

Entwicklung von Nanopartikeln für *Targeted* *Drug Delivery* Systeme

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades
Doktorin der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigte Dissertation

von

Sandra Witt geb. Kuhlmeier, M. Sc.

[2020]

Referent: Prof. Dr. rer. nat. Thomas Scheper

Korreferent: PD Dr. rer. nat. Sascha Beutel

Tag der Promotion: 09.10.2020

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. Thomas Scheper für die Ermöglichung meiner Promotion am TCI danken. Zudem danke ich PD Dr. Sascha Beutel für die Übernahme des Korreferats und PD Dr. Ulrich Krings für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Für die Unterstützung im Laboralltag danke ich Martina Weiß und Martin Pähler.

Des Weiteren danke ich dem Institut für Physikalische Chemie und Elektrochemie für den Zugang zum NTA. Zudem danke ich Bilal Temel für die TEM Messungen und dem Laboratorium für Nano- und Quantenengineering für den Zugang zum TEM Gerät. Dr. Gerrit Jürjens danke ich für die NMR-Messungen.

Mein ganz besonderer Dank geht an Dr. Johanna Walter für die hilfreichen Gespräche und Denkanstöße.

Abstract

Cancer is one of the most common causes of death worldwide. Chemotherapy is often associated with side effects due to the systemic distribution of the drugs. Drug delivery systems (DDS) can be utilized to reduce these side effects by encapsulation of drugs into nanoparticles. Due to their size, these particles do not enter healthy tissue, but can enter tumor tissue since its vascular structure is irregular and has large gaps. The nanoparticles can therefore penetrate the tumor tissue, where they release the encapsulated drugs yielding a locally increased concentration (enhanced permeability and retention (EPR) effect). For this effect, the size of the nanoparticles is particularly important; for an effective therapy it should be between 20 and 100 nm. In order to increase the specificity of the drug delivery system, additional ligands can be attached to the nanoparticles, which enable the selective binding of the nanoparticles to the target cells. By this functionalization, uptake of the nanoparticles into the cells can be promoted, while at the same time unspecific transport of the nanoparticles out of the tumor tissue is reduced. In this work the production of nanoparticles using the biodegradable polymer polycaprolactone (PCL) was optimized. Spherical nanoparticles in the desired size range (64 ± 19 nm) were produced reproducibly by means of nanoprecipitation in a batch process. After the synthesis of the nanoparticles had been optimized, a drug delivery system was set up by encapsulating paclitaxel (PTX) as model drug in the nanoparticles. In order to establish a targeted drug delivery system (TDDS), the nanoparticles were functionalized with an aptamer as an affinity ligand. Nanoparticles without encapsulated PTX showed no cytotoxicity in *in vitro* studies. However, no clear effects were achieved for PTX-containing nanoparticles, which can be attributed to the rapid leaching of PTX, which was determined in studies of storage stability and the release of the drug under simulated physiological conditions.

Keywords: nanoparticle, aptamer, polycaprolactone, targeted drug delivery

Kurzfassung

Krebs gehört zu den weltweit häufigsten Todesursachen. Die Chemotherapie ist oft mit Nebenwirkungen aufgrund der unspezifischen Verteilung der Wirkstoffe auch in gesundem Gewebe verbunden, die durch den Einsatz von *Drug Delivery Systemen* (DDS) verringert werden kann. In diesen Systemen werden Wirkstoffe beispielsweise in Nanopartikel eingekapselt. Diese Partikel gelangen aufgrund ihrer Größe nicht in gesundes Gewebe, in Tumoren ist die Gefäßstruktur jedoch unregelmäßig und weist große Lücken auf. Daher können die Nanopartikel in das Tumorgewebe eindringen, dort die eingekapselten Wirkstoffe freisetzen und auf diese Weise die Wirkstoffkonzentration lokal erhöhen (*Enhanced Permeability and Retention* (EPR)-Effekt). Dabei ist besonders die Größe der Nanopartikel entscheidend, diese sollte für eine effektive Therapie zwischen 20 und 100 nm liegen. Um die Spezifität des *Drug Delivery Systems* zu erhöhen, können zusätzlich Liganden an die Nanopartikel angebracht werden, die eine selektive Bindung der Nanopartikel an die Zielzellen ermöglichen. Auf diese Weise kann auch eine Aufnahme der Nanopartikel in die Zellen gefördert werden, gleichzeitig wird ein unspezifischer Transport der Nanopartikel aus dem Tumorgewebe heraus verringert. In dieser Arbeit wurde die Herstellung von Nanopartikeln aus dem biodegradierbaren Polymer Polycaprolacton (PCL) optimiert. Mittels Nanopräzipitation konnten im Batch-Verfahren reproduzierbar sphärische Nanopartikel im gewünschten Größenbereich hergestellt werden (64 ± 19 nm). Nach der Optimierung der Nanopartikel-Synthese, wurde ein Modell-*Drug Delivery System* aufgebaut, in dem Paclitaxel (PTX) als Modell-Wirkstoff in die Nanopartikel eingekapselt wurde. Um ein *Targeted Drug Delivery System* (TDDS) aufzubauen, wurden die Nanopartikel zusätzlich mit einem Aptamer als Affinitätsligand funktionalisiert. In *in vitro* Studien wurde gezeigt, dass die entwickelten Nanopartikel ohne PTX keine Zytotoxizität aufweisen. Für PTX-haltige Nanopartikel wurden bisher keine eindeutigen Effekte erzielt, was auf die schnelle PTX-Freisetzung zurückzuführen ist, die in Untersuchungen der Lagerstabilität und der Freisetzung des Wirkstoffs unter simulierten physiologischen Bedingungen ermittelt wurde.

Schlagwörter: Nanopartikel, Aptamer, Polycaprolacton, *Targeted Drug Delivery*

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	iii
Abstract	iv
Kurzfassung	v
Inhaltsverzeichnis	vi
1 Einleitung und Zielsetzung	1
2 Theoretische Grundlagen polymerbasierter Nanopartikel in <i>Drug Delivery</i> Systemen	3
2.1 Anforderungen an Nanopartikel in <i>Drug Delivery</i> Systemen.....	7
2.1.1 Einfluss der Größe von Nanopartikeln.....	7
2.1.2 Einfluss der Oberflächenmodifikation von Nanopartikeln	9
2.1.3 Einfluss der Form von Nanopartikeln	10
2.2 Synthesemethoden für Nanopartikel aus Polymeren.....	13
2.2.1 Überkritische Fluid Technologie (<i>Supercritical fluid</i>).....	13
2.2.2 Dialysemethode	14
2.2.3 <i>Salting out</i>	14
2.2.4 <i>Thin-film hydration</i> Methode	15
2.2.5 <i>Solvent evaporation</i> Methode.....	15
2.2.6 Nanopräzipitation	16
2.3 Nanopartikel aus Polycaprolacton (PCL) für <i>Drug Delivery</i> Systeme	20
3 Experimente zur Entwicklung PCL-basierter Nanopartikel für <i>Targeted Drug Delivery</i> Systeme	23
3.1 Herstellung und Charakterisierung von Polycaprolacton.....	24
3.2 Vergleich und Optimierung verschiedener Verfahren zur Herstellung von PCL-Nanopartikeln	26

3.2.1	Herstellung von PCL-Nanopartikeln mit der <i>Thin-film hydration</i> Methode	27
3.2.2	Herstellung von PCL-Nanopartikeln mittels Nanopräzipitation in einem mikrofluidischen Mischsystem	33
3.2.3	Herstellung von PCL-Nanopartikeln mittels Nanopräzipitation im Batch-Verfahren.....	38
3.3	Charakterisierung von PCL-Nanopartikeln aus Nanopräzipitation im Batch-Verfahren.....	49
3.3.1	Einkapselung von hydrophoben Molekülen in synthetisierte PCL-Nanopartikel	53
3.3.2	Einkapselung von Paclitaxel	54
3.4	Modifikation von PCL-Nanopartikeln mit Aptameren	58
3.4.1	Methoden zur Erhöhung der Partikelkonzentration	58
3.4.2	Kopplung von aminomodifizierten Aptameren an die Nanopartikel-Oberfläche	61
3.5	Anwendbarkeit der entwickelten PCL-Nanopartikel für <i>Targeted Drug Delivery</i> Systeme.....	64
3.5.1	Zytotoxizität von Polycaprolacton-Nanopartikeln.....	64
3.5.2	Lagerstabilität von PCL _{4,8} -PTX-Nanopartikeln.....	65
3.5.3	Freisetzung von PTX unter simulierten physiologischen Bedingungen ...	71
4	Zusammenfassung und Ausblick	75
A	Material und Methoden	80
A. 1	Verbrauchsmaterialien.....	80
A. 2	Geräte	82
A. 3	Chemikalien.....	85
A. 4	Aptamere und DNA-Oligonukleotide	87

A. 5	Puffer, Lösungen und Medien	88
A. 6	Zelllinien	90
A. 7	Methoden.....	91
A. 8	Programme	105
B	Zusätzliche Informationen.....	106
B. 1	¹ H-NMR-Spektren von PCL	106
B. 2	Einkapselung von hydrophoben Molekülen in synthetisierte PCL-Nanopartikel	109
	Abbildungsverzeichnis	111
	Tabellenverzeichnis	116
	Literatur	117
	Betreute Abschlussarbeiten	125
	Publikationen	126
	Lebenslauf	127

1 Einleitung und Zielsetzung

Auf die Diagnose Krebs folgt für Patienten oft eine Chemotherapie, die mit vielen Nebenwirkungen verbunden ist. Chemotherapeutika stören im Allgemeinen das Wachstum von Zellen und wirken damit zwar besonders auf Krebszellen, welche sich schnell teilen, jedoch auch auf gesunde Zellen. Dadurch entstehen für den Patienten zahlreiche Nebenwirkungen, wie beispielsweise Übelkeit, Haarausfall und Gewichtsverlust [1]. Um solche Nebenwirkungen zu verringern wird bereits seit den 70er Jahren an der Entwicklung von Systemen zur zielgerichteten Freisetzung von Medikamenten im Zielgewebe, sogenannten *Drug Delivery* Systemen, geforscht. Werden Chemotherapeutika in Nanopartikel eingekapselt und anschließend verabreicht, gelangen die Nanopartikel, abhängig von ihrer Größe, nicht in gesundes Gewebe [2]. Lediglich die Lücken der Blutgefäße in Tumoren und entzündeten Geweben sind groß genug, sodass Nanopartikel diese passieren können [3]. Auf diese Weise können mit Chemotherapeutika beladene Nanopartikel im Tumorgewebe angereichert werden [3]. Dort wird der Wirkstoff freigesetzt und die Krebszellen geschädigt, wobei im Vergleich zur klassischen Chemotherapie weniger Nebenwirkungen auftreten [2].

Trotz dieser Vorteile von *Drug Delivery* Systemen wurden lediglich wenige Nanoträger-basierte *Drug Delivery* Systeme als Medikamente zugelassen [4]. Problematisch sind die hohen Anforderungen an solche Systeme. Die Eigenschaften des Trägermaterials sind dabei besonders wichtig, da diese die Verteilung im Körper bestimmen. Die Nanopartikel sollten möglichst viel Wirkstoff einkapseln können und diesen erst im Zielgewebe freisetzen. Zudem sollten die Partikel hauptsächlich im Zielgewebe angereichert werden und nicht in andere Gewebe gelangen oder aus dem Körper ausgeschieden werden. Dafür ist besonders die Größe der Nanopartikel entscheidend, so werden Nanopartikel mit einer Größe von unter 6 nm direkt über die Nieren ausgeschieden [5, 6]. Nanopartikel die kleiner als 20 nm sind gelangen zwar ins Tumorgewebe, werden jedoch zu schnell aus diesem wieder freigesetzt [5, 6]. Nanopartikel größer 100 nm können dagegen nicht tief in das Tumorgewebe eindringen [5, 6].

Daher sollten in dieser Arbeit Nanopartikel entwickelt werden, die eine Größe zwischen 20 und 100 nm aufweisen und in der Lage sind hydrophobe Wirkstoffe einzukapseln. Diese hydrophoben Wirkstoffe können beispielsweise in polymerbasierten Nanopartikeln, welche einen hydrophoben Anteil besitzen, eingekapselt werden. Ein mögliches Polymer zur Einkapselung hydrophober Wirkstoffe ist das hydrophobe Polymer Polycaprolacton (PCL) [7]. PCL ist biokompatibel und nicht toxisch [8]. Es wird im Körper zu 6-Hydroxyhexansäure abgebaut, die ebenfalls nicht toxisch ist und vom Körper aufgenommen oder abgebaut werden kann [9]. Der Abbau des PCL verläuft jedoch langsam, sodass es gut für *Drug Delivery* Systeme eingesetzt werden kann [10]. Zudem ist PCL für den Einsatz in *Drug Delivery* Systemen von der US *Food and Drug Administration* (FDA) zugelassen [7, 8]. Aus diesen Gründen wurde Polycaprolacton für die Herstellung der Nanopartikel ausgewählt. Darüber hinaus sollten die erzeugten Nanopartikel mit Aptameren modifiziert werden, um eine gezielte Bindung an die Zielzellen zu ermöglichen und auf diese Weise die Spezifität des zu entwickelnden *Drug Delivery* Systems weiter zu erhöhen.

2 Theoretische Grundlagen polymerbasierter Nanopartikel in *Drug Delivery Systemen*

Drug Delivery Systeme (DDS) werden eingesetzt um den therapeutischen Effekt von Wirkstoffen zu verbessern [11]. Durch die gezielte Freisetzung des Wirkstoffs am gewünschten Wirkort können im Vergleich zur systemischen Therapie gleichzeitig das Auftreten von Nebenwirkungen und die verabreichten Dosen gemindert werden [11]. DDS bestehen dabei mindestens aus einem Transportmaterial und einem Wirkstoff und werden meist in Form von Nanopartikeln realisiert (Abb. 2.1). Für die spätere Anwendung im Menschen müssen die neben dem Wirkstoff eingesetzten Komponenten biokompatibel und nicht toxisch sein. Eine Hauptgruppe der Transportmaterialien sind daher Polymere, von denen einige aufgrund ihrer einfachen Synthese, ihrer Biokompatibilität und Bioabbaubarkeit besonders gut geeignet sind [12]. Viele der in der Literatur beschriebenen *Drug Delivery* Systeme basieren daher auf solchen Polymeren [8]. Die Polymere Poly-D-L-lactid-co-glycolid (PLGA) und Polycaprolacton (PCL) wurden beispielsweise aufgrund ihrer positiven Eigenschaften von der US *Food and Drug Administration* (FDA) für die klinische Verwendung zugelassen [8].

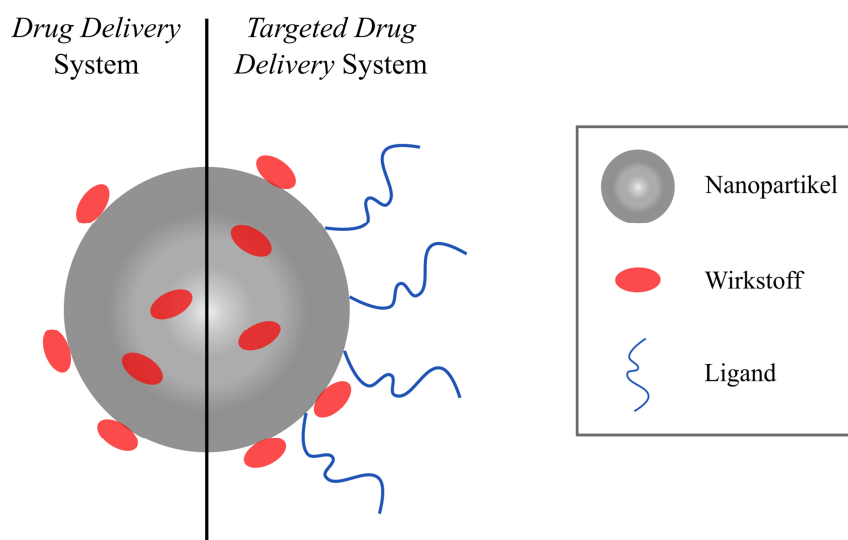


Abb. 2.1: Aufbau eines Nanopartikel-basierten *Drug Delivery* Systems (DDS), bzw. *Targeted* DDS (TDDS). Wirkstoffe können zum einen auf der Oberfläche der Partikel gebunden sein, oder in diese eingekapselt werden. Liganden wie zum Beispiel Aptamere oder Antikörper werden in TDDS auf der Partikeloberfläche immobilisiert.

Drug Delivery Systeme wurden entwickelt um einen gezielten Transport von Wirkstoffen zum Zielort zu ermöglichen, wobei Nebenwirkungen im Vergleich zur klassischen Therapie verringert werden sollen [13]. Besonders wichtig ist dies in der Krebstherapie, die oft mittels Chemotherapie erfolgt [13]. Wirkstoffe, die in der Chemotherapie eingesetzt werden, wirken jedoch auch auf gesunde Zellen toxisch, wodurch zahlreiche Nebenwirkungen entstehen [13]. Um den Körper durch diese Nebenwirkungen nicht zu stark zu schädigen, müssen Dosen für die Behandlung genutzt werden, deren Nebenwirkungen nicht zu stark sind. Dadurch ist jedoch die Wirkstoffmenge, die auf die Krebszellen wirkt oft nicht so hoch, dass alle entarteten Zellen zerstört werden können. Krebszellen, die nicht direkt zerstört werden, können jedoch Resistenzen gegenüber den Wirkstoffen entwickeln. Daher stellen die fehlende spezifische Wirkung auf Krebszellen und die damit einhergehende mögliche Resistenzbildung derzeit wesentliche Limitierungen in der Chemotherapie dar [14]. Nanopartikel können die Wirkstoffe durch den Körper transportieren und so deren Bioverfügbarkeit erhöhen, dabei können sie im Vergleich zum freien Wirkstoff die Zirkulation des Wirkstoff im Körper verändern und so eine veränderte zelluläre Verteilung des Wirkstoffs erreichen [13, 14]. Beispielsweise kann die Menge an Wirkstoff in einem bestimmten Gewebe erhöht werden, sodass die Effizienz eines Wirkstoffs aufgrund der höheren lokalen Konzentration erhöht wird und gleichzeitig Nebenwirkungen in anderen Geweben verringert werden [13]. Aufgrund der optimierten Verteilung des Wirkstoffes kann auch die Gesamtdosis an Wirkstoff erhöht werden, wodurch die Wirksamkeit der Therapie gesteigert wird [14]. Daher sind DDS vielversprechende Alternativen zur klassischen Chemotherapie [13].

Grundlage für die veränderte Bioverfügbarkeit der Wirkstoffe ist der *Enhanced Permeability and Retention* Effekt (EPR-Effekt) (Abb. 2.2) [2]. Durch die unkontrollierte Teilung von Tumorzellen, die mit einem schnellen Wachstum des Tumorgewebes einhergeht, muss das Tumorgewebe mit vielen Nährstoffen versorgt werden. Dazu muss auch die Blutversorgung des Tumors durch schnelles Wachstum von Blutgefäßen gewährleistet werden. Dadurch weisen die Zellen der Blutgefäßwände, anders als in gesundem Gewebe, eine unregelmäßige Struktur auf, wobei auch größere Lücken zwischen den Zellen auftreten [15]. Durch diese Lücken können Nanopartikel in das Tumorgewebe

gelangen, während die Blutgefäße in gesundem Gewebe nicht für Nanopartikel durchlässig sind [2]. Die Lücken zwischen den Gefäß-Endothelzellen können dabei bis zu 600-800 nm groß sein [16], daher können Nanopartikel mit einer Größe von 10-500 nm durch die Gefäßwände gelangen [3]. Gleichzeitig erfolgt eine Anreicherung der Partikel im Tumorgewebe aufgrund der verminderten Lymphdrainage in Tumoren, sodass Partikel nicht wie in gesundem Gewebe durch die Lymphe wieder ausgespült werden [16].

