägheitsradius, R_{gyr} , berechnet und ergab einen Partikeldurchmesser von 93,67nm. Die Größenzunahme der NP um 14nm weist wiederum auf eine Bindung von Lektin an der NP-Oberfläche hin.

Bestimmung der Art der Lektin-Immobilisierung

Nach der Auftrennung der Probe mittels AF4 wurde der Anteil an kovalent bzw. adsorptiv gebundenem Lektin ermittelt. Die nichtkovalenten Bindungen zwischen F-WGA und PLGA-NP wurden mithilfe von 8M wässriger Harnstofflösung gespalten.

Dazu wurde die NP-Suspension zu gleichen Teilen mit 8M Harnstofflösung verdünnt und drei Tage lang unter Lichtschutz „end-over-end“ inkubiert. Zur Charakterisierung wurde einerseits die NP-Größe bestimmt und vor Erfassung der Fluoreszenzintensität der pH-Wert durch Zusatz von 0.005M NaOH auf 10,2 gestellt, da Fluorescein eine pH-Wert abhängige Fluoreszenzintensität aufweist, die im alkalischen Milieu weitaus stärker ist als im neutralen bzw. sauren Bereich. Demnach wurde auch hier NovaChem[®] zugesetzt, um die gemessene Fluoreszenzintensität mit der Ausgangsprobe bzw. der nicht mit Harnstoff behandelten Probe vergleichen zu können. Die Fluoreszenzintensität wurde bei 480/525nm und Gain 240 im Mikroplattenfluorimeter bestimmt.

Spezieller Teil

Ergebnisse:

Tabelle 21: Quantifizierung des PLGA-Gehaltes der F-WGA-PLGA-NP-Suspension (Verdünnung 1:2) mittels HPLC vor der AF4-Analyse.

		PLGA mg/ml
Unverdünnte. Probe	1. Bestimmung	1,652
	2. Bestimmung	1,762
	3. Bestimmung	1,617
	Mittelwert	$1,677 \pm 0,076$
1:2 verdünnte Probe	1. Bestimmung	0,937
	2. Bestimmung	1,047
	Mittelwert	$0,992 \pm 0,077$

Tabelle 22: Eckdaten der NP-Charakterisierung mittels AF4

PLGA- Gehalt der NP- Suspension		1,677±0,076mg/ml
FI vor der Harnstoffbehandlung		23400
FI nach Harnstoffbehandlung		18800
NP-Durchmesser/PdI	vor der Harnstoffbehandlung	93,67nm / 0,11
NP-Durchmesser/PdI	nach der Harnstoffbehandlung	98,51nm / 0,35

Die geringere Fluoreszenzintensität der NP-Suspension nach der Harnstoffbehandlung weist auf die Abtrennung des adsorptiv gebundenen Lektins hin. Die quantitative Auswertung der fluorimetrischen Ergebnisse nach Harnstoffbehandlung ergab eine Fluoreszenzintensität von 18800, sodass etwa die Hälfte des an der Partikeloberfläche immobilisierten F-WGA kovalent an die Nanopartikel gebunden ist. Demnach waren 103ng F-WGA/33,54µg PLGA F-WGA kovalent immobilisiert. Zusätzlich wurde eine geringfügige Zunahme des NP-Durchmessers um ein Zwanzigstel beobachtet, die vernachlässigt werden kann.

5. Zusammenfassung

Nanopartikuläre Formulierungen besitzen aufgrund ihrer speziellen physikalischen Eigenschaften ein hohes Potenzial als Arzneiformen für Problemwirkstoffe wie Peptide, Proteine, DNA, aber auch etablierte kaum resorbierbare Wirkstoffe. Zum

Zusammenfassung

einen können nanopartikuläre Formulierungen die Resorption verbessern bzw. erst ermöglichen und damit zum anderen die notwendige Dosis bei gleicher Wirksamkeit reduzieren, sodass auch die Nebenwirkungsrate gesenkt werden kann. Zusätzlich kann durch Oberflächenmodifikation der Nanopartikel ein zielgerichteter Transport des Wirkstoffes und damit eine weitere Dosissenkung erzielt werden. Dabei übt nicht nur die Oberflächenbeschaffenheit der Partikel, sondern auch Durchmesser, Ladung und Polymerzusammensetzung Einfluss auf die Interaktion der kolloidalen Wirkstoffträger mit den Körperzellen aus.

Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurde systematisch ein Schema zur gezielten Herstellung unterschiedlicher Größenbereiche von PLGA (Poly-d,l-laktid-co-glykolid)-Nanopartikeln nach der Doppelemulsionstechnik erarbeitet. So konnten sowohl Abhängigkeiten des Partikeldurchmessers von der Polymerkonzentration und -art in der 2. wässrigen Phase als auch von der Menge des Ethylacetats in der lipophilen Phase für die Herstellung von Nanopartikeln definierter, enger Größenverteilung im Bereich von 80 – 500nm gezeigt werden. Weiters wurde nachgewiesen, dass neben der Gesamtansatzmenge, dem Becherglasvolumen und –durchmesser auch die Intensität und Dauer des Energieeintrages die Größe der Partikel entscheidend beeinflussen.

Bei Einsatz von Poloxamer 188 als stabilisierendem Tensid zeigte sich, dass der Partikeldurchmesser indirekt proportional zur eingesetzten Poloxamer 188-Menge war, die auf der durch das Tensid veränderten Viskosität der 2. wässrigen Phase beruht. Zusätzlich konnte die oft unerwünscht hohe Tensidkonzentration in der 2.wässrigen Phase unter Erhaltung der Nanopartikelgröße auf ein Tausendstel erniedrigt werden. Insgesamt konnte die Herstellungs-bedingt notwendige Konzentration von Poloxamer 188 auf ein Zehntausendstel des Standardprotokolls reduziert werden.

Zusammenfassung

Im Gegensatz dazu verursachten Polyethylenglycol, Polysorbat 20 und 80 als Stabilisatoren der wässrigen Phasen keine deutlichen Unterschiede in der Partikelgröße. Mit Hilfe des wesentlich hydrophoberen Poloxamers Pluronic® L62 können keine Nanopartikel einheitlicher Größe hergestellt werden. Eine indirekte Proportionalität konnte auch bei der Variation der Ethylacetatphase beobachtet werden. Eine Verdoppelung der Gesamtansatzmenge ergab doppelt so große Partikel, eine Halbierung der Gesamtansatzmenge bewirkte eine Halbierung der Nanopartikel-Durchmesser. Solange die Becherglasgröße konstant gehalten wurde, bestand ein linearer Zusammenhang zwischen Ansatzmenge und Nanopartikelgröße. Außerdem konnte eine direkte Proportionalität zwischen Energieeintrag und Partikeldurchmesser bzw. Größenverteilung festgestellt werden. Dazu wurden verschiedene Intensitätsstufen und Einwirkzeiten von Ultraturrax und Ultraschallstab untersucht.

Da die Stabilität von nanopartikulären Trägersystemen eine Grundvoraussetzung für den praktischen Einsatz als Arzneiformen darstellt, wurde die Lagerstabilität aller hergestellten Formulierungen über sechs Monate bei 4°C durch Photonenkorrelationsspektroskopie überprüft. Der Großteil der im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Nanopartikel ergab keine Änderung der Größenverteilung und kann somit als stabil bezeichnet werden.

Da die Reinheit einer Formulierung einen weiteren Parameter für die pharmazeutische Anwendung darstellt, wurde als Alternative zur etablierten „cross-flow“-Diafiltration die Zentrifugation als Reinigungsmethode untersucht. Die Reinigung von PLGA-Nanopartikeln durch Zentrifugieren in 20mM HEPES/NaOH-Puffer pH 7,0 ergab die besten Resultate bezüglich Größe und Größenverteilung, wobei der Zusatz des nichtionischen Tensids Poloxamer 188 nicht erforderlich ist., Eine gewisse Mindestmenge an Salzen verhindert jedoch die Aggregation der Partikel. Entgegen Literaturangaben ist der Zusatz von Glycerin zur Pufferlösung für die Resuspendierbarkeit der zentrifugierten Nanopartikel nicht nötig, sondern beeinflusst sogar die Größenverteilung negativ.