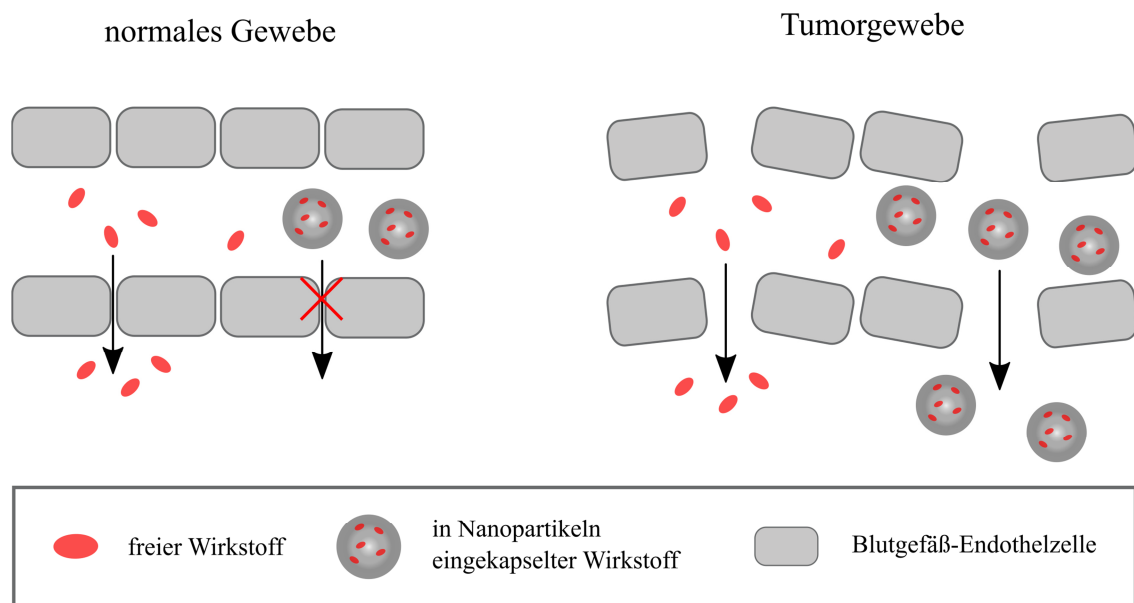


Abb. 2.2: Der *Enhanced Permeability and Retention* Effekt (EPR-Effekt). In gesundem Gewebe ist die Form der Blutgefäß-Endothelzellen regelmäßig, daher können Nanopartikel aufgrund ihrer Größe nicht in das umliegende Gewebe gelangen, die Diffusion freier Wirkstoffe wird hingegen nicht beeinträchtigt. In Tumorgewebe ist die Struktur der Blutgefäß-Endothelzellen dagegen unregelmäßig, wodurch die Gefäßwand größere Lücken aufweist, durch die Nanopartikel ins Tumorgewebe gelangen können. Zudem ist die Lymphdrainage in Tumoren vermindert, sodass Nanopartikel im Tumorgewebe akkumulieren.

Nach der Freisetzung aus den Nanopartikeln unterliegt der Wirkstoff wieder der freien Diffusion, sodass er aus dem Tumorgewebe heraus auch noch in gesundes Gewebe gelangen und dieses schädigen kann [2]. Daher kann auch bei der Verwendung von *Drug Delivery* Systemen zur Behandlung von Tumoren lediglich eine Wirkstoffdosis eingesetzt werden, die das umliegende Gewebe nicht zu stark schädigt. Die Wirkstoffmenge kann daher möglicherweise nicht ausreichen um alle Tumorzellen zu zerstören. Verbleibende Zellen könnten dadurch Resistenzen gegenüber dem Wirkstoff entwi-

ckeln [2]. Es können jedoch höhere Wirkstoffdosen eingesetzt werden, wenn die Partikel in die Tumorzellen aufgenommen werden und erst in den Zellen den Wirkstoff freisetzen. Auf diese Weise erfolgt die toxische Wirkung lediglich auf die Tumorzellen.

Die Spezifität eines *Drug Delivery Systems* kann durch Liganden, welche spezifisch an Strukturen auf den Zielzellen binden, erhöht werden, diese Systeme werden *Targeted Drug Delivery Systeme* (TDDS) genannt (Abb. 2.1). Diese Liganden können beispielsweise Antikörper oder Aptamere sein, die auf der Oberfläche von Nanopartikeln immobilisiert sind [14]. Nachdem sich die Nanopartikel aufgrund des EPR-Effektes im Zielgewebe angereichert haben, können die Liganden an die Zielzellen binden und abhängig von der gebundenen Zielstruktur auf der Zellmembran beispielsweise über Rezeptorvermittelte Endozytose in die Zellen aufgenommen werden [17]. Dadurch erhöht sich die Wirkstoffkonzentration in den Zielzellen im Vergleich zur Behandlung mit freiem Wirkstoff und die Effektivität der Therapie wird erhöht [17]. Die Wirksamkeit gegenüber resistenten Tumoren kann durch *Drug Delivery Systeme* ebenfalls erhöht werden [2]. Ein Hauptmechanismus, der Multiresistenzen von Tumoren gegenüber Wirkstoffen ermöglicht, ist die Überexpression von Transportern der ATP-Bindekassette wie zum Beispiel dem P-Glykoprotein (P-gp) [18]. Mit Hilfe dieser Transporter werden Wirkstoffe aus den Zellen transportiert und so deren zytotoxische Wirkung verhindert [18]. Die Aufnahme von Nanopartikeln, die über Liganden an Tumorzellen gebunden sind und über Rezeptorvermittelte Endozytose aufgenommen werden, ist unabhängig vom P-gp Transportweg [18]. Werden in diese Nanopartikel neben dem Wirkstoff zur Krebsbehandlung noch weitere Wirkstoffe eingebracht, z. B. P-gp Inhibitoren, können diese den Transport von Wirkstoff aus den Tumorzellen verhindern und so die Wirksamkeit auch gegenüber resistenten Tumorzellen erhöhen [18].

Ein weiterer Vorteil von *Drug Delivery Systemen* ist, dass auch Wirkstoffe genutzt werden können, deren Eigenschaften für den Einsatz im Körper nicht ideal sind. Zum Beispiel können in der klassischen Chemotherapie einige Wirkstoffe aufgrund ihrer Eigenschaften nicht, oder nur mit entsprechenden Zusätzen genutzt werden. Das ist besonders bei hydrophoben Wirkstoffen der Fall, sodass diese aufgrund ihrer geringen Löslichkeit in wässrigen Systemen, nur mit Zusätzen wie Ethanol oder anderen Be-

standteilen eingesetzt werden können [13]. Diese Zusätze sorgen jedoch oft für starke Nebenwirkungen [13]. Werden hydrophobe Wirkstoffe dagegen in Nanopartikel mit hydrophobem Kern eingekapselt, können diese ohne systemisch wirkende Zusatzstoffe in der Therapie eingesetzt werden [13]. Darüber hinaus verhindert die Ummantelung der Wirkstoffe mit dem Trägermaterial einen Kontakt der Wirkstoffe mit Wasser, daher können auch Wasser-instabile Wirkstoffe in *Drug Delivery* Systemen genutzt werden [13].

Die Effektivität von *Drug Delivery* Systemen wird maßgeblich durch die Eigenschaften der genutzten Nanopartikel beeinflusst. Auf diese Eigenschaften wird in folgendem Kapitel näher eingegangen.

2.1 Anforderungen an Nanopartikel in *Drug Delivery* Systemen

Damit Nanopartikel als *Drug Delivery* System genutzt werden können, müssen neben der Fähigkeit Wirkstoffe zu binden und am Zielort freizusetzen, zahlreiche weitere Eigenschaften beachtet werden. Unter anderem haben die Größe der Nanopartikel, die Oberflächenladung und Hydrophobizität, sowie die Form der Nanopartikel einen Einfluss auf deren Verteilung im Körper und die Aufnahme in Zellen [19, 20].

2.1.1 Einfluss der Größe von Nanopartikeln

Die Größe von Nanopartikeln beeinflusst deren Eigenschaften auf verschiedene Weisen, Abbildung 2.3 fasst die wichtigsten Größenlimitierungen zusammen. Die Aufnahme von Nanopartikeln in Zellen über Rezeptor-vermittelte Endozytose ist größenlimitiert. Nanopartikel mit einer Größe von bis zu 500 nm können zwar durch die unregelmäßige Struktur der Blutgefäß-Endothelzellen ins Tumorgewebe gelangen, die Aufnahme von Nanopartikeln über Rezeptor-vermittelte Endozytose ist jedoch nur für Nanopartikel mit einer Größe von bis zu 200 nm möglich [21]. Daher sollte der Durchmesser von Nanopartikeln für *Drug Delivery* Systeme 200 nm nicht überschreiten, damit sie über Rezeptor-vermittelte Endozytose aufgenommen werden können [21].

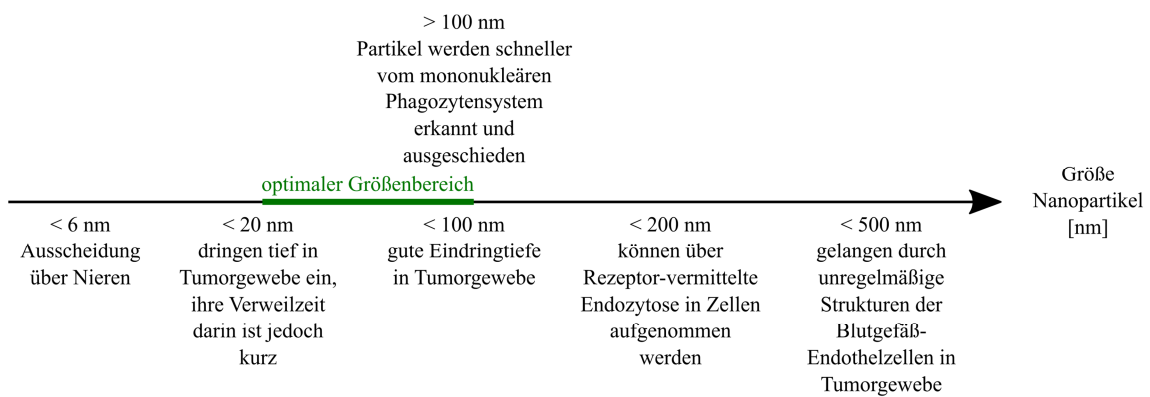


Abb. 2.3: Einfluss der Nanopartikelgröße auf deren Eigenschaften bei der Verwendung als *Drug Delivery System*.

Neben dem Aufnahmeweg der Nanopartikel in Tumorzellen ist auch die Zirkulationszeit von Nanopartikeln im Blut, deren Eindringtiefe in das Tumorgewebe und die Elimination der Nanopartikel aus dem Tumorgewebe abhängig von ihrer Größe [6]. Tendenziell ist die Halbwertszeit von Nanopartikeln im Blut für größere Partikel kleiner, da sie vom mononukleären Phagozytensystem (MPS) eher erkannt und über Milz und Leber eliminiert werden [5, 22, 23]. Die Erkennung von Nanopartikeln vom MPS ist für Nanopartikel mit einer Größe von unter 100 nm besonders gering [22]. Nanopartikel mit einer Größe unterhalb von 6 nm werden jedoch direkt über die Nieren ausgeschieden [5]. Auch die Eindringtiefe in das Tumorgewebe ist größenabhängig [6]. Für Gold-Nanopartikel wurde gezeigt, dass Nanopartikel mit einer Größe von über 100 nm nach dem Verlassen der Blutgefäße nicht tief in das Tumorgewebe eindringen können, während kleinere Partikel durch den Interzellularraum auch tiefer ins Tumorgewebe eindringen (ein Großteil der Partikel befindet sich acht Stunden nach der Injektion von Nanopartikeln in einem Radius von 0-20 μm um das Blutgefäß) [6]. Es ist jedoch zu beachten, dass kleinere Nanopartikel dadurch auch schneller aus dem Tumor in das umliegende Gewebe freigesetzt werden, dies gilt besonders für Partikel mit einer Größe von unter 20 nm [6]. Insgesamt gesehen liegt die optimale Größe von Nanopartikeln für *Drug Delivery* Systeme daher zwischen 20 und 100 nm. Die Größe der Nanopartikel beeinflusst die Zirkulationszeit der Nanopartikel im Blut und die Aufnahme der Partikel in Zellen jedoch nicht allein, auch die Oberflächeneigenschaften von Nanopartikeln

spielen hierbei eine wichtige Rolle und werden im nächsten Teilabschnitt näher erläutert.

2.1.2 Einfluss der Oberflächenmodifikation von Nanopartikeln

Damit Nanopartikel ausreichend im Zielgewebe akkumulieren können, sollten sie möglichst nicht durch das mononukleäre Phagozytensystem (MPS) erkannt und über Leber und Milz ausgeschieden werden [3]. Wichtige Faktoren sind dabei neben der Größe der Nanopartikel deren Oberflächen-Hydrophobizität und die Oberflächenladung der Partikel [6, 24]. So werden beispielsweise positiv geladene quervernetzte Polyethylenglykol-Hydrogele schneller von HeLa-Zellen aufgenommen als negativ geladene [25]. Ursächlich könnten die stärkeren Wechselwirkungen der positiv geladenen Nanopartikel mit der negativ geladenen Zellmembran sein [23]. He *et al.* konnten zudem zeigen, dass neben stark positiv geladenen Nanopartikeln auch leicht negativ geladene Polymer-Nanopartikel im Vergleich zu leicht positiv oder stark negativ geladenen Nanopartikeln schneller von verschiedenen Zelllinien aufgenommen werden [23]. Die Aufnahme der Nanopartikel ist jedoch auch von den Materialien der Nanopartikel und den untersuchten Zelllinien abhängig [23]. Für mesoporöse Siliziumdioxid Nanopartikel wurde gezeigt, dass positiv geladene Nanopartikel länger in den Endosomen von HeLa-Zellen verbleiben, während negativ geladene Nanopartikel schneller aus den Endosomen in die Zelle entlassen werden [26] (Nanopartikel gelangen über Endosome und Lysosome in die Zelle, wenn sie beispielsweise über Rezeptor-vermittelte Endozytose aufgenommen werden). Obwohl diese Ergebnisse darauf hindeuten, dass die Oberflächenladung der Nanopartikel entweder möglichst negativ oder positiv sein sollte, wurde nachgewiesen, dass Nanopartikel mit stark positiven und stark negativen Oberflächenladungen schneller von Mäuse-Makrophagenzellen (in Zellkultur) aufgenommen werden, wodurch diese schneller abgebaut werden als Nanopartikel mit weniger starken Oberflächenladungen [23]. Ein weiterer Vorteil ungeladener Nanopartikel ist, dass sie vermindert mit geladenen Gruppen beispielsweise in der extrazellulären Matrix wechselwirken und so schneller durch den Zwischenzellraum von Tumoren wandern können (die Experimente zu diesen Untersuchungen wurden lediglich an Hydrogel-Modellen, die die extrazellulä-

re Matrix simulieren, durchgeführt) [24, 27]. Unabhängig von der Aufnahme der Partikel durch Zellen haben positiv geladene Nanopartikel im Vergleich zu negativ geladenen Nanopartikeln eine längere Halbwertszeit im Blut [28]. Diese wird möglicherweise dadurch hervorgerufen, dass Opsonine über elektrostatische Wechselwirkungen nicht so gut an positiv geladene Nanopartikel binden können, wie an negativ geladene Nanopartikel [28]. Dadurch werden die negativ geladenen, Opsonin-gebundenen Nanopartikel eher vom mononukleären Phagozytensystem erkannt und aus dem Blut entfernt [28].

Neben der Ladung beeinflusst auch die Hydrophobizität der Nanopartikeloberfläche deren Eigenschaften. Hydrophobe Nanopartikel werden vom MPS eher erkannt als Partikel mit hydrophiler Oberfläche [22]. Durch eine Modifikation der Partikel-Oberfläche mit hydrophilen Molekülen, wie zum Beispiel Polyethylenglykol (PEG) können die Nanopartikel daher vor dem Abbau durch das MPS geschützt werden und weisen im Vergleich zu Partikeln ohne diese Modifikation eine höhere Halbwertszeit im Blut auf [22, 29]. Dabei hat auch die Molekülmasse des PEG einen Einfluss auf die Halbwertszeit [29]. Diese ist höher für Nanopartikel, die aus Polymeren mit einer höheren PEG-Molekülmasse bestehen [29].

2.1.3 Einfluss der Form von Nanopartikeln

Neben der Größe und der Oberflächenmodifikation von Nanopartikeln ist auch die Form von Nanopartikeln entscheidend für die Eigenschaften der Partikel. Abbildung 2.4 zeigt verschiedene mögliche Formen von Nanopartikeln. In der Literatur werden am häufigsten kugelförmige Nanopartikel beschrieben, daneben sind jedoch auch Nanopartikel in der Form von Nanodisks, stäbchenförmige/zylindrische Nanopartikel oder filamentöse Nanopartikel bekannt [20].

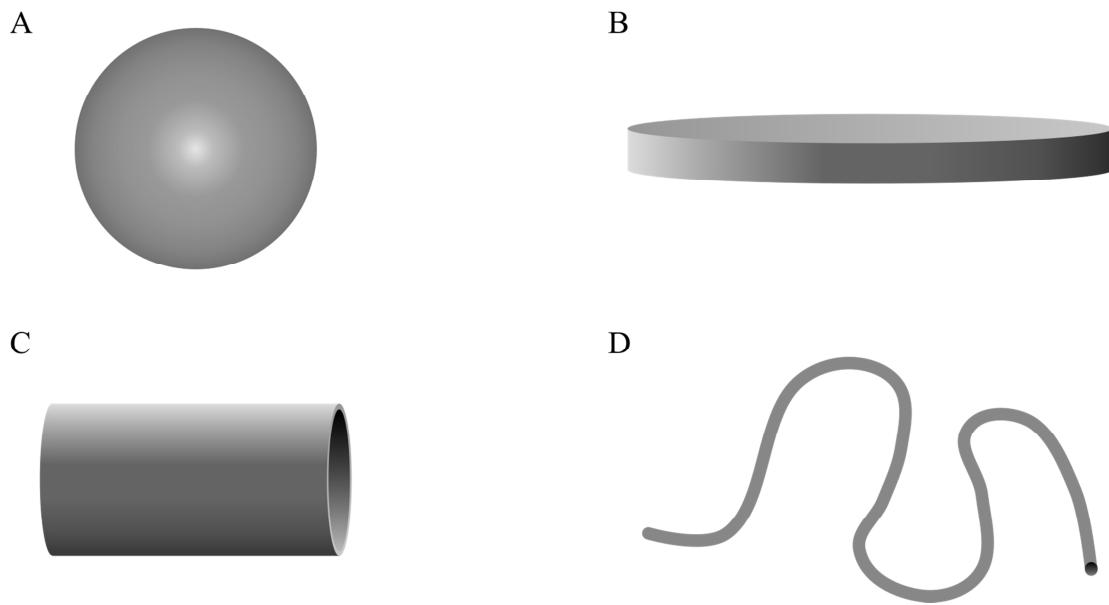


Abb. 2.4: Verschiedene Formen von Nanopartikeln. Nanopartikel können beispielsweise kugelförmig sein (A), die Form einer Nanodisk aufweisen (B), stäbchenförmig/zylindrisch sein (C) oder filamentös (D) (nach [20]).

Unterschiedliche Formen von Nanopartikeln gehen dabei auch mit veränderten Eigenschaften der Nanopartikel einher. Beispielsweise wurde für Nanopartikel aus Polyethyl- enoxid-Polycaprolacton gezeigt, dass filamentöse Nanopartikel im Vergleich zu kugel- förmigen Nanopartikeln doppelt so viel hydrophoben Wirkstoff bei gleicher eingesetzter Masse an Polymer einschließen können [30]. Zudem ist die maximale tolerierbare Dosis für diese filamentösen Nanopartikel in Mäusen fast doppelt so hoch wie für die kugel- förmigen Nanopartikel, was auf geringere unspezifische Nebenwirkungen hindeutet [31]. Ein weiterer Vorteil von filamentösen Nanopartikeln ist deren deutlich längere Halbwertszeit im Blut, im Gegensatz zu kugelförmigen Nanopartikeln aus dem- selben Material (PEG-PCL und PEG-Polyethylenethylen) [32]. Für stäbchenförmige Nanopartikel (hergestellt aus Konjugaten von PEG, dendritischem Polylysin und Camptothecin) wurde gezeigt, dass deren Halbwertszeit im Blut abhängig von der Länge der Stäbchen ist [33]. Stäbchen mit einer Länge von unter 500 nm haben eine längere Halbwertszeit als längere Stäbchen und kugelförmige Nanopartikel [33]. Dar- über hinaus werden kürzere Stäbchen auch schneller in Tumorzellen aufgenommen als längere Stäbchen oder kugelförmige Nanopartikel [33]. Eine mögliche Erklärung ist,

dass kugelförmige Nanopartikel sich verformen müssen, um durch die Zwischenräume zwischen Blutgefäßzellen in Tumore zu gelangen, lineare Nanopartikel hingegen nicht [20]. Die Aufnahme von längeren stäbchenförmigen Nanopartikeln und langen filamentösen Nanopartikeln in Zellen verläuft jedoch viel langsamer als von kugelförmigen Nanopartikeln, da der Einfluss von Flüssigkeitsströmungen auf diese Nanopartikel höher ist, als auf kugelförmige Nanopartikel [32, 33]. Für kurze stäbchenförmige Nanopartikel aus Lipid-PEG-Block-Copolymeren (200 nm Länge) wurde dennoch gezeigt, dass deren Anreicherung in Tumorgewebe, die Eindringtiefe in Tumorgewebe und die Aufnahme in Tumorzellen stärker ist, als für runde Nanopartikel [34]. Nanodisks aus Polystyren hingegen bleiben in der Lipiddoppelschicht von Zellen hängen und werden deswegen im Gegensatz zu kugelförmigen Nanopartikeln aus Polystyren kaum von Zellen aufgenommen [20, 35]. Insgesamt gesehen scheinen also stäbchenförmige/zylindrische Nanopartikel die besten Ergebnisse für *Drug Delivery* Systeme zu zeigen, wobei in unterschiedlichen Systemen (verschiedene Materialien oder verschiedene Zelllinien) unterschiedliche starke Aufnahmen in Zellen beobachtet wurden [20]. Systematische Analysen für die diversen Materialien und Modifikationen in einem einheitlich definierten biologischen Testsystem fehlen jedoch bisher, sodass keine allgemeingültigen Aussagen getroffen werden können.

Zum jetzigen Zeitpunkt werden in der Literatur hauptsächlich kugelförmige Nanopartikel beschrieben, da deren Herstellung oft einfacher ist als die Herstellung von Nanopartikeln mit anderen Formen. Im folgenden Kapitel werden verschiedene Methoden zur Herstellung von kugelförmigen Polymer-Nanopartikeln näher beschrieben.

2.2 Synthesemethoden für Nanopartikel aus Polymeren

Die Herstellung von Polymer-Nanopartikeln kann generell in zwei Gruppen eingeteilt werden. In der einen Gruppe werden die Nanopartikel direkt während der Polymerisation der Monomere hergestellt, in der anderen Gruppe erfolgt die Herstellung der Nanopartikel aus zuvor hergestellten Polymeren [36]. In dieser Arbeit wurden die Nanopartikel aus bereits synthetisierten Polymeren hergestellt, daher wird in diesem Kapitel auf diese Methoden näher eingegangen.

2.2.1 Überkritische Fluid Technologie (*Supercritical fluid*)

Die Herstellung von Polymer-Nanopartikeln mittels überkritischer Fluid Technologie nutzt überkritische Fluide als Lösemittel oder nicht-Lösemittel für Polymere [37]. Als überkritisches Fluid kann beispielsweise CO₂ genutzt werden [38]. Ist ein Polymer in einem überkritischen Fluid gelöst, präzipitiert das Polymer bei einem schnellen Druckabfall in Form von Nanopartikeln (*Rapid expansion of supercritical solutions (RESS)*) [37]. Jedoch ist diese Methode nur für Polymere anwendbar, die in überkritischen Fluiden löslich sind. Ist das Polymer nicht im überkritischen Fluid löslich, kann es auch in einem flüssigen, organischen Lösemittel gelöst werden, das überkritische Fluid dient in diesem Fall als nicht-Lösemittel [37]. Dadurch ist diese Methode für eine Vielzahl von Polymeren anwendbar, auch wenn diese nicht in überkritischen Fluiden löslich sind [37]. Anschließend kann das nicht-Lösemittel in die Polymerlösung in einer geschlossenen Kammer geleitet werden [37]. Durch das Einleiten dieses nicht-Lösemittels verschieben sich die fluid-fest und flüssig-flüssig Phasengrenzen zu höherer Temperatur beziehungsweise höherem Druck [37]. Dadurch wird das System aus dem zuvor homogenen Ein-Phasen-System in die Zwei-Phasen-Region verschoben, dabei entstehen durch Phasentrennung Nanopartikel (lösemittelinduzierte Phasentrennung) (*Gas antisolvent process (GAS)*) [37]. Ein Vorteil bei dieser Methode ist, dass das verwendete nicht-Lösemittel (Gas) nicht unbedingt überkritisch sein muss [37]. Anstatt das Gas in die Polymerlösung zu leiten, kann auch die Polymerlösung in ein überkritisches Fluid gesprüht werden (*Supercritical antisolvent process (SAS)*) [37]. Der schnelle Kon-

takt zwischen Lösemittel und nicht-Lösemittel sorgt für eine hohe Übersättigung der Lösung, sodass eine schnelle Kernbildung und ein schnelles Wachstum der Partikel erfolgt [37]. Dadurch entstehen Nanopartikel, die kleiner sind, als Nanopartikel die mittels *RESS* oder *GAS* hergestellt werden [37]. Ein weiterer Vorteil ist, dass dieses Verfahren auch für die kontinuierliche Herstellung von Nanopartikeln genutzt werden kann [37]. Allgemein können mit der Herstellung von Polymer-Nanopartikeln mit überkritischen Fluiden besonders kleine Nanopartikel mit homogenen Größen hergestellt werden [38].

2.2.2 Dialysemethode

Die Dialysemethode ermöglicht die Herstellung von Polymer-Nanopartikeln mit Equipment, welches in nahezu jedem Labor vorhanden ist. Dafür wird das Polymer in einem Lösemittel gelöst, welches mit dem nicht-Lösemittel mischbar ist, und in einen Dialyseschlauch gegeben [36]. Dieser wird dann in ein Lösemittel gegeben, in dem das Polymer nicht löslich ist [36]. Während der Dialyse wird das Lösemittel des Polymers vom nicht-Lösemittel verdrängt, wodurch das Polymer immer weniger löslich wird und daher aggregiert und Nanopartikel bildet [36].

2.2.3 *Salting out*

Für die Herstellung von Nanopartikeln mit der *Salting out* Methode wird zunächst ein Polymer in einem mit Wasser mischbarem organischen Lösemittel gelöst [36]. Diese Polymerlösung wird dann in eine wässrige Phase gegeben, die eine große Menge an gelösten Salzen enthält [36]. Die Salze verhindern, dass sich das mit Wasser mischbare Lösemittel mit der wässrigen Phase mischt [36]. Dadurch kann eine Öl-in-Wasser-Emulsion hergestellt werden, obwohl das organische Lösemittel eigentlich mit dem Wasser mischbar wäre. Die Ölphase besteht dabei aus Tröpfchen des organischen Lösemittels, welches die Polymere enthält [39]. Wird die Emulsion nun mit einer großen Menge Wasser verdünnt, wird auch die Salzkonzentration verdünnt [36]. Die Salze ver-

hindern dadurch nicht mehr die Durchmischung des organischen Lösemittels mit der wässrigen Phase [36]. Das organische Lösemittel diffundiert aus den Tröpfchen in die wässrige Phase, wodurch das Polymer präzipitiert und Nanopartikel entstehen [36].

2.2.4 *Thin-film hydration* Methode

Polymer-Nanopartikel können mit der *Thin-film hydration* Methode hergestellt werden, indem zunächst das Polymer in einem Lösemittel gelöst wird [40-42]. Das Lösemittel wird anschließend unter vermindertem Druck entfernt, wobei ein Polymer-Film auf der Oberfläche des Gefäßes entsteht [40-42]. Dieser Polymerfilm wird mit einer wässrigen Phase rehydriert, meist bei erhöhten Temperaturen um 60 °C [40-42]. Anschließend kann eine Behandlung des rehydrierten Polymerfilms mit Ultraschall erfolgen, wodurch Nanopartikel entstehen [41, 42].

2.2.5 *Solvent evaporation* Methode

Die *Solvent evaporation* Methode ist die erste in der Literatur beschriebene Methode zur Herstellung von Nanopartikeln aus Polymeren [36]. Die Herstellung der Nanopartikel erfolgt dabei in zwei Schritten: zuerst wird eine Emulsion aus gelöstem Polymer in einem organischen Lösemittel, welches nicht mit Wasser mischbar ist, in einer wässrigen Phase hergestellt [43]. Anschließend wird das organische Lösemittel entfernt, wodurch das Polymer präzipitiert und Nanopartikel gebildet werden [43]. Das organische Lösemittel darf bei der *Solvent evaporation* Methode, im Gegensatz zum organischen Lösemittel bei der Nanopräzipitation, nicht mit Wasser mischbar sein, damit eine Emulsion gebildet werden kann. Die wässrige Phase enthält oft Tenside, die diese Emulsion stabilisieren [36]. Größere Mengen an Tensiden stabilisieren die Emulsion besser, wodurch kleinere Nanopartikel gebildet werden können [36]. Das organische Lösemittel kann ebenfalls die Größe der entstehenden Nanopartikel beeinflussen, es wird nach der Herstellung der Emulsion entweder durch langes Rühren oder unter vermindertem Druck

aus dem Ansatz entfernt [36]. Die Herstellung der Emulsion erfolgt meist über Ultraschall, wobei eine längere Ultraschallbehandlung zu kleineren Nanopartikeln führt [44].

2.2.6 Nanopräzipitation

Die Herstellung von Polymer-Nanopartikeln mittels Nanopräzipitation wurde zum ersten Mal 1989 von Fessi *et al.* beschrieben [45]. Zur Herstellung der Nanopartikel wird zunächst das Polymer in einem Lösemittel (organische Phase) gelöst [9]. Dieses organische Lösemittel muss, im Gegensatz zum organischen Lösemittel bei der *Solvent evaporation* Methode, mit dem verwendeten nicht-Lösemittel (meist eine wässrige Phase) mischbar sein [9]. Dann wird die Polymerlösung mit dem nicht-Lösemittel vermischt, wodurch spontan Nanopartikel entstehen [9]. Die nicht-Lösemittel-Phase kann dabei ein Gemisch aus verschiedenen nicht-Lösemitteln sein und darüber hinaus Tenside enthalten [36]. Die Zugabe von Tensiden ist nicht unbedingt erforderlich, beeinflusst aber die Größe der Nanopartikel und kann deren Agglomeration verhindern [36]. Das Lösemittel kann aus dem Ansatz entweder durch ständiges Rühren in einem offenen Gefäß oder unter vermindertem Druck entfernt werden [8, 46-48]. Besonders die Bedingungen, mit denen die Lösemittelphase zur nicht-Lösemittel-Phase gegeben wird (Zugabegeschwindigkeit, Rührgeschwindigkeit der wässrigen Phase und Verhältnis von organischer zu wässriger Phase) beeinflussen die Größe der Nanopartikel [36].

Die Bildung von Nanopartikeln erfolgt dabei in drei Schritten, zuerst erfolgt die Kernbildung (Nukleation), dann folgt das Wachstum und abschließend die Aggregation der Partikel [9]. Die Kernbildung erfolgt, wenn Polymere in einem Lösemittel mit einem nicht-Lösemittel vermischt werden, je schneller diese Vermischung ist, desto mehr Kerne werden gebildet [9]. Die Antriebskraft hierfür ist die Übersättigung, das heißt, dass das Verhältnis der Polymerkonzentration zur Löslichkeit des Polymers im Lösemittelgemisch hoch ist [9]. Die Übersättigung bestimmt dabei auch die Kernbildungsrate, wobei die lokale Übersättigung und damit auch die lokale Kernbildungsrate von der Strömungsdynamik und der Durchmischung von Lösemittel und nicht-Lösemittel abhängig sind [9]. Eine schlechte Durchmischung sorgt für eine geringe Kernbildungsrate,

wodurch wenige, große Partikel entstehen [9]. Bei einer guten Durchmischung ist die Kernbildungsrate hoch, wodurch viele, kleine Partikel entstehen [9]. Nach der Kernbildung folgt das Wachstum der Nanopartikel [9]. Dabei lagern sich einzelne, freie Polymere aus der übersättigten Lösung an die Oberfläche der Kerne an [9]. Wenn Partikel kollidieren, deren Stabilität nicht hoch genug ist, um weiter als einzelne Partikel zu bestehen, kommt es zur anschließenden Aggregation der Nanopartikel [9]. Auch hierdurch steigt der Durchmesser der Nanopartikel [9].

Die Aggregation kann verringert werden, indem die Konzentration der Partikel gering gehalten wird, da dadurch die Wahrscheinlichkeit einer Partikelkollision verringert wird. Die Kernbildungsrate kann auf verschiedene Weisen beeinflusst werden. Eine schnellere Durchmischung sorgt für eine größere Kernbildungsrate, da die lokale Übersättigung größer ist und somit mehr Kerne entstehen [9]. Dadurch werden insgesamt kleinere Nanopartikel gebildet, da das Wachstum durch die Erschöpfung des Polymers limitiert ist [9]. Dies gilt nur, bis die Mischzeit der Zeit für die Kernbildung entspricht [9]. Dann führt auch eine schnellere Durchmischung nicht zu einer weiteren Reduktion der Partikelgröße, da die Anzahl der gebildeten Kerne bereits maximal ist und das Wachstum der Partikel entsprechend gleich bleibt [9]. Die kritische Mischzeit ist dabei abhängig von der Polymerkonzentration, liegt aber im Bereich von Millisekunden [9]. Auch die Grenzflächenspannung zwischen den bereits gebildeten Polymer-Nanopartikeln und dem Lösemittel-nicht-Lösemittelgemisch beeinflusst die Kernbildungsrate, je geringer die Grenzflächenspannung ist, desto höher ist die Kernbildungsrate [9]. Zusätzlich beeinflusst auch das Verhältnis des Volumens von nicht-Lösemittel zu Lösemittel die Kernbildungsrate [9]. Je größer das Verhältnis von nicht-Lösemittel zu Lösemittel ist, desto geringer wird die Löslichkeit des Polymers und desto höher ist die Übersättigung, dadurch wiederum steigt die Kernbildungsrate und kleinere Nanopartikel entstehen [9]. Gleichzeitig werden die Partikel bei der Verwendung einer größeren Menge an nicht-Lösemittel stärker verdünnt und eine Aggregation der Partikel wird dadurch unwahrscheinlicher [9]. Die Polymerkonzentration beeinflusst ebenfalls die Größe der Nanopartikel [9]. Wird eine hohe Polymerkonzentration genutzt, entstehen größere Partikel, da das Partikelwachstum im Gegensatz zur Kernbildung begünstigt

wird, zudem entstehen bei höheren Polymerkonzentrationen Nanopartikel-Suspensionen mit höheren Partikeldichten, wodurch die Wahrscheinlichkeit einer Aggregation erhöht werden kann [9].

Die Durchmischung von Lösemittel und nicht-Lösemittel ist ein besonders wichtiger Faktor, der die Größe der Nanopartikel beeinflusst, sie muss demnach besonders beachtet werden. Für die Durchmischung können beispielsweise Mischreaktoren, z. B. *confined impinging jets* Reaktoren, in denen das Lösemittel und das nicht-Lösemittel über zwei Einlässe in eine Mischkammer geleitet werden, genutzt werden [9]. Hong *et al.* und Operti *et al.* nutzen für die Durchmischung mikrofluidische Mischkammern, diese werden in folgendem Unterkapitel näher beschrieben [49, 50].

Mikrofluidik zur Herstellung von Nanopartikeln mittels Nanopräzipitation

Die Herstellung von Nanopartikeln mittels Nanopräzipitation mit Hilfe von mikrofluidischen Systemen erfolgt, wie die klassische Nanopräzipitation, durch das Mischen einer organischen Phase (Lösemittel) mit darin gelöstem Polymer und einer wässrigen Phase (nicht-Lösemittel) [49, 50]. Die Durchmischung findet jedoch nicht in einfachen Reaktionsgefäßen, sondern in mikrofluidischen Kanälen statt. Im nicht idealen Batch-Verfahren können die Reaktionspartner nicht zeitgleich ideal durchmischt werden, es gibt immer Volumenelemente, die länger durchmischt werden, als andere. In der Mikrofluidik hingegen ist die Mischzeit für alle Volumenelemente annähernd gleich lang. Während die Durchmischung und Übersättigung im Batch-Verfahren heterogen und schwer zu steuern sind, sind sie in der Mikrofluidik kontrolliert und homogen [51]. Die Strömung in mikrofluidischen Systemen ist normalerweise laminar, daher beruht die Durchmischung der zwei Flüssigkeiten lediglich auf molekularer Diffusion. Ein Vorteil der mikrofluidischen Systeme ist deren geringe Abmessung, wodurch die benötigte Zeit für die diffusionsgetriebene Durchmischung sehr kurz ist (im Bereich von hunderten Millisekunden) [51]. Die Durchmischung in mikrofluidischen Systemen kann auch durch aktive und passive Mischer erfolgen [51]. Aktive Mischer nutzen dabei von außen eine physikalische Kraft um die Flüssigkeiten zu mischen (z. B. Ultraschall) [51]. Pas-

sive Mischer erzeugen durch spezielle Strukturen Turbulenzen in der sonst laminaren Strömung, die den Segregationsgrad verringern und so zur Durchmischung beitragen [51]. Besonders bekannt ist der versetzt angeordnete Fischgräten-Mischer (*Staggered Herringbone Mixer*) [51]. Für die Durchmischung können jedoch beispielsweise auch Mischer genutzt werden, die Tropfen einer Lösung in einer anderen Lösung erzeugen (*droplet* Generatoren) [51]. Beispielsweise können bei der T- oder Y-Zusammenführung von zwei Mikrokanälen in einem Kanal ein nicht-Lösemittel fließen, ein zweiter Kanal, in dem das Polymer in einem Lösemittel fließt, wird in einem bestimmten Winkel an diesen Kanal angeschlossen [51]. Dadurch entstehen polymerhaltige Lösemitteltropfen im nicht-Lösemittel, welche durch den Flüssigkeitsstrom weiter transportiert und anschließend aufgefangen werden können [51]. Das Lösemittel wandert in die nicht-Lösemittel-Phase, wodurch das Polymer präzipitiert und Nanopartikel entstehen. Anschließend muss lediglich das Lösemittel aus dem Ansatz entfernt werden, entweder durch Rühren in einem offenen Gefäß oder unter vermindertem Druck [49, 50]. Die Architektur des Mikrokanals spielt in dieser Methode eine entscheidende Rolle in der Durchmischung und damit auch in der resultierenden Partikelgröße [50]. Doch auch die Flussraten des Lösemittels und des nicht-Lösemittels, sowie das Verhältnis der Flussraten ist entscheidend für die Partikelgrößen [50]. Wird die Flussrate des Lösemittels erhöht, entstehen größere Nanopartikel, die Erhöhung der Flussrate des nicht-Lösemittels resultiert in kleineren Nanopartikeln [50]. Wird das Verhältnis von Lösemittel zu nicht-Lösemittel nicht verändert, die totale Flussrate jedoch erhöht, also die Größe der polymerhaltigen Lösemitteltropfen im nicht-Lösemittel verringert, verkürzt sich die Mischzeit aufgrund kürzerer Diffusionswege und es entstehen ebenfalls kleinere Nanopartikel [50]. Sobald die Durchmischung jedoch schneller abläuft als die Partikelbildung, führt auch die Erhöhung der Flussrate zu keiner weiteren Verminderung der Partikelgröße [50].