Zusammenfassung

Zur Bestimmung des Nanopartikelverlustes durch Reinigung mittels Zentrifugation wurde die Menge an PLGA in den Nanopartikelproben mittels HPLC vor und nach den einzelnen Zentrifugierschritten bestimmt. Nach Reinigung durch zweimalige Zentrifugation (14.000 UpM, je 20 Minuten) nahm die PLGA-Menge um mehr als die Hälfte ab, nach fünf Durchgängen war nur mehr ein Drittel der ursprünglichen Polymermenge vorhanden. Da sowohl die Zentrifugation als auch die „cross-flow“-Dialyse erhebliche Partikelverluste zur Folge haben, können beide Methoden zur Reinigung von PLGA-NP als nicht ausgereift eingestuft werden, wobei die jedoch die Zentrifugation bezüglich Zeit-, Arbeits- und Kostenaufwand wesentliche Vorteile hat. Im dritten Teil dieser Arbeit wurde die Effektivität der Oberflächenmodifikation von PLGA-Nanopartikeln mit Lektinen an Hand der Immobilisierung von Fluorescein-markiertem Weizenlektin untersucht. Die durch „cross-flow“-Dialyse vorgereinigten Nanopartikel mit einem Durchmesser von 80nm wurden einer optimierten asymmetrischen Fluss-Feld-Fluss-Fraktionierung unterworfen. Die Analyse des Nanopartikelpeaks durch HPLC zur Ermittlung des Polymergehaltes und Fluorimetrie zur Erfassung des Lektingehaltes ergab, dass durchschnittlich 6,2ng Lektin pro μg PLGA-Nanopartikel gebunden sind, was einer Kopplungseffizienz von 30% entspricht. Entsprechend einer mit Harnstoff-Lösung nachbehandelten Nanopartikelsuspension waren 50% Lektin kovalent und 50% Lektin adsorptiv an die Nanopartikeloberfläche gebunden.

Insgesamt konnte durch die Studien im Rahmen dieser Diplomarbeit der Einfluss und das Wechselspiel diverser Faktoren auf die Nanopartikelgröße, -größenverteilung und -stabilität gezeigt werden. Ausgehend von dieser Arbeit ist die gezielte Herstellung von Nanopartikeln mit unterschiedlichen, jedoch definierten Größencharakteristika möglich. Darüber hinaus konnte die Reinigung der Nanopartikel mittels Zentrifugation als mögliche alternative Methode etabliert und optimiert werden. Schließlich konnte die Anwendbarkeit der asymmetrischen Fluss-Feld-Fluss-Fraktionierung zur Charakterisierung von Oberflächen-modifizierten Nanopartikeln erstmals gezeigt werden. Die Ergebnisse dieser Diplomarbeit tragen gewiss einen „Nanoteil“ zum besseren Verständnis und Einsatz der Nanopartikel in der pharmazeutischen Technologie bei, sind jedoch ein erster wesentlicher Schritt zu einem tieferen Verständnis der Charakteristik von Nanopartikeln.

6. ANHANG

6.1 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AF4	Asymmetrische Flussfeldflussfraktionierung
EDAC	[1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)]-carbodiimid
FFF	Flussfeldflussfraktionierung
FI	Fluoreszenzintensität
F-WGA	Fluoreszein markiertes Weizenlektin
HEPES	[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure]
MALS	Multi Angle Light Scattering
NHS	N-Hydroxy-succinimid
NP	Nanopartikel
PEG	Polyethylenglycol
PLGA	Poly(D,L-lactid-co-glycolid)
WGA	Weizenlektin (<u>W</u> heat <u>G</u> erm <u>A</u> gglutinin)
(W/O)/W	Wasser in Öl in Wasser-Emulsion

6.2 Literaturverzeichnis

- [1] Nanosuspensions as particulate drug formulations in therapy: Rationale for development and what we can expect for the future, R.H. Müller, C. Jacobs, O. Kayser, *Advanced Drug Delivery Reviews* 47(2001), 3-19.
- [2] Effects of particle size and surface coating on cellular uptake of polymeric nanoparticles for oral delivery of anticancer drugs, K.Y., Win, S.S., Feng, *Biomaterials* 26(2005), 2713-2722.
- [3] Flowzytometrische Untersuchungen zur Interaktion von Lektin-funktionalisierten Nanopartikeln, V. Kerleta, 2005. Diplomarbeit, Universität Wien.
- [4] www.freepatentsonline.com/EP0662005.html, 26.02.2010, microparticle preparations made from biodegradable copolymers.
- [5] Localization and quantification of biodegradable particles in an intestinal cell model: The influence of particle size, M. Gaumet, R. Gurny, F. Delie, *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 36 (2009) 465-473.
- [6] *Springer Handbook of Nanotechnology*, Seite 1-7, B. Bushan, (Editor), Springer, Berlin Heidelberg New York, 2007.
- [7] *Nanotechnologie für Dummies*, Seite 1-27, R. Brooker und E. Boysen (Editors), WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2006.
- [8] *The Nanotech Pioneers - Where are they taking us?*, Seite 15-17, S.E. Edwards (Editor), WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2006.
- [9] Nanoparticles - A Historical Perspective, J. Kräuter, *International Journal of Pharmaceutics* 331(2006), 1-10.
- [10] *Nanotechnology: Intelligent Design to Treat Complex Disease*, P. Couvreur, C. Vauthier, *Pharmaceutical Research* 23(2006), 1417-1450.
- [11] Development and characterization of protein-loaded poly-(lactide-co-glycolide)nanospheres, M.D., Blanco, M.J., Alonso, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 43(1997), 287-294.
- [12] Sterilization, toxicity, biocompatibility and clinical application of polylactic acid/polyglycolic acid and copolymers, K.A. Althanasiou, G.G.NiederauerC.M. Agrawal, C.M: *Biomaterials* 17(1996), 93-102.