2.3 Nanopartikel aus Polycaprolacton (PCL) für *Drug Delivery* Systeme

Polycaprolacton ist ein linearer, aliphatischer Polyester, der durch eine Ringöffnungs-Polymerisation von ϵ -Caprolacton gebildet wird (Abb. 2.5) [8, 9]. Es ist biokompatibel und nicht toxisch [8]. PCL kann vom Körper zu 6-Hydroxyhexansäure abgebaut werden, welche wiederum nicht toxisch ist und vom Körper aufgenommen oder weiter abgebaut werden kann [9]. Jedoch erfolgt dieser Abbau langsam, so dass PCL gut für die Langzeitabgabe von Wirkstoffen geeignet ist [10]. Aufgrund dieser positiven Eigenschaften wurde es von der US *Food and Drug Administration* für *Drug Delivery* Systeme zugelassen [7, 8]. PCL ist sehr hydrophob, daher ist es für die Einkapselung von hydrophoben Wirkstoffen geeignet [7]. Polycaprolacton wird häufig in *Drug Delivery* Systemen genutzt, meist jedoch als Copolymer mit hydrophilen Polymeren. Veröffentlichungen, in denen Nanopartikel aus reinem PCL hergestellt werden, gibt es trotz seiner positiven Eigenschaften lediglich wenige [7, 9, 10, 38, 43, 44, 47, 48, 52].

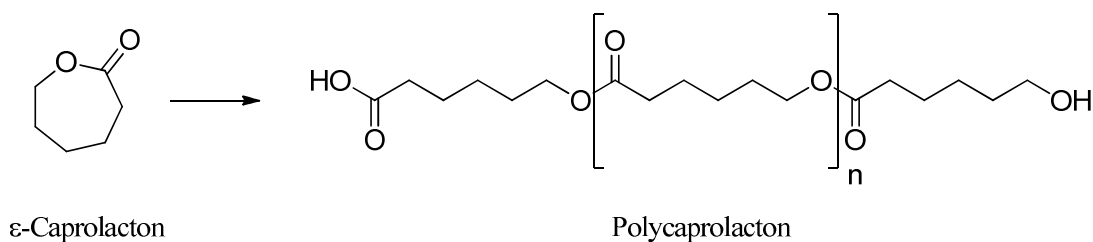


Abb. 2.5: Ringöffnungs-Polymerisation von ϵ -Caprolacton zu Polycaprolacton.

De Paz *et al.* und Prieto *et al.* haben beispielsweise mit der überkritische Fluidextraktion aus Emulsionen Nanopartikel aus reinem PCL hergestellt [7, 10, 52]. Bei dieser Variante der Nanopartikelherstellung mit Hilfe von überkritischen Fluiden wird zunächst eine Emulsion aus einem organischen Lösemittel und einer wässrigen Phase gebildet, wobei die organische Phase das PCL und, falls gewünscht, Substanzen die in die Nanopartikel eingekapselt werden sollen, enthält [7, 10, 52]. Aus der Emulsion wird anschließend das Lösemittel durch überkritische Fluide entfernt [7, 10, 52]. Mit dieser Methode konnte beispielsweise β -Carotin in PCL-Nanopartikel eingekapselt werden, die einen Durchmesser von 200-300 nm aufwiesen [10]. Prieto *et al.* haben mit dieser Methode kugel-

förmige Nanopartikel mit eingekapseltem Fischöl mit einer Größe von 6, 8 oder 73 nm hergestellt, wobei der wässrigen Phase, die zur Bildung der Emulsion genutzt wurde, verschiedene Verdickungsmittel zugesetzt wurden [7]. In einer weiteren Veröffentlichung haben ebenfalls Prieto *et al.* mittels überkritischer Fluidextraktion aus Emulsionen Vitamin E in Polycaprolacton eingekapselt, wobei die resultierenden Nanopartikel kugelförmig waren und abhängig von der Menge der genutzten Reagenzien (Vitamin E, Polycaprolacton und das Lösemittel Aceton) einen Durchmesser zwischen 8 und 276 nm aufwiesen [52].

Mit der Dialysemethode wurden bislang lediglich Nanopartikel aus PCL-Copolymeren hergestellt, jedoch nicht aus reinem PCL. Feng *et al.* konnten mit dieser Methode aus verzweigtem Methoxy-Polyethylenglykol-PCL Nanopartikel mit einer mittleren Größe von ca. 90 nm und einer nahezu sphärischen Form herstellen [53]. Jedoch konnten Vangeyte *et al.* aus Polyethylenoxid-PCL mit der Dialysemethode auch bei der Verwendung verschiedener Lösemittel lediglich große Partikel mit einem hydrodynamischen Durchmesser über einem Mikrometer und mit großen Standardabweichungen herstellen [54]. Dies zeigt, dass die Herstellung von Nanopartikeln mit dieser Methode nicht für alle Polymere geeignet ist.

Nanopartikel aus Polycaprolacton-Copolymeren wurden zudem mittels *Thin-film hydration* Methode hergestellt, hier liegt der hydrodynamische Durchmesser zwischen 20 und 130 nm [40-42]. In der Literatur gibt es keine Veröffentlichungen zu Polycaprolacton-Nanopartikeln, die mit der *Salting out* Methode hergestellt wurden. Behera *et al.* und Byun *et al.* haben mit der *Solvent evaporation* Methode bereits Nanopartikel aus Polycaprolacton hergestellt, deren Größe jedoch zwischen 220 und 1100 nm liegt [43, 44].

Auch mittels Nanopräzipitation aus reinem PCL hergestellte Nanopartikel werden bereits in der Literatur beschrieben. In vielen dieser beschriebenen Herstellungsmethoden erfolgt die Zugabe von Lösemittel zum nicht-Lösemittel durch langsames Zutropfen in eine rührende nicht-Lösemittelphase, jedoch kann mit dieser Methode keine einheitlich lange Durchmischung erfolgen [47, 48]. Die in der Literatur beschriebenen, mit dieser Methode hergestellten Polycaprolacton-Nanopartikel weisen eine Größe zwischen 220

und 245 nm auf [48]. Es gibt jedoch auch Methoden, in denen die Durchmischung mit speziellen Mischkammern erfolgt, wodurch die Partikelgröße besser kontrolliert werden kann [9, 49, 50]. Lince *et al.* nutzen dabei einen *confined impinging jets* Reaktor, in dem das Lösemittel und das nicht-Lösemittel über zwei Einlässe in eine Mischkammer geleitet werden [9]. Die Flussrate und damit auch die Mischzeit ist dabei variabel, wodurch auch die Größe der Nanopartikel kontrolliert werden kann [9]. Lince *et al.* waren so in der Lage Polycaprolacton-Nanopartikel in einer Größe von ca. 70-1200 nm herzustellen [9].

Die in der Literatur beschriebenen Nanopartikel aus reinem PCL haben, je nach Herstellungsmethode eine Größe zwischen 6 und 1200 nm. Damit ist ein Teil der Nanopartikel zu klein und ein Großteil der Nanopartikel für den Einsatz in *Drug Delivery* Systemen zu groß. Lediglich Prieto *et al.* und Lince *et al.* konnten Nanopartikel mit einer Größe zwischen 20 und 100 nm herstellen [7, 9, 52]. Dabei ist jedoch entweder eine Verwendung von überkritischen Fluiden oder einer speziellen Mischapparatur bei der Nanopräzipitation nötig [7, 9, 52]. In dieser Arbeit soll daher versucht werden, auch mit anderen Methoden und durch Methodenoptimierung Nanopartikel aus reinem PCL für die Verwendung in DDS zu erzeugen.

3 Experimente zur Entwicklung PCL-basierter Nanopartikel für Targeted Drug Delivery Systeme

Bei der Auswahl eines geeigneten Trägermaterials für *Drug Delivery* Systeme (DDS) müssen besonders die Biokompatibilität, Bioabbaubarkeit und die Eigenschaft als Trägermaterial für Wirkstoffe beachtet werden. Das hydrophobe Polymer Polycaprolacton (PCL) wird in der Literatur als Copolymer mit hydrophilen Polymeren bereits oft für den Einsatz in *Drug Delivery* Systemen genutzt. Beispiele, in denen reines PCL zur Nanopartikelherstellung genutzt wird, gibt es jedoch nur wenig [9, 38, 43, 44, 47, 48]. Diese bereits beschriebenen Nanopartikel aus reinem PCL haben zudem eine Größe zwischen 6 und 1200 nm und sind daher für den Einsatz in *Drug Delivery* Systemen zu groß bzw. zu klein, lediglich Lince *et al.* und Prieto *et al.* konnten mit speziellen Mischapparaturen bzw. überkritischen Fluiden Nanopartikel mit einer Größe von unter 100 nm herstellen [7, 9, 38, 43, 44, 47, 48, 52]. PCL ist jedoch ein vielversprechendes Polymer für *Drug Delivery* Systeme, da es biokompatibel, bioabbaubar und nicht toxisch ist [8]. Auch das Abbauprodukt 6-Hydroxyhexansäure kann vom Körper aufgenommen oder abgebaut werden und ist daher ebenfalls unschädlich [9]. Aufgrund dieser positiven Eigenschaften wurde PCL von der US *Food and Drug Administration* für biomedizinische Anwendungen und für *Drug Delivery* Systeme im Menschen zugelassen [7, 8, 13].

Nanopartikel, die im *Drug Delivery* eingesetzt werden sollen, sollten größer als 20 nm sein, da kleinere Nanopartikel (< 6 nm) entweder direkt über die Nieren ausgeschieden werden, oder zu schnell aus dem Tumorgewebe freigesetzt werden [5, 6]. Damit die Nanopartikel jedoch möglichst tief in das Tumorgewebe eindringen können, sollte ihre Größe 100 nm nicht überschreiten [5].

Ziel dieser Arbeit ist daher die Herstellung von Nanopartikeln aus Polycaprolacton ohne weitere Copolymere zur Anwendung in *Drug Delivery* und *Targeted Drug Delivery* Systemen, da lediglich ein DDS aus reinem PCL und im erforderlichen Größenbereich von 20-100 nm in der Literatur beschrieben ist [7].

3.1 Herstellung und Charakterisierung von Polycaprolacton

Polycaprolacton kann in verschiedenen Längen hergestellt werden. Dabei sind die Eigenschaften des Polycaprolactons auch vom Polymerisationsgrad abhängig [55]. Daher wurde zunächst PCL mit verschiedenen Polymermolekülmassen hergestellt. Da die Oberfläche der Nanopartikel mit Liganden modifizierbar sein sollte, wurde während der Herstellung der Polymere eine Carboxylgruppe an die Polymere angebracht um später über diese Gruppe Liganden an die Nanopartikel zu binden.

Die Herstellung von Polycaprolacton ist in der Literatur bereits beschrieben [56]. Das lineare PCL wird dabei durch eine Ringöffnungs-Polymerisation aus ϵ -Caprolacton hergestellt [8]. Dazu wird ϵ -Caprolacton in Toluol mit etwas zugesetztem Wasser gelöst und anschließend Methansulfonsäure hinzugegeben um eine Carboxylgruppe in das Polymer einzufügen, die Reaktion erfolgt rührend bei 50 °C [56]. Die Polymerisation wird durch die Zugabe von Triethylamin gestoppt, anschließend wird das Toluol unter vermindertem Druck aus dem Ansatz entfernt [56]. Das feste Polymer wird zur Aufreinigung in Dichlormethan gelöst und in kaltem Methanol präzipitiert und gewaschen [56]. Nach anschließender Zentrifugation und Trocknung des Präzipitats kann das Polymer mittels $^1\text{H-NMR}$ analysiert werden. Dabei kann über einen Vergleich der Integrale der Protonen der Methylengruppe neben der Hydroxylgruppe (in Abb. 3.1 mit b beschriftet) und der Protonen der Methylengruppe neben dem Carbonyl-Kohlenstoff (in Abb. 3.1 mit c beschriftet) der Polymerisationsgrad des PCLs berechnet werden [57].

Durch Variation der Reaktionsbedingungen (u.a. Reaktionszeit und Menge an Methansulfonsäure; genaue Angaben in Kapitel A.7.1) wurden in dieser Arbeit drei Polymere (Ansätze 1-3) mit verschiedenen Molekülmassen hergestellt¹. Beispielhaft ist in Abb. 3.1 ein $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des PCLs welches im zweiten Ansatz hergestellt wurde dargestellt, die anderen $^1\text{H-NMR}$ -Spektren befinden sich im Anhang (Kapitel B. 1).

¹ Teilweise im Rahmen der Masterarbeit von Thassilo Haupt

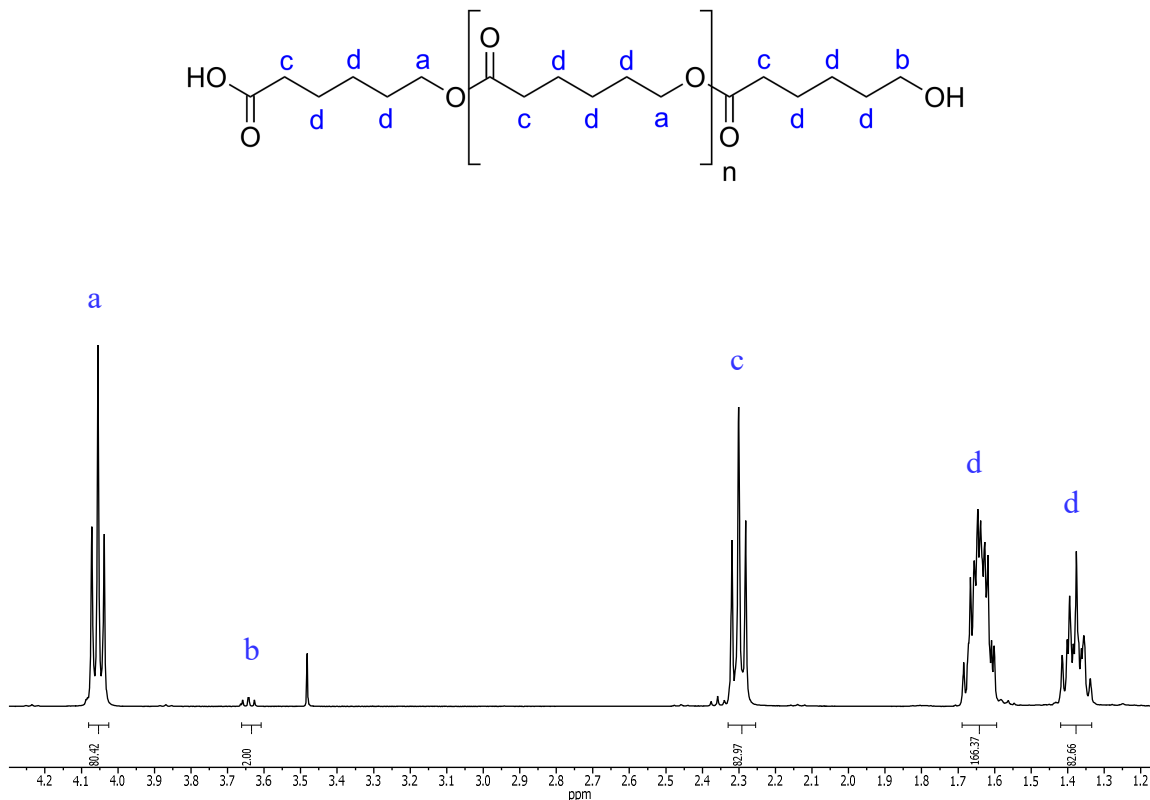


Abb. 3.1: $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , 298 K) und Strukturformel von Polycaprolacton aus Reaktionsansatz 2; die blaue Beschriftung ordnet die Gruppen den entsprechenden Peaks im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum zu. Die $^1\text{H-NMR}$ -Spektren der Polymere, die in den Ansätzen 1 und 3 hergestellt wurden, befinden sich in Anhang (Kapitel B. 1).

Das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum zeigt Signale bei den erwarteten Verschiebungen:

δ [ppm] = 4,05 (Triplett (t), $^3J_{a,d} = 6,69$ Hz, 80H, H-a), 3,64 (t, $^3J_{b,d} = 6,50$ Hz, 2H, H-b), 2,30 (t, $^3J_{c,d} = 7,51$ Hz, 83H, H-c), 1,68-1,60 (Multipllett (m), 166H, H-d), 1,42-1,34 (m, 83H, H-d).

Die Ergebnisse der $^1\text{H-NMR}$ -Messungen bestätigen, dass Polycaprolacton erfolgreich hergestellt wurde, welches lediglich einen kleinen Rest an Lösemitteln enthält (Methanol bei 3,49 ppm).

Die Integrale der Peakflächen zugehöriger Protonen der Methylengruppen neben der Hydroxylgruppe und neben dem Carbonyl-Kohlenstoff stehen hier im Verhältnis von 2:82,97, sodass das erzeugte Polymer neben den beiden endständigen Monomereinheiten im Mittelteil durchschnittlich aus 39,49 Einheiten besteht. Für dieses Polymer ergibt

sich daher die mittlere Molekülmasse von $4753,3 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ (genauere Erklärungen zur Berechnung in Kapitel B. 1). In verschiedenen Reaktionsansätzen wurden so weitere Polymere mit Molekülmassen von $2081,7 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ und $2318,6 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ für die Synthese von Nanopartikeln erzeugt (Tabelle 3.1).

Tabelle 3.1: Mittlere Molekülmasse und Bezeichnung der hergestellten Polymere

Ansatz Nr.	Molekülmasse PCL [Da]	Benennung des Polymers
1	2081,7	PCL _{2,1}
2	4753,3	PCL _{4,8}
3	2318,6	PCL _{2,3}

Aus diesen Polymeren sollte mit verschiedenen Verfahren die Herstellung von Nanopartikeln optimiert werden. Letchford *et al.*, sowie weitere in der Literatur beschriebenen Arbeiten haben gezeigt, dass in Nanopartikel, die aus Copolymeren mit längeren PCL-Einheiten hergestellt wurden, mehr hydrophobe Moleküle eingekapselt werden können, als in Nanopartikel die mit kürzeren PCL-Einheiten hergestellt wurden [58-60]. Für die weiteren Experimente wurde daher das PCL mit einer Molekülmasse von 4,8 kDa genutzt, da es aufgrund der höchsten Molekülmasse theoretisch auch am meisten Wirkstoff einkapseln kann.

3.2 Vergleich und Optimierung verschiedener Verfahren zur Herstellung von PCL-Nanopartikeln

Für die Synthese von Nanopartikeln aus Polymeren stehen verschiedene Verfahren zur Verfügung. In der Literatur sind bereits einige Verfahren für die Erzeugung von Nanopartikeln aus PCL und anderen Polymeren beschrieben (siehe Kapitel 2.2). Zu diesen Verfahren gehören unter anderem die Überkritische Fluid Technologie, die Dialysemethode, das *Salting out*, die *Thin-film hydration* Methode und die Nanopräzipitation. Die Herstellung von Nanopartikeln mittels *Thin-film hydration* Methode und Nanopräzipitation erfordert keinen großen apparativen Aufwand, sodass für die Herstellung von Na-

nanopartikeln aus PCL diese Verfahren genutzt werden sollten. Die Nanopartikel aus den beschriebenen Verfahren sind jedoch bei dem Großteil der Publikationen mit über 100 nm zu groß für den Einsatz in *Drug Delivery* Systemen. Daher wurde überprüft, inwieweit einige dieser Verfahren (*Thin-film hydration* Methode, sowie Nanopräzipitation mit Mikrofluidik und im Batch-Verfahren) für die Synthese von Nanopartikeln der Größe zwischen 20 und 100 nm optimiert werden können.

3.2.1 Herstellung von PCL-Nanopartikeln mit der *Thin-film hydration* Methode

Bei der *Thin-film hydration* Methode wird durch das Lösen und direkte Trocknen der Polymere ein Polymerfilm auf der Oberfläche eines Gefäßes erzeugt [61, 62]. Dieser Polymerfilm wird anschließend mit einem wässrigen Puffer rehydriert, wobei in vielen Fällen eine erhöhte Temperatur sowie Ultraschall genutzt werden [61]. Dabei gibt es viele mögliche Variationen, u.a. kann die Wahl des Lösemittels, das Material der Oberfläche, auf der der Polymerfilm gebildet wird, die Wahl des Puffers, der Temperatur und der Zeiten für Rühren und Ultraschallbehandlung einen Einfluss auf die Größe der Nanopartikel haben [61].

In der Literatur wurden bereits Synthesen von Nanopartikeln mit der *Thin-film hydration* Methode beschrieben, die Polycaprolacton als Copolymer einsetzen [63, 64]. Die mit dem Polyethylenglykol-PCL (PEG-PCL) hergestellten Nanopartikel wiesen einen mittleren Durchmesser von ca. 90 und 130 nm auf [63, 64]. Diese haben jedoch aufgrund der Kombination des PCLs mit hydrophilen Polymeren (PEG) im Vergleich zum reinen PCL einen größeren hydrophilen Anteil. Mit einer Größe von 90 nm wären sie für das *Drug Delivery* geeignet, daher wurde versucht, auch mit reinem PCL Nanopartikel mit der *Thin-film hydration* Methode herzustellen.

Variation des Lösemittels

Das Lösemittel beeinflusst in der *Thin-film hydration* Methode die Ausdehnung des Polymers, sodass das Polymer abhängig vom verwendeten Lösemittel eine Form annehmen kann, die zwischen einer linearen und einer knäuel-artigen Struktur liegt [61]. Daher kann die Wahl des Lösemittels die Herstellung von Nanopartikeln beeinflussen. In dieser Arbeit wurde die *Thin-film hydration* Methode zunächst in Anlehnung an Hoang *et al.* durchgeführt [62]. Dafür wurden 6,3 mg des PCL_{4,8} in 250 µl der Lösemittel Acetonitril (ACN) oder Dimethylformamid (DMF) in einem Reagiergefäß aus Polypropylen gelöst (Konzentration des PCL_{4,8} ist 5,3 mM). Das Lösemittel wurde anschließend unter vermindertem Druck bei 45 °C über Nacht entfernt. Anschließend wurde 1 ml 60 °C warmes 0,1x PBS (pH 7,4; 17,7 mM NaCl, 0,3 mM KCl, 1,0 mM Na₂HPO₄, 0,2 mM KH₂PO₄) in die Reaktionsgefäße gegeben und schüttelnd für 3 Tage bei 60 °C inkubiert. Die Homogenisierung der Ansätze erfolgte im Ultraschallbad für 1 Stunde und bei 60 °C. Um die Salze des Puffers zu entfernen wurden die Ansätze abschließend für 24 Stunden gegen deionisiertes Wasser dialysiert. Der hydrodynamische Durchmesser wurde mittels dynamischer Lichtstreuung (DLS) in einer dreimaligen Messung bestimmt (Abb. 3.2).

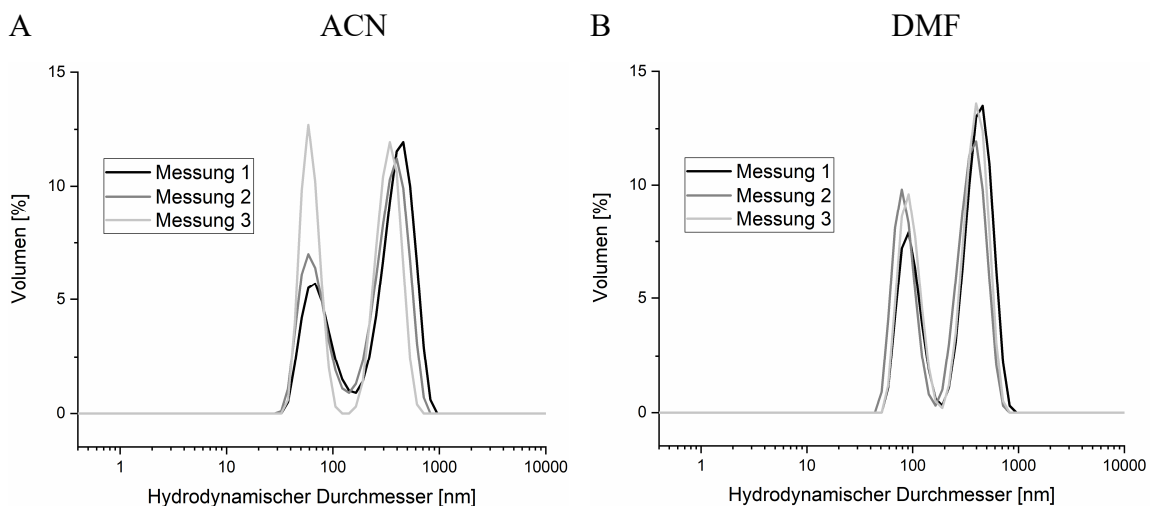


Abb. 3.2: Größenverteilung der volumengewichteten hydrodynamischen Durchmesser von Nanopartikeln aus PCL_{4,8}, die mit Acetonitril (A) bzw. mit Dimethylformamid (B) als Lösemittel mittels *Thin-film hydration* Methode hergestellt wurden.

Die Reaktionsansätze enthalten jeweils Nanopartikel mit einem hydrodynamischen Durchmesser zwischen 30-150 nm, sowie Nanopartikel zwischen 200-800 nm, unabhängig davon, ob Acetonitril oder Dimethylformamid als Lösemittel verwendet wurde. Ein Teil der Nanopartikel ist also prinzipiell im gewünschten Größenbereich von 20-100 nm, dennoch ist der Großteil der Nanopartikel zu groß. Daher können jedoch die Nanopartikel aus beiden Ansätzen nicht für das *Drug Delivery* genutzt werden. Wird Acetonitril als Lösemittel genutzt, haben die Nanopartikel mit 379 nm einen etwas kleineren mittleren hydrodynamischen Durchmesser als die Nanopartikel, die mit Dimethylformamid hergestellt wurden (413 nm). Daher wurde Acetonitril für die weiteren Experimente genutzt. Die Wahl des Lösemittels hat in diesen Experimenten nur einen geringen Einfluss auf den hydrodynamischen Durchmesser der Nanopartikel. Daher wurde im nächsten Schritt das Material variiert, auf dem der *Thin-film* aufgebracht wird.

Variation des Oberflächenmaterials

Da auch die Wahl des Oberflächenmaterials für den Polymerfilm die Herstellung von Nanopartikeln mit der *Thin-film hydration* Methode beeinflussen kann, wurde als Alternative für die hydrophoben Polypropylen-Reagiergefäße eine hydrophile Glasoberfläche genutzt. Da der hydrophile Teil des Polymers deutlich kleiner ist, als der hydrophobe Teil können weniger Wechselwirkungen zwischen Polymer und Oberflächenmaterial entstehen. Dadurch ist vermutlich die Orientierung des Polymers anders und die Stärke der Bindung des PCLs zur Glasoberfläche ist schwächer als zur Polypropylenoberfläche.

Auch bei der Herstellung des Polymerfilms auf der Glasoberfläche wurden zunächst 250 µl einer 5,3 mM PCL_{4,8} Lösung in Acetonitril hergestellt. Anschließend wurde diese jedoch in einen Glaskolben gegeben und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Die Polymerschicht wurde hier, im Gegensatz zur Herstellung des Polymerfilms im Reagiergefäß, mit 5 ml 0,1x PBS, pH 7,4, rührend bei 60 °C rehydriert, da erst bei diesem Volumen der gesamte Polymerfilm mit Flüssigkeit benetzt wurde. Zusätzlich wurde der Einfluss einer verkürzten rührenden Rehydrierung untersucht (3 Stunden vs.

24 Stunden). Anschließend erfolgten eine Homogenisierung mit Ultraschall, eine Dialyse gegen deionisiertes Wasser und die Analyse der Partikel mittels DLS (Abb. 3.3).

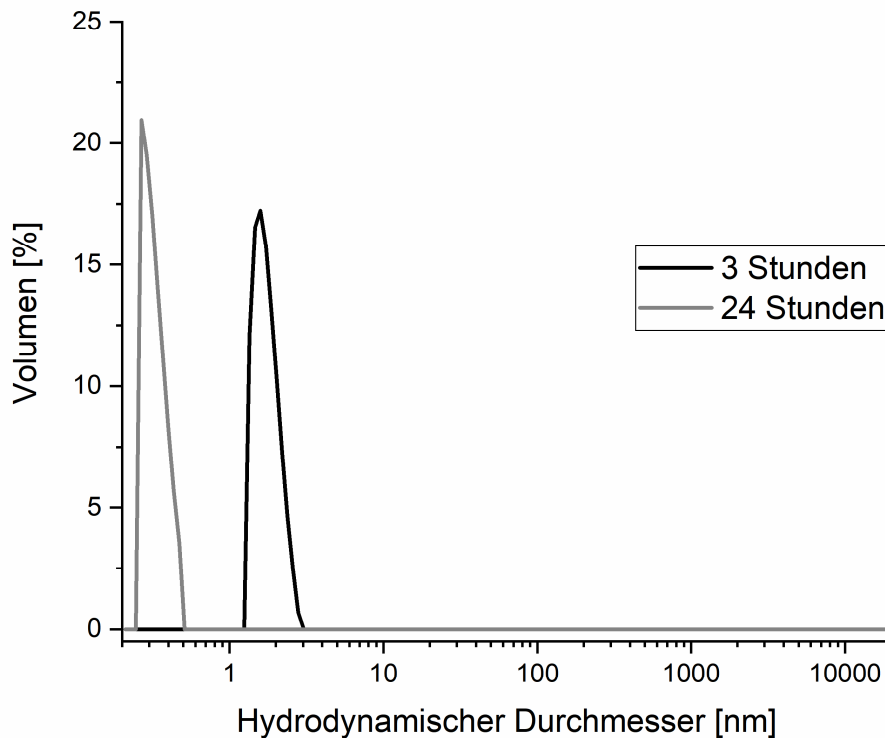


Abb. 3.3: Größenverteilung der volumengewichteten hydrodynamischen Durchmesser der PCL_{4,8}-NP, die im Glaskolben mit der *Thin-film hydration* Methode mit 0,1x PBS hergestellt wurden (vergleichend: rührende Rehydrierung des Polymerfilms für 3 bzw. 24 Stunden).

Die Nanopartikel, deren Polymerfilm auf einer Glasoberfläche hergestellt wurde, zeigen im Gegensatz zu den Nanopartikeln, die auf der Polypropylen-Oberfläche hergestellt wurden, eine homogene Größenverteilung. Zudem sind diese Nanopartikel mit einem mittleren hydrodynamischen Durchmesser von 0,3 bzw. 1,8 nm deutlich kleiner als die Nanopartikel, für deren Herstellung die Polypropylen-Oberfläche genutzt wurde (379 nm). Neben der veränderten Hydrophobizität des Oberflächenmaterials könnte auch die Gesamtgröße der zur Verfügung stehenden Oberfläche Einfluss auf die finale Größe der Nanopartikel haben. In dem Polypropylen-Gefäß beträgt die Oberfläche bei

einer Befüllung mit 250 μl lediglich etwa 2 cm^2 , während im Glaskolben der Polymerfilm auf etwa 11 cm^2 ausgebildet wurde. Dadurch kann in den Glasgefäßen ein dünnerer Polymerfilm entstehen. Einen weiteren Einfluss könnte das eingesetzte Volumen des PBS-Puffers haben. Im Glasgefäß musste mehr Puffer eingesetzt werden, um den gesamten Polymerfilm zu bedecken, wodurch auch das Polymer stärker verdünnt wurde. Die mittleren volumengewichteten hydrodynamischen Durchmesser der Nanopartikel sind mit 0,3 nm bei einer Rührzeit von 24 Stunden deutlich kleiner als die Nanopartikel, bei deren Herstellung eine Rührzeit von 3 Stunden genutzt wurde (1,8 nm). Eine längere Rührzeit führt demnach zu kleineren Nanopartikeln.

Dennoch ist die Größe der Partikel in beiden Ansätzen für einen Einsatz als *Drug Delivery* System zu klein, da Partikel mit einer Größe von unter 6 nm direkt über die Nieren ausgeschieden werden [5]. Salze können die Löslichkeit von wasserunlöslichen Polymeren beeinflussen [65]. Hydrophobe Polymere haben in Wasser aufgrund der Struktur des Wassers eine hohe Affinität zueinander [65]. Werden dem Wasser jedoch strukturbrechende Substanzen (z. B. große Ionen aus Salzen wie I^- und Br^-) zugegeben, wird die hydrophobe Interaktion der Polymere untereinander geschwächt und die Polymere können sich entfalten und werden dadurch löslicher (*salting-in*) [65]. Kleine und stark geladene Ionen, wie zum Beispiel OH^- , H^+ , Na^+ oder PO_4^{3-} , verstärken hingegen die hydrophobe Interaktion der Polymere untereinander, da sie die Struktur des Wassers unterstützen (*salting-out*) [65, 66]. Dadurch verringern sie die Löslichkeit der Polymere im Wasser [65]. PBS-Puffer enthält hauptsächlich Ionen, die einen *salting-out* Effekt erhöhen, in einem nächsten Schritt wurde daher anstelle von PBS-Puffer deionisiertes Wasser als wässrige Phase zur Rehydratation des Polymerfilms genutzt. Da bei der Nutzung von deionisiertem Wasser zur Rehydratation keine Salze in den Reaktionsansatz gelangen, entfiel bei der Herstellung der Nanopartikel die Dialyse nach der Ultraschallbehandlung, alle anderen Schritte in der Herstellung der Nanopartikel wurden nicht verändert. Der hydrodynamische Durchmesser wurde mittels dynamischer Lichtstreuung bestimmt (Abb. 3.4).

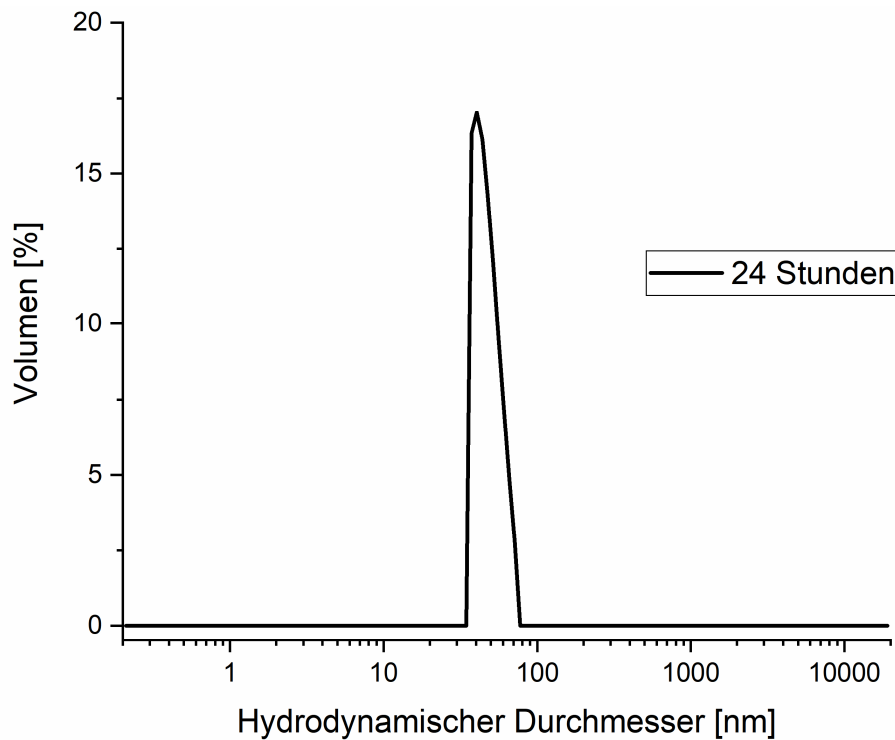


Abb. 3.4: Größenverteilung des volumengewichteten hydrodynamischen Durchmessers der PCL_{4,8}-NP, die im Glaskolben mit der *Thin-film hydration* Methode mit deionisiertem Wasser hergestellt wurden; Rehydrierung des Polymerfilms für 24 Stunden.

Der mittlere volumengewichtete hydrodynamische Durchmesser der Nanopartikel liegt bei 48 nm und weist mit einem Polydispersitätsindex (PDI) von 0,33 eine schmale Größenverteilung auf. Vermutlich haben bei der Verwendung von PBS zur Rehydration also die Salze die Bildung der Nanopartikel in der gewünschten Größe gestört. Da bei der Verwendung von deionisiertem Wasser der Durchmesser im gewünschten Größenbereich liegt, wurde die Reproduzierbarkeit dieser Methode überprüft, indem mit dieser Methode in zwei weiteren Ansätzen Nanopartikel hergestellt wurden (Tabelle 3.2).

Tabelle 3.2: Mittlere volumengewichtete hydrodynamische Durchmesser von PCL_{4,8}-NP, die mittels *Thin-film hydration* Methode hergestellt wurden, die Rehydration erfolgte für 24 Stunden mit deionisiertem Wasser

	Ansatz 1	Ansatz 2	Ansatz 3	Mittel- wert	Standard- abweichung
Volumengewichteter hydrodynamischer Durchmesser [nm]	48	50	271	123	128

Ein Ansatz enthält mit einem hydrodynamischen Durchmesser von 271 nm deutlich größere Nanopartikel als die beiden anderen Ansätze (48 und 50 nm). Die Methode zur Herstellung von Nanopartikeln im gewünschten Größenbereich ist prinzipiell geeignet, wobei jedoch teilweise zu große Nanopartikel hergestellt werden. Mögliche Ursachen könnten der Eintrag von Fremdpartikeln mit den Lösungen zur Nanopartikelherstellung sein. Außerdem ist der apparative Aufwand Nanopartikel mit dieser Methode herzustellen sehr groß. Die Glaskolben müssen in einem Heizschrank bei 60 °C auf einem Magnetrührer inkubiert werden, sodass die Herstellung mehrerer Ansätze parallel schwierig ist. Eine Herstellungszeit von mehr als 24 Stunden pro Ansatz ist ebenfalls lang.

Daher wurde für die weitere Optimierung der Herstellung der Polycaprolacton-Nanopartikel ein anderes, schnelleres Verfahren gewählt.

3.2.2 Herstellung von PCL-Nanopartikeln mittels Nanopräzipitation in einem mikrofluidischen Mischsystem

Im Gegensatz zur *Thin-film hydration* Methode entstehen die Nanopartikel während der Nanopräzipitation direkt in einem flüssig-flüssig-System aus einer organischen Polymerlösung und einer wässrigen Trägerlösung. Nach der Durchmischung der beiden Phasen diffundiert das organische Lösemittel in die wässrige Lösung, dabei präzipitiert das Polymer und Nanopartikel entstehen. Die Durchmischung von organischer und wässriger Phase bestimmt dabei die lokale Übersättigung des Polymers und damit auch, wie hoch die Kernbildungsrate und schließlich die Anzahl und Größe der resultierenden Nanopartikel ist (für eine detaillierte Beschreibung der Partikelbildung siehe Kapitel 2.2.6). Für die Mischung von gelöstem Polymer in einem organischen Lösemittel und wässriger Phase mit mikrofluidischen Systemen konnte demonstriert werden, dass die resultierenden Nanopartikel eine definierte Größe aufweisen, die kleiner ist, als wenn die Nanopartikel mit anderen Mischmethoden hergestellt werden [49]. Dies liegt zum einen daran, dass für alle Volumenelemente eine kontrollierte, einheitliche Durchmischung erfolgt und zum anderen an den geringen Abmessungen der mikrofluidischen Kanäle, wodurch kurze Diffusionswege entstehen und die Diffusion von organischem

Lösemittel in die wässrige Phase entsprechend schnell erfolgen kann. Aufgrund dieser Vorteile wurde die Herstellung von Polycaprolacton-Nanopartikeln mit dieser Methode untersucht. Dafür wurde der NanoAssemblr® Benchtop der Firma Precision Nanosystems Inc. genutzt. Dieser ist ein kommerzielles System, welches die Plattform für eine mikrofluidische Durchmischung darstellt. Die Durchmischung erfolgt in einer ebenfalls kommerziell erhältlichen Kartusche, die zwei Eingänge für Flüssigkeiten besitzt und mehrfach verwendet werden kann. Die genauen Spezifikationen der Mischkammer sind dabei jedoch nicht öffentlich zugänglich. Das System pumpt die vorgelegten Flüssigkeiten über zwei getrennte Spritzenpumpen durch die Mischkammer zum gemeinsamen Ausgang, wobei die totale Flussrate (*total flow rate* TFR) und das Flussverhältnis zwischen den beiden Lösungen (*flow rate ratio* FRR) variiert werden können. Optional können die Spritzen in einem Heizblock temperiert werden. Da sich für den optimalen Betrieb der Mischkammer zunächst die korrekten Strömungen ausbilden müssen, werden die ersten 250 μl und die letzten 50 μl des Gemisches verworfen. Im Anschluss an die Durchmischung muss das organische Lösungsmittel aus dem Gemisch entfernt werden, danach liegen die Nanopartikel in wässriger Lösung vor und können mittels dynamischer Lichtstreuung untersucht werden.