- [13] Bioabsorption of with different molecular properties; T. Nakamura, S. Hitomi, S., Watanabe, J. Biomed. Mater. Res. 23(1989), 1115-1130.
- M. Asano, H. Fukuzaki, M. Yoshida, In-vivo characteristics of low molecular weight copoly (D, L-Lactic acid) formulations with controlled release of LHRH agonist, Biomaterials 10 (1989), 569-573
- [14] Toxicological evaluation of some food additives including anticaking agents, antimicrobials, antioxidants, emulsifiers and thickening agents, Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives which met in Geneva, 25 June - 4 July 1973
- [15] Hunnius, Pharmazeutisches Wörterbuch, 9.Auflage, Seite 1210, H.P.T. Ammon (Editor), Verlag Walter de Gruyter, Berlin, New York, 2004.
- [16] <http://www.inchem.org/documents/iecfa/iecmono/v05je47.htm>
- [17] http://www.pharmasolutions.basf.de/pdf/Statements/Technical%20Informations/Pharma%20Solutiones/EMP%20030737e_Lutrol%20F%2068.pdf
- [18] http://www.basf.com/performancechemical/pdfs/Pluronic_F68.pdf
- [19] Lectin-mediated drug delivery: fundamentals and perspectives. F. Gabor, M. Wirth, STP Pharma 13 (2003), 3-16.
- [20] http://www.bandelin.com/datenblaetter/5552de_2004-04.pdf
http://www.ika.net/ika/product_art/manual/ika_ut_50_b.pdf
- [21] Stabilizer- Induced Viscosity Alteration biased Nanoparticle Sizing via Dynamic Light Scattering, C. Fillafer, M. Wirth, F. Gabor. Langmuir 23(2007), 8699-8702.
- [22] Zetaziser nano series- user manual, Malvern Instruments LTD. Worcestershire, UK, 2003.
- [23] Light Scattering as Spectroscopic Tool for the Study of Disperse Systems Useful in Pharmaceutical Sciences, V. Villari, N. Micali, Messina, Italy, 2007, J. Pharm Sci. 2008 May; 97(5):1703-30 published online in Wiley InterScience www.interscience.wiley.com DOI 10.1002/jps.21067
- [24] Method for Quantifying the PEGylation of Gelatin Nanoparticle Drug Carrier Systems Using Asymmetrical FFFF and Refractive Index Detection, J.C. Zillies, K. Zwioerek, G. Winter, C. Coester, Analytical Chemistry 79(2007), 4574-4580.

- [25] The use of asymmetric FFFF in pharmaceuticals and biopharmaceuticals, W. Fraunhofer, G. Winter, European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 58 (2004), 369-283.
- [26] Field- Flow Fractionation Handbook, Seite 4-41, M. Schimpf, K. Caldwell, J. C. Giddings (Editors), John Wiley & Sons, INC., New York, 2000.

6.3 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Cornelia Teichmann
Geburtsdatum: 18. April 1986
Geburtsort: Wien, Österreich

Ausbildung:

1992-1996	Volksschule 3002 Purkersdorf, Schwarzhubergasse 7
1996-2001	Gymnasium BG/BRG Purkersdorf, Herrengasse 4
2001-2002	Auslandsjahr in Nashville, Tennessee, USA
2002-2004	Gymnasium BG/BRG Purkersdorf, Herrengasse 4
Juni 2004	Matura
Oktober 2004	Beginn des Pharmaziestudiums an der Universität Wien
Juni 2009- Februar 2010	Diplomarbeit an der Universität Wien am Department für pharmazeutische Technologie und Biopharmazie
Sommersemester 2010	Tutorin im Praktikum Industrielle Arzneimittelherstellung am Department für pharmazeutische Technologie und Biopharmazie