Für die Herstellung von Nanopartikeln mit dem NanoAssemblr® Benchtop wurde eine 80 μM PCL_{4,8} Lösung in Acetonitril eingesetzt. Als wässrige Trägerphase wurde deionisiertes Wasser verwendet. Nachdem beide Lösungen auf 30 °C temperiert waren, wurden die Flüssigkeiten bei einer totalen Flussrate von 12 $\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$ und einem Verhältnis von 3:1 in der Mischkammer gemischt (je 3 ml Wasser + 1 ml Polymerlösung). Anschließend wurde das Acetonitril im Rotationsverdampfer entfernt und der hydrodynamische Durchmesser sowie der Polydispersitätsindex (PDI) der erzeugten Nanopartikel mittels dynamischer Lichtstreuung bestimmt (Abb. 3.5).

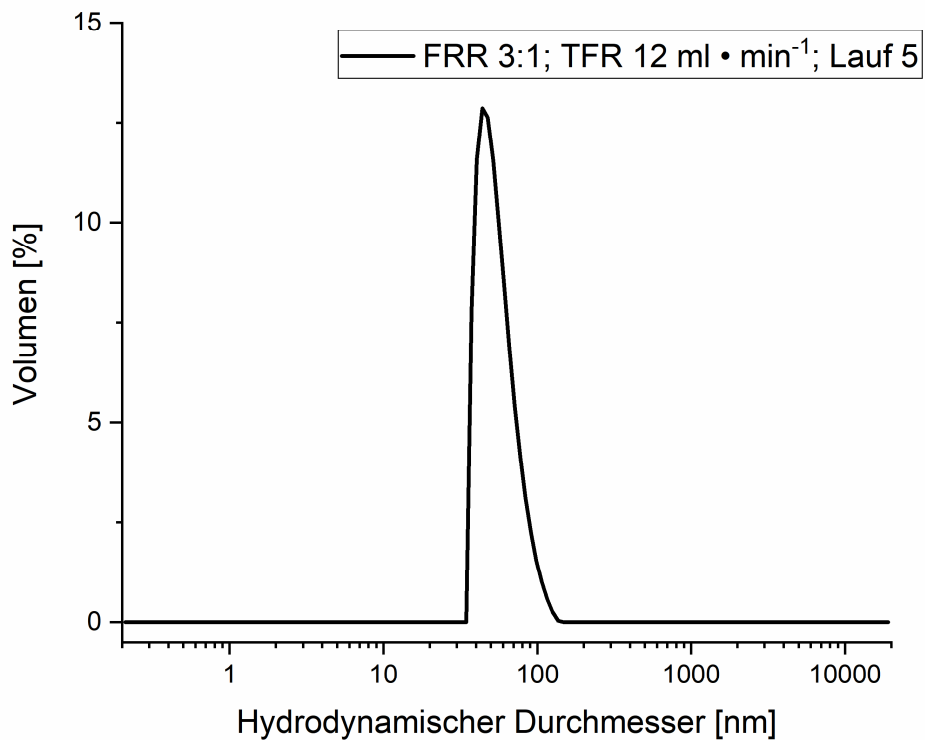


Abb. 3.5: Größenverteilung des volumengewichteten hydrodynamischen Durchmessers der PCL_{4,8}-NP, die mittels NanoAssemblr® Benchtop hergestellt wurden. Totale Flussrate: 12 ml · min⁻¹, Verhältnis Wasser/Polymerlösung: 3:1; Lauf 5 der Kartusche.

Der mittlere volumengewichtete hydrodynamische Durchmesser der erzeugten Nanopartikel beträgt 56 nm, der Polydispersitätsindex ist 0,11. Damit sind die Nanopartikel in einem Größenbereich, der für *Drug Delivery* Systeme geeignet ist und die Nanopartikel weisen zudem mit einem PDI von unter 0,3 eine schmale Größenverteilung auf. Die Form der Nanopartikel wurde mittels Transmissionselektronenmikroskopie untersucht (Abb. 3.6).

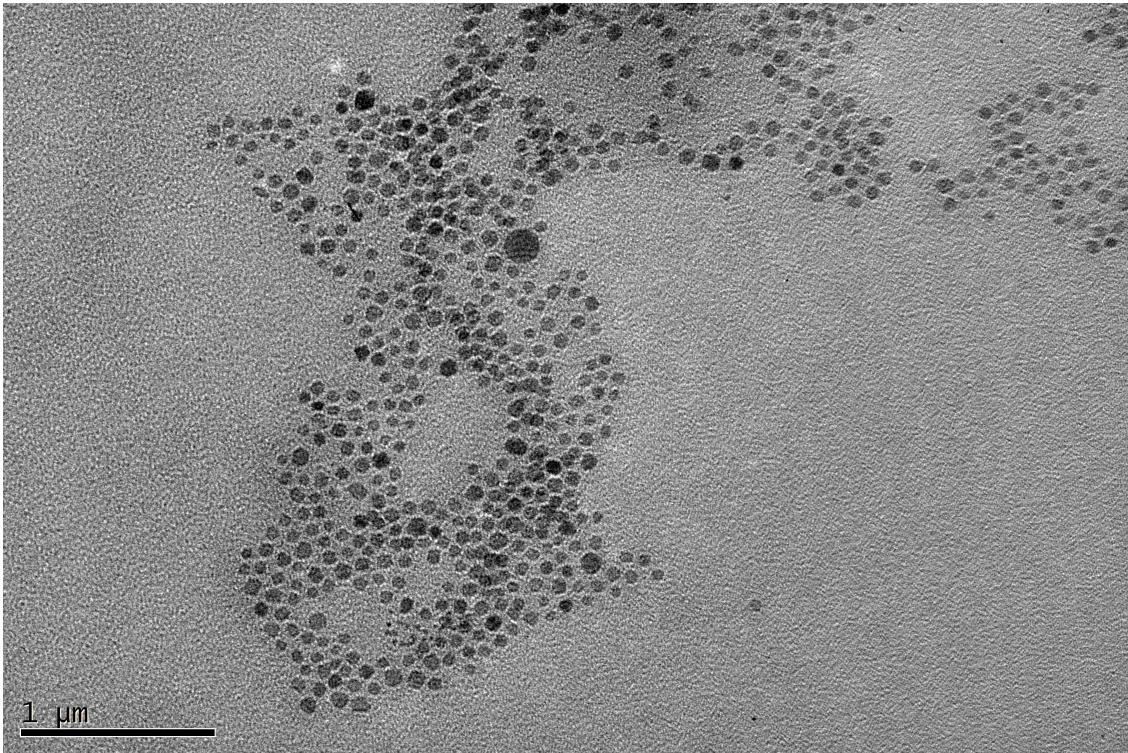


Abb. 3.6: Transmissionselektronenmikrograph der PCL_{4,8}-NP, die mit dem NanoAssemblr® Benchtop System hergestellt wurden. Die Messung erfolgte bei 120 kV im Hellfeld-Modus.

Die Nanopartikel zeigen eine sphärische Form mit gleichmäßigen Durchmessern (ca. 70 nm) und weisen keine Aggregate auf. Nach diesen vielversprechenden Ergebnissen wurde in den nächsten Arbeitsschritten die Reproduzierbarkeit überprüft. Die Firma Precision Nanosystems Inc. gibt an, dass die Kartusche bis zu 20 Mal verwendet werden kann. Da mikrofluidische Systeme jedoch empfindlich auf Ablagerungen an der Oberfläche oder das Ablösen der Oberflächenbeschichtung reagieren, soll getestet werden, ob die Kartusche auch in späteren Läufen noch Nanopartikel im gewünschten Größenbereich produziert. Dazu wurden in zwei verschiedenen Kartuschen mehrfach Nanopartikel hergestellt (Abb. 3.7).

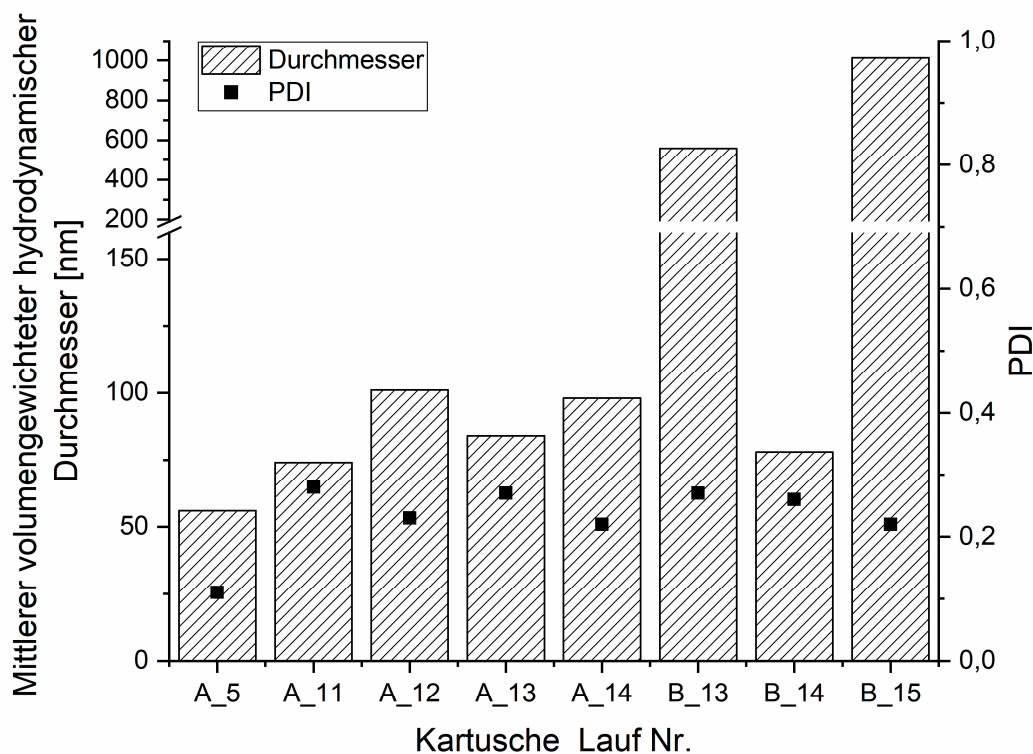


Abb. 3.7: Vergleich der mittleren volumengewichteten hydrodynamischen Durchmesser und der Polydispersitätsindizes der PCL_{4,8}-NP, die mit dem NanoAssemblr® Benchtop System hergestellt wurden. Totale Flussrate: 12 ml · min⁻¹, Verhältnis Wasser/Polymerlösung: 3:1. Variiert wurde die Laufnummer der Kartuschen A und B.

Die mittleren volumengewichteten hydrodynamischen Durchmesser der Nanopartikel, die mit Kartusche A hergestellt wurden, liegen zwischen 56 und 101 nm, dabei ist der hydrodynamische Durchmesser bei einer späteren Laufnummer tendenziell größer. Die hydrodynamischen Durchmesser der Nanopartikel, die mit Kartusche B hergestellt wurden, liegen dagegen zwischen 78 und 1013 nm, streuen also viel stärker. Für alle erzeugten Nanopartikel liegt der PDI unterhalb von 0,3, was eine schmale Größenverteilung anzeigt. Vermutlich sind die unterschiedlichen Ansätze, mit denen zuvor mit den Kartuschen Nanopartikel hergestellt wurden der Grund für diese Abweichungen. In Kartusche A wurden lediglich Nanopartikel aus Polycaprolacton mit einer Molekülmasse von 4,8 kDa hergestellt, wobei die Konzentration immer 80 µM in Acetonitril betrug. In Kartusche B hingegen wurden auch höhere Polymerkonzentrationen des PCL_{4,8} ver-

wendet, zudem wurde hier auch mit anderen Polymeren Nanopartikel hergestellt. Möglicherweise haben sich in Kartusche B daher Polymere abgelagert, die eine gleichmäßige Durchmischung verhindern, oder das Acetonitril hat bereits die Oberfläche der Mischkammer angelöst, wodurch eine gleichmäßige Durchmischung ebenfalls gestört sein könnte.

Insgesamt gesehen, ist die Herstellung der PCL_{4,8}-Nanopartikel mit dem NanoAssemblr® Benchtop einfach und schnell. Die Größe der erhaltenen Nanopartikel ist jedoch stark vom Zustand der verwendeten Mischkammer abhängig, der teilweise deutliche Variationen erzeugt. Sofern die Kartusche vorher nicht für die Herstellung von Nanopartikeln mit anderen Polymeren, bzw. Polymerkonzentrationen genutzt wurde, weisen die erzeugten Nanopartikel einen hydrodynamischen Durchmesser von unter 100 nm und einen PDI von unter 0,3 auf und sind damit für *Drug Delivery* Systeme geeignet. Die Form der Nanopartikel ist sphärisch und es treten keine Aggregate auf. Ein Nachteil ist jedoch, dass die Parameter zur Herstellung der Nanopartikel mit einer Kartusche nicht beliebig variiert werden können, da beispielsweise Variationen der Polymerkonzentration die Kartusche beeinträchtigen können. Daher sollte eine Methode für die Herstellung der Nanopartikel gefunden werden, bei der die Parameter zur Nanopartikelherstellung beliebig variiert werden können, ohne dass viel teures Material benötigt wird.

3.2.3 Herstellung von PCL-Nanopartikeln mittels Nanopräzipitation im Batch-Verfahren

Wie auch in der Mikrofluidik, wird bei der Nanopräzipitation im Batch-Verfahren, zunächst das Polymer in einem Lösemittel gelöst, welches mit Wasser mischbar ist. Anschließend wird diese Lösung mit einer wässrigen Lösung gemischt, wobei spontan Nanopartikel entstehen [36]. Im Gegensatz zur Herstellung der Nanopartikel mit mikrofluidischen Systemen erfolgt die Durchmischung im Batch-Verfahren jedoch nicht kontinuierlich in einer mikrofluidischen Mischkammer, sondern für eine definierte Zeit in einem Reaktionsgefäß.

In der Literatur wird in vielen beschriebenen Herstellungsmethoden das Lösemittel-Polymergemisch langsam zu einem rührenden nicht-Lösemittel getropft [47, 48]. Die Entstehung der Nanopartikel (siehe Kapitel 2.2.6) erfolgt in den drei Schritten Kernbildung, Wachstum und Aggregation, wobei die Kernbildung für die Entstehung der Nanopartikel besonders entscheidend ist [9]. Werden nur wenige Kerne gebildet, entstehen größere Nanopartikel, werden viele Kerne gebildet, entstehen kleinere Nanopartikel [9]. Besonders die Bedingungen, mit denen die Lösemittelphase zur nicht-Lösemittel-Phase gegeben wird (Zugabegeschwindigkeit, Rührgeschwindigkeit der wässrigen Phase und Verhältnis von organischer zu wässriger Phase) beeinflussen daher die Größe der Nanopartikel [36]. Nanopartikel, die auf diese Weise mit Polycaprolacton hergestellt und in der Literatur beschrieben wurden, wiesen eine Größe zwischen 220 und 245 nm auf [48], damit sind sie für ein effizientes *Drug Delivery* zu groß. Daher sollte die Herstellung von Nanopartikeln mit dieser Methode in dieser Arbeit optimiert werden.

In dieser Arbeit wurden in einem ersten Ansatz, abgewandelt nach Fessi *et al.* [45] zunächst 400 μ l einer 13 mM PCL_{4,8}-Acetonitril-Lösung hergestellt und anschließend langsam in 5 ml gerührtes deionisiertes Wasser getropft. Anschließend wurde der Ansatz für drei Stunden rührend inkubiert und mittels Ultraschall homogenisiert. Verbleibendes Lösemittel im Reaktionsansatz wurde unter vermindertem Druck entfernt und die erzeugten Nanopartikel in Wasser mittels dynamischer Lichtstreuung (DLS) charakterisiert (Dreifachmessung eines Ansatzes) (Abb. 3.8).

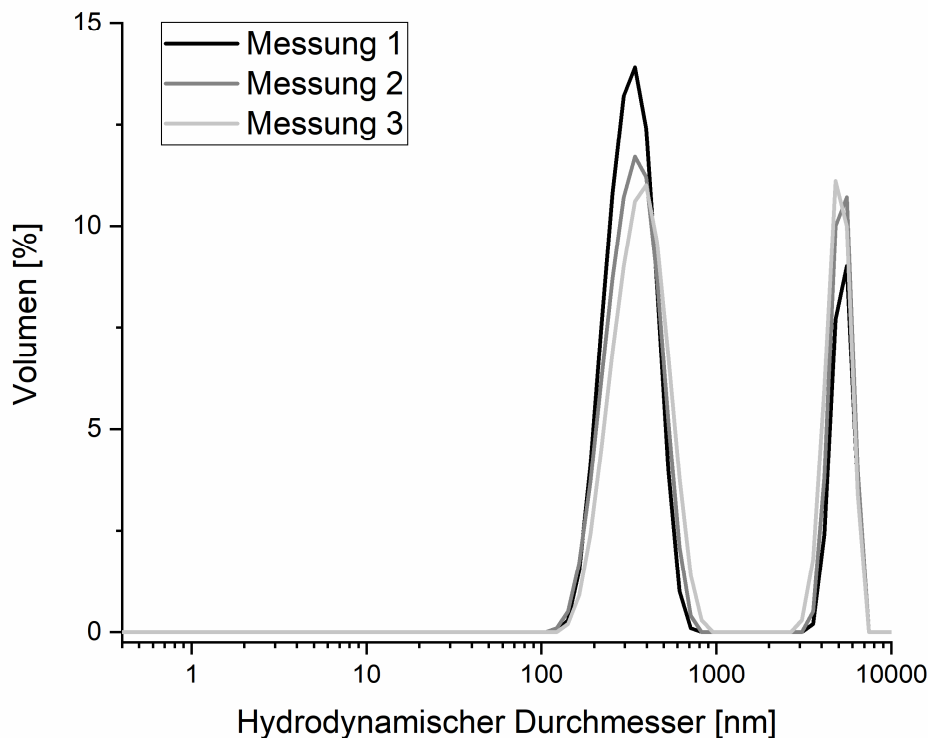


Abb. 3.8: Größenverteilung der volumengewichteten hydrodynamischen Durchmesser der PCL_{4,8}-NP, die mittels Nanopräzipitation im Batch-Verfahren hergestellt wurden. 400 µl Polymerlösung (PCL_{4,8}; 13 mM in Acetonitril) wurden zu 5 ml deionisiertem Wasser getropft; Entfernung des Lösemittels nach 3 Stunden rührender Inkubation und einer Homogenisation mittels Ultraschall (Dreifachmessung eines Ansatzes).

Der Ansatz enthält Partikel in zwei verschiedenen Größenbereichen. In kleineren Partikel haben einen hydrodynamischen Durchmesser zwischen 120 und 825 nm, die größeren Nanopartikel einen hydrodynamischen Durchmesser von 3100-6450 nm. Für ein effizientes *Drug Delivery* sind die Partikel damit insgesamt zu groß. In der Literatur wurde bereits beschrieben, dass höhere Polymerkonzentrationen zu größeren Nanopartikeln führen, da das Partikelwachstum aufgrund höherer Mengen an freiem Polymer nach der Kernbildung begünstigt wird, gleichzeitig entstehen bei der Verwendung hoher Polymerkonzentrationen Nanopartikel-Suspensionen mit hohen Partikeldichten, wodurch auch die Wahrscheinlichkeit von Aggregationen erhöht wird [9, 38, 67]. Daher wurde im nächsten Ansatz die Polymerkonzentration auf 8 mM verringert (Abb. 3.9).

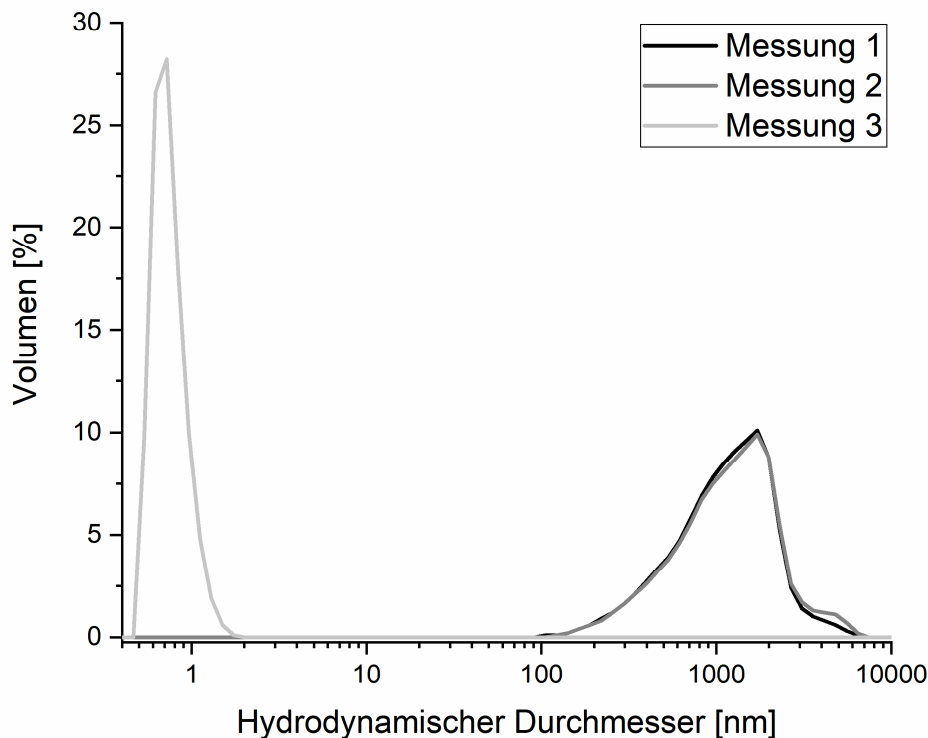


Abb. 3.9: Größenverteilung der volumengewichteten hydrodynamischen Durchmesser der PCL_{4,8}-NP, die mittels Nanopräzipitation im Batch-Verfahren hergestellt wurden. 400 µl Polymerlösung (PCL_{4,8}; 8 mM in Acetonitril) wurden zu 5 ml deionisiertem Wasser getropft; Entfernung des Lösemittels nach 3 Stunden rührender Inkubation und einer Homogenisation mittels Ultraschall (Dreifachmessung eines Ansatzes).

Die einzelnen Messungen des selben Ansatzes zeigen jeweils Partikel in einem einzelnen Größenbereich. In Messung eins und zwei liegt der hydrodynamische Durchmesser der Partikel zwischen 106 und 6440 nm, in Messung drei weicht der hydrodynamische Durchmesser mit 0,5-1,7 nm deutlich ab. Dies deutet darauf hin, dass in der Probe wenige kleine Nanopartikel vorhanden sind, die lediglich bei Messung drei im Messbereich vorhanden waren. Möglicherweise waren bis zur dritten Messung die größeren Partikel bereits abgesunken, sodass sich nur noch die kleineren Partikel im Messbereich befanden. Die Partikel sind demnach für ein effizientes *Drug Delivery* entweder zu groß, oder zu klein. Auch bei einer PCL_{4,8}-Konzentration von 8 mM liegt der mittlere hydrodynamische Durchmesser der Partikel mit 903 nm deutlich oberhalb der ge-

wünschten 100 nm, jedoch sind die Partikel deutlich kleiner, als bei einer Polymerkonzentration von 13 mM PCL_{4,8}. Die Konzentration des Polycaprolactons hat also einen deutlichen Einfluss auf den hydrodynamischen Durchmesser der Nanopartikel. Engelberg *et al.* haben beispielsweise eine Polymerkonzentration von lediglich 70 μ M für die Herstellung ihrer PEG-PCL Nanopartikel genutzt und damit Partikelgrößen von etwa 30 nm erreicht [67]. Daher wurde in dieser Arbeit die Konzentration des Polymers in Acetonitril von 8 mM auf 80 μ M verringert. Das Polymer-Lösemittel-Gemisch wurde, wie bei Engelberg *et al.* beschrieben [67], anschließend langsam zum doppelten Volumen deionisiertem Wasser getropft, welches mit 1000 rpm bei Raumtemperatur gerührt wurde, bis das Lösemittel verdampft war. Die Nanopartikel wurden mittels DLS charakterisiert² (Abb. 3.10).

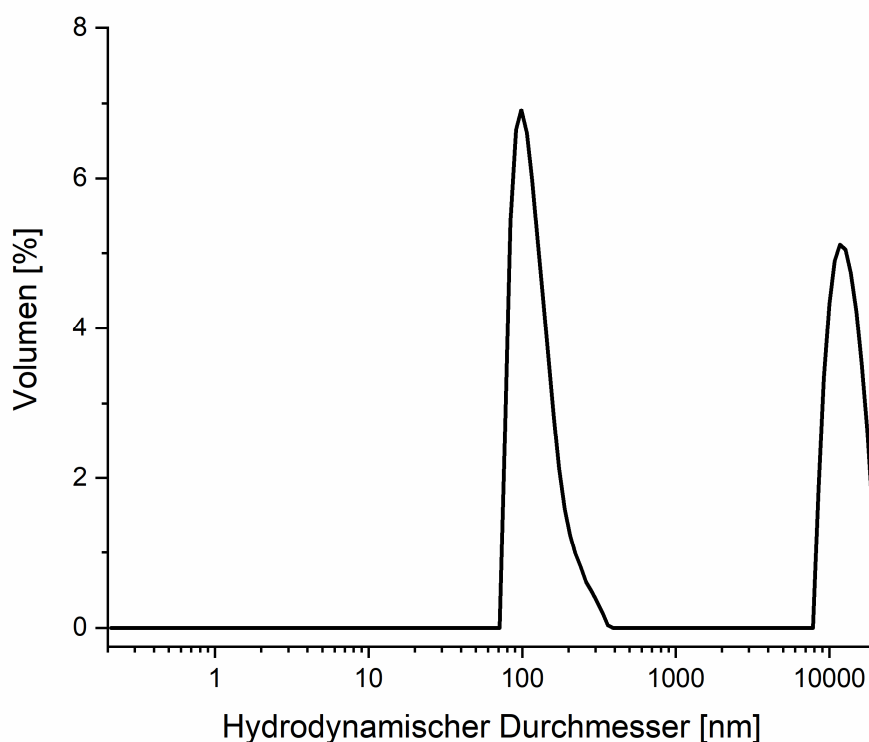


Abb. 3.10: Größenverteilung der volumengewichteten hydrodynamischen Durchmesser der PCL_{4,8}-NP, die mittels Nanopräzipitation im Batch-Verfahren hergestellt wurden. 400 μ l Polymerlösung (PCL_{4,8}; 80 μ M in Acetonitril) wurden langsam zu 800 μ l deionisiertem Wasser getropft; Entfernung des Lösemittels durch rührende Inkubation bei 1000 rpm über Nacht.

² Im Rahmen der Masterarbeit von Thassilo Haupt

Wiederum enthält das Reaktionsprodukt Nanopartikel in zwei Größenbereichen. Ein Teil der Nanopartikel hat einen hydrodynamischen Durchmesser von ca. 80-360 nm, ein anderer Teil der Partikel ist mit ca. 8.500-19.100 nm deutlich größer. Dennoch weist zumindest ein kleiner Volumenanteil der Nanopartikel (ca. 22 %) eine Größe unterhalb von 100 nm auf. Der mittlere volumengewichtete hydrodynamische Durchmesser ist mit 5371 nm deutlich größer als gewünscht. Reisch *et al.* [68] haben gezeigt, dass geladene Gruppen in den Polymeren bei der Herstellung von Nanopartikeln mittels Nanopräzipitation deren Größe verringern können. Da das Polycaprolacton bereits eine Carboxylgruppe enthält, die je nach pH-Wert protoniert oder deprotoniert vorliegen kann, wurde der pH-Wert der wässrigen Lösung, die für die Herstellung der Nanopartikel genutzt wurde, variiert³. Für einen pH-Wert von 2 wurde eine verdünnte Chlorwasserstoff-Lösung genutzt, für einen pH-Wert von 10 eine verdünnte Natriumhydroxid-Lösung. Die pK_S von 6-Hydroxyhexansäure (PCL, welches aus nur einem Monomer besteht) ist 4,75, bei einem pH-Wert von 2 liegen die Carboxylgruppen also protoniert vor und das PCL ist ungeladen. Bei einem pH-Wert von 10 sind die Carboxylgruppen deprotoniert und das PCL ist negativ geladen. Dadurch können sich die Polymere elektrostatisch abstoßen, wodurch kleinere Nanopartikel entstehen können. Die resultierenden Größenverteilungen sind in Abbildung 3.11 dargestellt.

³ Im Rahmen der Masterarbeit von Thassilo Haupt

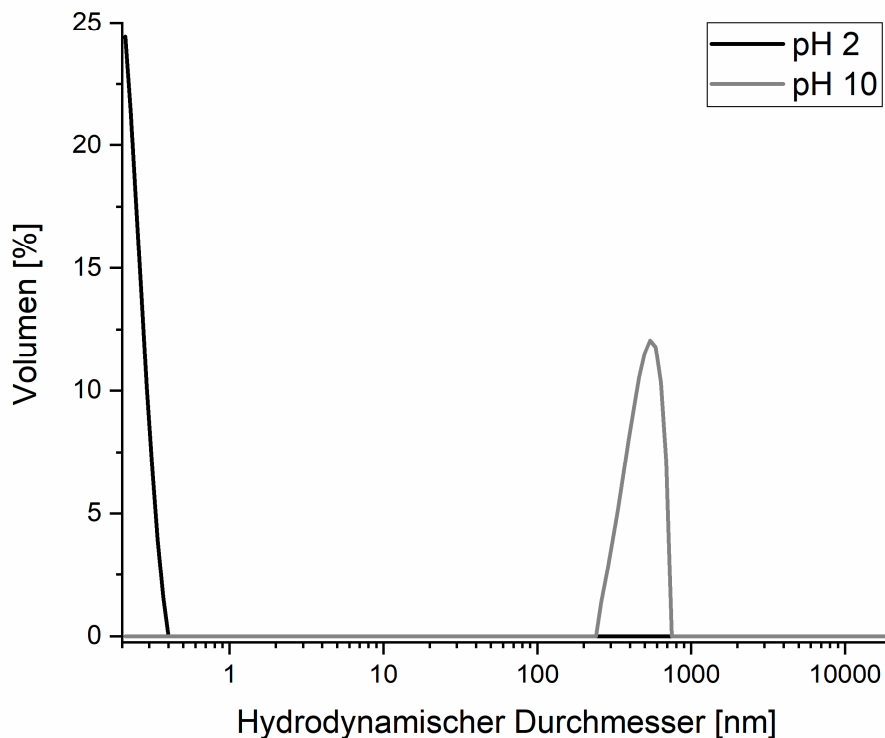


Abb. 3.11: Größenverteilung der volumengewichteten hydrodynamischen Durchmesser von PCL_{4,8}-NP, die mittels Nanopräzipitation im Batch-Verfahren hergestellt wurden. 400 µl Polymerlösung (PCL_{4,8}; 80 µM in Acetonitril) wurden zu 800 µl verdünnter Natriumhydroxid-Lösung (pH 10) bzw. verdünnter Chlorwasserstoff-Lösung (pH 2) gegeben und das Lösemittel über Nacht bei 1000 rpm rührend verdampft.

Der mittlere hydrodynamische Durchmesser der Nanopartikel, die bei pH 2 hergestellt wurden, beträgt 0,3 nm, der mittlere hydrodynamische Durchmesser der Nanopartikel, die bei pH 10 hergestellt wurden beträgt 489 nm. Damit ist der mittlere hydrodynamische Durchmesser in beiden Reaktionsansätzen kleiner als bei den Nanopartikeln, die mit deionisiertem Wasser hergestellt wurden (5371 nm). Beide Ansätze beinhalten nur Partikel in einem Größenbereich, dennoch sind die Partikel beider Ansätze nicht im gewünschten Größenbereich von 20 bis 100 nm. Der Theorie nach hätten die Nanopartikel bei einem pH-Wert von 10 kleiner sein sollen, da das PCL negativ geladen ist und sich die Polymere elektrostatisch abstoßen, wodurch kleinere Partikel gebildet werden sollten. Die Ergebnisse können diese Theorie nicht bestätigen, da hier die Nanopartikel,

welche mit dem neutralen PCL bei pH 2 hergestellt wurden deutlich kleiner sind. Möglicherweise beeinflussen die verschiedenen Ionen aus dem Natriumhydroxid oder dem Chlorwasserstoff, die in den Reaktionsansätzen vorhanden sind, die Partikelbildung. Diese kleinen Ionen könnten die Löslichkeit des PCLs verringern und auf diese Weise die Partikelbildung beeinflussen [65].

Da diese Experimente nicht zielführend waren, wurde die Herstellungsmethode der Nanopartikel abermals abgewandelt. Das Polymer-Lösemittel-Gemisch wurde diesmal nicht langsam zum Wasser getropft, sondern das Gemisch wurde schnell zugegeben, um eine stärkere lokale Übersättigung und einheitliche Mischzeit zu gewährleisten. Dabei wurde der Einfluss von verschiedenen Mischzeiten auf den hydrodynamischen Durchmesser der Nanopartikel untersucht⁴. Im Anschluss an die Durchmischung wurden die Reaktionsansätze in deionisiertem Wasser verdünnt, um eine Aggregation der Partikel durch eine stärkere Verdünnung zu verringern. Zudem wurde das Lösemittel direkt nach Ablauf der Mischzeit im Anschluss an die Verdünnung bei vermindertem Druck im Rotationsverdampfer aus dem Reaktionsansatz entfernt, anstatt über Nacht langsam zu verdampfen. Die Charakterisierung der erzeugten Nanopartikel erfolgte wiederum mittels DLS (Abb. 3.12).

⁴ Im Rahmen der Masterarbeit von Thassilo Haupt

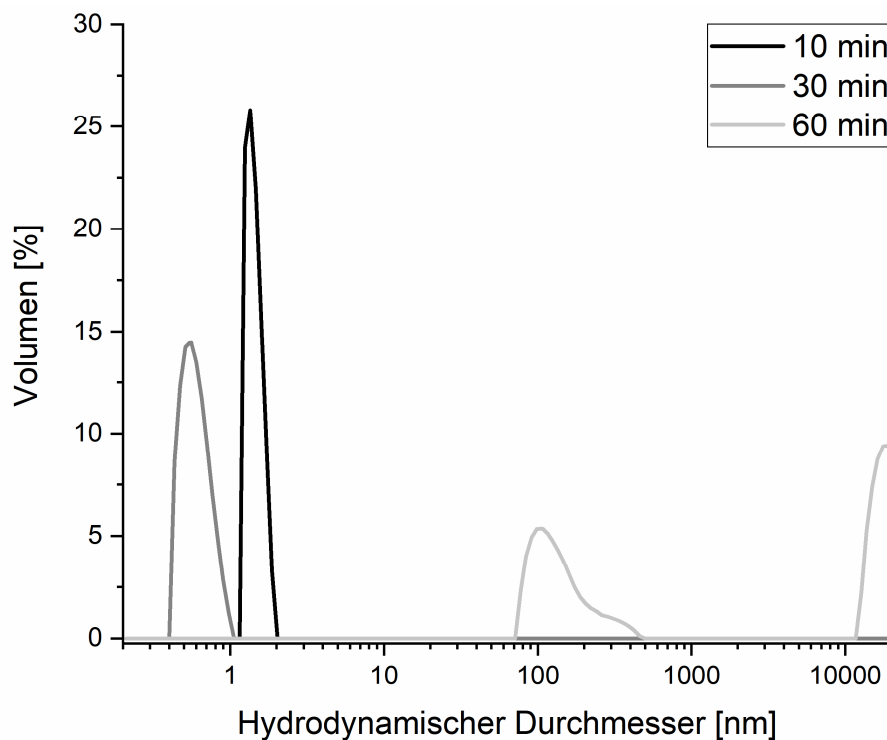


Abb. 3.12: Größenverteilung der volumengewichteten hydrodynamischen Durchmesser von PCL_{4,8}-NP, die mittels Nanopräzipitation im Batch-Verfahren hergestellt wurden. 400 μ l Polymerlösung (PCL_{4,8}; 80 μ M in Acetonitril) wurden zu 800 μ l deionisiertem Wasser gegeben und für 10, 30 bzw. 60 Minuten röhrend inkubiert; anschließend wurden die Ansätze mit deionisiertem Wasser verdünnt und das Lösemittel am Rotationsverdampfer entfernt.

Bei einer Mischzeit von 10 Minuten ergeben sich Nanopartikel mit einem mittleren hydrodynamischen Durchmesser von 1,5 nm. Bei einer Mischzeit von 30 Minuten sinkt der Durchmesser auf 0,6 nm. Bei einer Mischzeit von 60 Minuten steigt der mittlere hydrodynamische Durchmesser jedoch auf 7073 nm und es liegen wiederum Partikel in zwei verschiedenen Größenbereichen vor (77-460 nm und 12.737-19.100 nm). Dies deutet darauf hin, dass eine Mischzeit von 60 Minuten bis zur Verdünnung des Ansatzes zu lang ist und die Partikel bereits aggregieren. Jedoch liegen auch hier alle Nanopartikelgrößen nicht im gewünschten Bereich. Die Kernbildungsrate kann neben der Durchmischung auch durch die Grenzflächenspannung zwischen gebildeten Polymernanopartikeln und dem Lösemittel-nicht-Lösemittelgemisch beeinflusst werden [9]. Eine geringere Grenzflächenspannung erhöht dabei die Kernbildungsrate [9]. Daher wurde im

nächsten Ansatz das nicht-Lösemittel Wasser durch Ethanol ersetzt. Der Ansatz wurde bis zur Verdünnung mit Wasser für 30 Minuten durchmischt⁵. Abbildung 3.13 zeigt die Größenverteilungen von drei unabhängig mit dieser Methode hergestellten Nanopartikel-Suspensionen (diese Daten wurden bereits in einer Publikation veröffentlicht [69]).

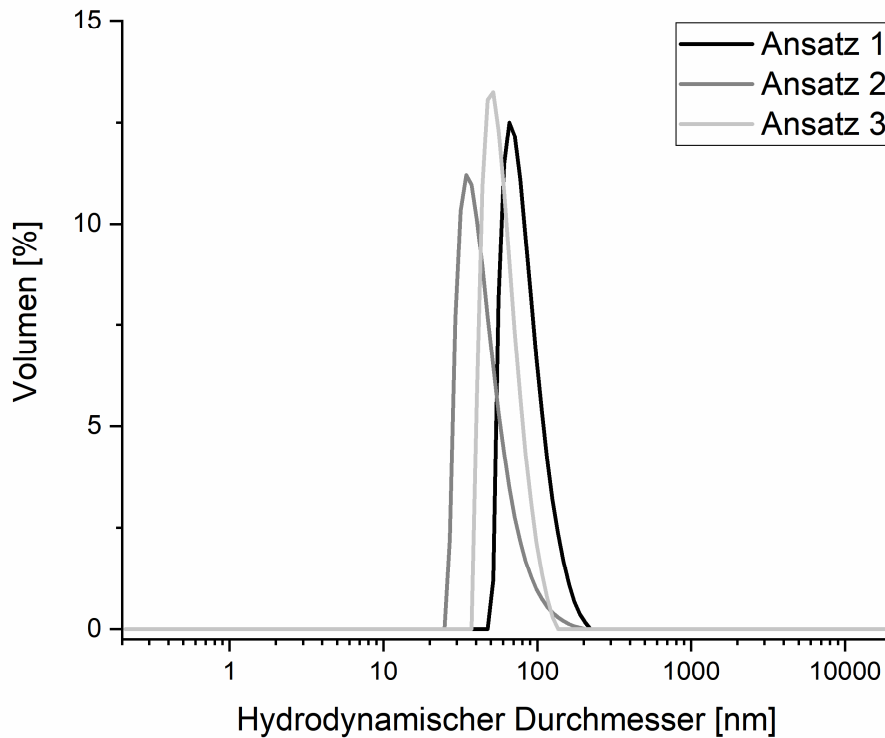


Abb. 3.13: Größenverteilung der volumengewichteten hydrodynamischen Durchmesser von PCL_{4,8}-NP, die mittels Nanopräzipitation im Batch-Verfahren hergestellt wurden. 400 µl Polymerlösung (PCL_{4,8}; 80 µM in Acetonitril) wurden zu 800 µl Ethanol gegeben und für 30 Minuten rührend inkubiert; anschließend wurden die Ansätze mit deionisiertem Wasser verdünnt und das Acetonitril und Ethanol am Rotationsverdampfer entfernt.

Die Nanopartikel haben einen mittleren hydrodynamischen Durchmesser von 64 ± 19 nm und liegen damit reproduzierbar im gewünschten Größenbereich. Einige Partikel haben hydrodynamische Durchmesser von über 100 nm, dennoch liegt ein Volumenanteil von 81-98 % der Partikel im gewünschten Größenbereich zwischen 20 und

⁵ Teilweise im Rahmen der Masterarbeit von Thassilo Haupt

100 nm. Die gewählten Bedingungen (Polymerkonzentration; die Wahl von Lösemittel und nicht-Lösemittel, sowie deren Verhältnis zueinander; Durchmischung; Temperatur; Mischzeit; Verdünnung) sind demnach gut geeignet um reproduzierbar Nanopartikel im gewünschten Größenbereich herzustellen. Zudem können Nanopartikel mit dieser Methode mit gängigem Laborequipment einfach, kostengünstig und schnell hergestellt werden. Die Herstellung von Nanopartikeln mit dieser Methode benötigt etwa 60 Minuten, wobei eine parallele Herstellung mehrerer Ansätze im Gegensatz zur Herstellung mittels *Thin-film hydration* Methode einfach durchzuführen ist. Für die parallele Herstellung von Nanopartikeln mittels *Thin-film hydration* Methode wäre ein Wärmeschrank nötig, in dem mehrere Glaskolben auf Magnetrührern gerührt werden können, wohingegen bei der parallelen Herstellung von Nanopartikeln mittels Nanopräzipitation im Batch-Verfahren lediglich ein heizbarer Schüttelblock für Reaktionsgefäße (z. B. Thermomix comfort) nötig ist. Die Herstellung von Partikeln mittels Mikrofluidik ist zwar noch schneller (ca. 30 Minuten), aber im Gegensatz zur Herstellung der Partikel mittels Mikrofluidik werden im Batch-Verfahren bis auf gängige Verbrauchsmaterialien (Reagiergefäße und Zentrifugierröhrchen) keine teuren Verbrauchsmaterialien oder sonstige Spezialausstattung benötigt. Daher erfolgte die Herstellung von Polycaprolacton-Nanopartikeln in den weiteren Arbeiten mit dieser Methode.

In den folgenden Kapiteln werden diese Nanopartikel, sowie Nanopartikel, die aus Polycaprolacton mit einer Molekülmasse von 2,1 und 2,3 kDa mit derselben Methode hergestellt wurden, näher charakterisiert.

3.3 Charakterisierung von PCL-Nanopartikeln aus Nanopräzipitation im Batch-Verfahren

Im vorherigen Kapitel wurde die Herstellung der Nanopartikel im Hinblick auf die Größe der Partikel, der Herstellungszeit und die Kosten für die Herstellung optimiert. Die Herstellung mittels Nanopräzipitation im Batch-Verfahren war dabei besonders vorteilhaft. Nach Abschluss dieser Auswahl- und Optimierungsphase sollen nun die erzeugten Nanopartikel näher charakterisiert werden. Dabei sollen die Form der Nanopartikel, der Einfluss der Polymermolekülmasse auf die Größe der erzeugten Nanopartikel und die Einkapselung von Paclitaxel (PTX) untersucht werden. Die Form der Nanopartikel kann deren Eigenschaften mit bestimmen (siehe Kapitel 2.1.3). Die Molekülmasse des zur Nanopartikelherstellung genutzten Polymers kann die Größe, sowie die Freisetzung von Wirkstoffen beeinflussen. Zur Bestimmung der Form der Nanopartikel wurde eine Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) der PCL_{4,8}-Nanopartikel durchgeführt (Abb. 3.14).

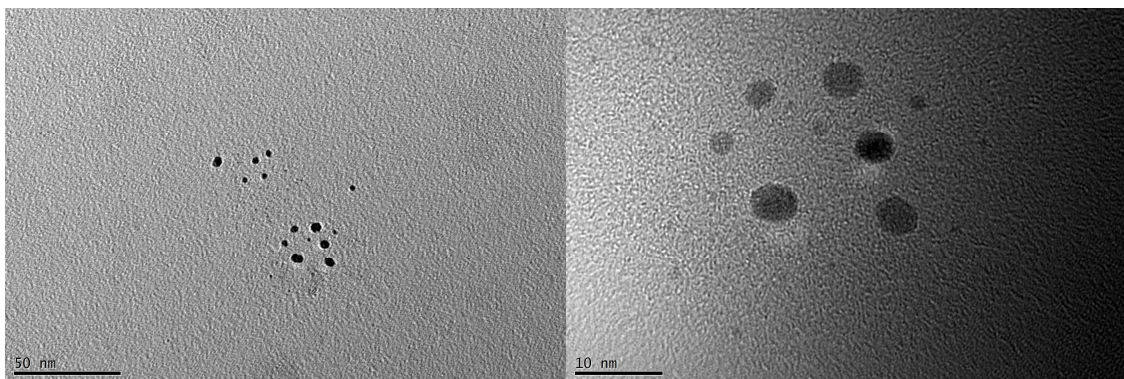


Abb. 3.14: TEM-Mikrographen von PCL_{4,8}-Nanopartikeln. Die Nanopartikel wurden auf einem Kupfergitter getrocknet und anschließend im Helllicht-Modus bei 120 kV vermessen.

Die Nanopartikel zeigen eine sphärische Form, haben eine homogene Größe und enthalten keine Aggregate.

Zur Überprüfung, ob diese Herstellungsmethode von Nanopartikeln auch für Polycaprolacton mit anderen Molekülmassen geeignet ist, wurden neben Nanopartikeln aus Polycaprolacton mit einer Molekülmasse von 4,8 kDa, auch Nanopartikel aus Polycaprolac-

ton mit Molekülmassen von 2,1 und 2,3 kDa hergestellt. Im Unterschied zum PCL_{4,8} war die Herstellung von Nanopartikeln jedoch mit den Polymeren PCL_{2,1} und PCL_{2,3} bei gleicher Stoffmengenkonzentration (80 µM) nicht reproduzierbar. Daher wurde in weiteren Ansätzen zur Herstellung von Nanopartikeln die gleiche Massenkonzentration genutzt (380 µg · ml⁻¹). Die Abbildungen 3.15 und 3.16 zeigen die Größenverteilungen der Nanopartikel, die aus den Polymeren PCL_{2,1} und PCL_{2,3} mit der entwickelten Methode aus Kapitel 3.2.3 hergestellt wurden.

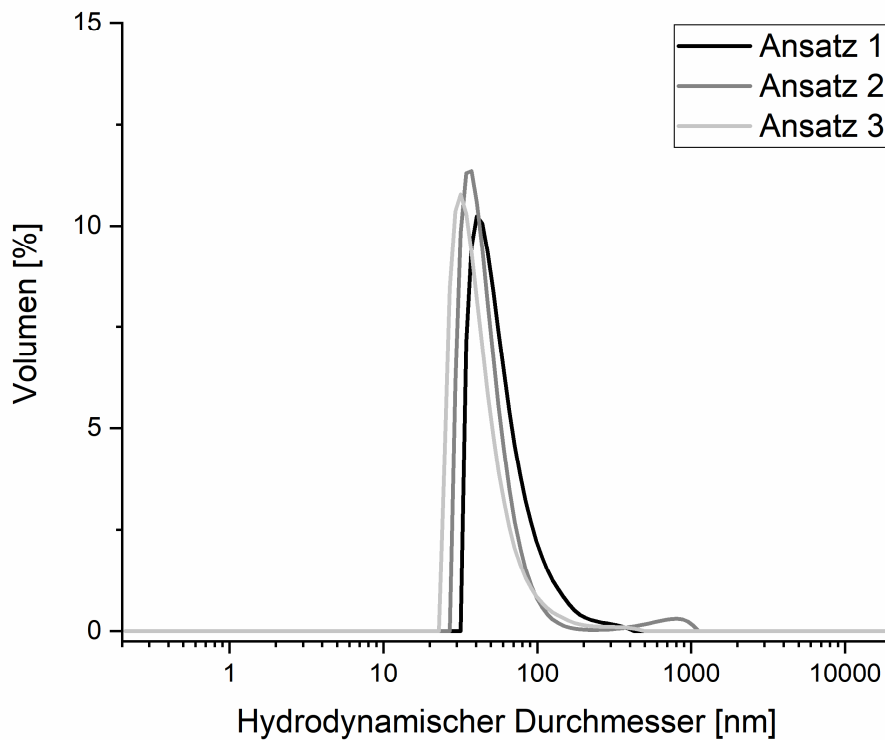


Abb. 3.15: Größenverteilung der volumengewichteten hydrodynamischen Durchmesser von PCL_{2,1}-NP, die mittels Nanopräzipitation im Batch-Verfahren hergestellt wurden. 400 µl Polymerlösung (PCL_{2,1}; 380 µg · ml⁻¹ bzw. 183 µM in Acetonitril) wurden zu 800 µl Ethanol gegeben und für 30 Minuten rührend inkubiert; anschließend wurden die Ansätze mit deionisiertem Wasser verdünnt und das Acetonitril und Ethanol am Rotationsverdampfer entfernt.

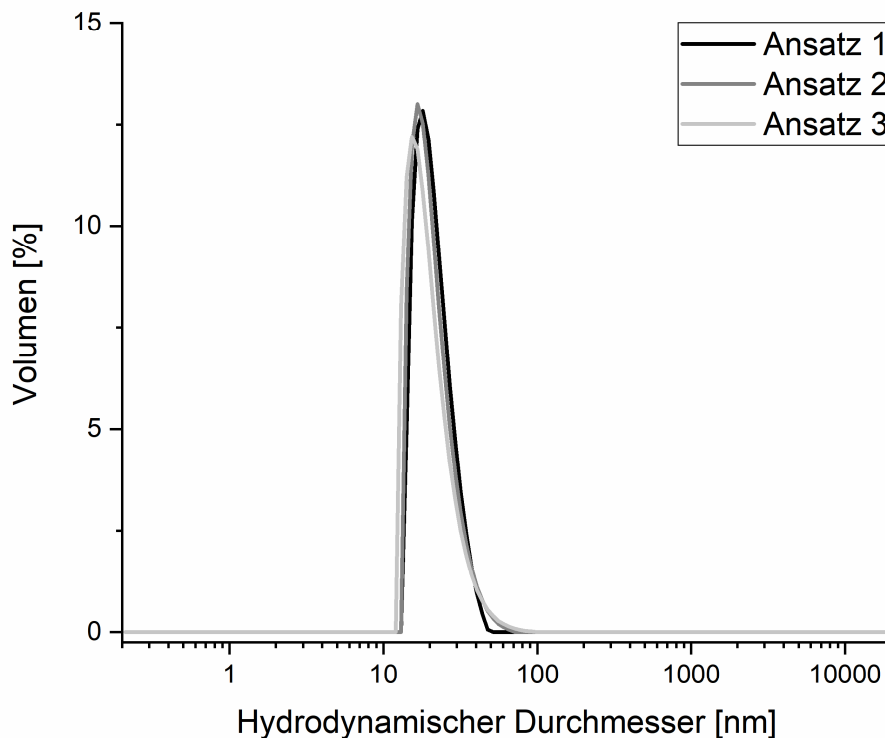


Abb. 3.16: Größenverteilung der volumengewichteten hydrodynamischen Durchmesser von PCL_{2,3}-NP, die mittels Nanopräzipitation im Batch-Verfahren hergestellt wurden. 400 µl Polymerlösung (PCL_{2,3}; 380 µg · ml⁻¹ bzw. 164 µM in Acetonitril) wurden zu 800 µl Ethanol gegeben und für 30 Minuten rührend inkubiert; anschließend wurden die Ansätze mit deionisiertem Wasser verdünnt und das Acetonitril und Ethanol am Rotationsverdampfer entfernt.

Die mit dem PCL_{2,1} hergestellten Nanopartikel liegen in allen drei Ansätzen im gleichen Größenbereich, wobei ein Ansatz jedoch zusätzlich Partikel mit einem hydrodynamischen Durchmesser von 500-1030 nm enthält. Der Volumenanteil der Partikel, die einen hydrodynamischen Durchmesser von über 100 nm haben beträgt in den drei Ansätzen aber lediglich 4-10 %. Die PCL_{2,1}-Nanopartikel haben einen mittleren hydrodynamischen Durchmesser von 59 ± 10 nm. Damit ist ein Großteil der PCL_{2,1}-Nanopartikel reproduzierbar im gewünschten Größenbereich.

Die mit dem PCL_{2,3} hergestellten Nanopartikel liegen ebenfalls in allen drei Ansätzen im gleichen Größenbereich. Die PCL_{2,3}-Nanopartikel haben einen mittleren hydrody-

namischen Durchmesser von $21 \pm 0,5$ nm. Davon liegt aber nur ein Volumenanteil von 36-47 % der Partikel im Größenbereich zwischen 20 und 100 nm, der Großteil der PCL_{2,3}-Nanopartikel ist damit zu klein für das *Drug Delivery*, obwohl die Polymermolekülmasse des PCL_{2,3} der vom PCL_{2,1} sehr ähnlich ist. Möglicherweise hängt dies mit noch vorhandenen Lösemittelresten im Polycaprolacton zusammen (siehe Kapitel 3.1 und B. 1), die die Herstellung der Nanopartikel, insbesondere die Kernbildung, beeinflussen könnte.

Mit der in dieser Arbeit entwickelten Methode zur Herstellung von Polycaprolacton-Nanopartikeln können reproduzierbar Nanopartikel hergestellt werden. Die hydrodynamischen Durchmesser der erzeugten Partikel sind jedoch nicht primär von der Polymermolekülmasse abhängig. Aus den eingesetzten Polymeren können zwar reproduzierbar Nanopartikel in einem bestimmten Größenbereich hergestellt werden, die Größe dieser Nanopartikel zeigt jedoch keinen Trend bezüglich der verwendeten Polymermolekülmasse. Während die PCL_{2,1}-Nanopartikel einen mittleren hydrodynamischen Durchmesser von 59 nm haben, ist der hydrodynamische Durchmesser der Nanopartikel, die aus dem größeren PCL_{2,3} hergestellt wurden mit 21 nm deutlich kleiner. Die Nanopartikel die aus dem noch größeren PCL_{4,8} hergestellt wurden haben mit einem mittleren hydrodynamischen Durchmesser von 64 nm den größten Durchmesser. Diese fehlenden Trends bezüglich der Polymermolekülmasse und des hydrodynamischen Durchmessers der daraus hergestellten Nanopartikel könnten auf verschiedene Lösemittelreste im PCL mit den verschiedenen Molekülmassen zurückzuführen sein (vgl. Kapitel 3.1 und B. 1). Dennoch zeigen diese Ergebnisse, dass Nanopräzipitation, richtig optimiert, ein verlässliches Verfahren ist um reproduzierbar Nanopartikel in einem gewünschten Größenbereich zu erzeugen.

3.3.1 Einkapselung von hydrophoben Molekülen in synthetisierte PCL-Nanopartikel

Nachdem die Nanopartikel reproduzierbar hergestellt wurden, sollten diese auf ihre Fähigkeit hydrophobe Substanzen einzukapseln zu können untersucht werden. Eine Möglichkeit dazu ist die Untersuchung mit der Farbstoff-Solubilisierungsmethode. Bei dieser Methode wird ein Farbstoff verwendet, dessen Absorption bei einer definierten Wellenlänge in Abhängigkeit der Hydrophobizität seines Milieus variiert [64]. Die Untersuchung erfolgte in dieser Arbeit mit dem Farbstoff 1,6-Diphenyl-1,3,5-Hexatrien (DPH) abgewandelt nach Zhang *et al.* und Jeong *et al.* [64, 70]. Um zu überprüfen, ob die Nanopartikel in der Lage sind hydrophobe Moleküle einzukapseln, wurden zunächst Nanopartikel mit der optimierten Methode im Batch-Verfahren hergestellt und anschließend Verdünnungen der Nanopartikel-Suspension hergestellt, sodass die Konzentration der Polymere ca. 1 mM bis 3 nM entsprach. Die Verdünnungen wurden jeweils mit einer DPH-Lösung vermischt und unter Lichtausschluss inkubiert. Die Absorption des DPH bei 356 nm ist dabei in hydrophober Umgebung deutlich höher, als in Wasser [64, 70, 71], daher wurde die Absorption der Proben bei 356 nm bestimmt und gegen die jeweilige Polymerkonzentration (logarithmische Skalierung) der Probe aufgetragen. Beispielhaft ist hier die Absorption bei verschiedenen PCL_{4,8}-Konzentrationen gezeigt (Abb. 3.17). Die Diagramme der Polymere PCL_{2,1} und PCL_{2,3} befinden sich im Anhang (Kapitel B. 2).

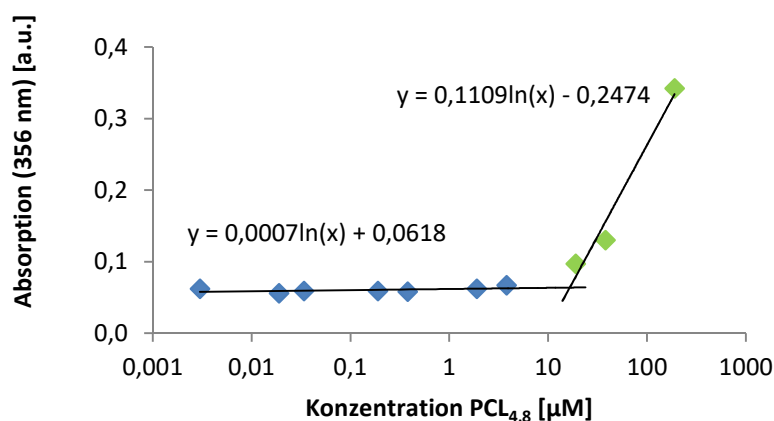


Abb. 3.17: Bestimmung der Absorption von DPH bei 356 nm in Abhängigkeit der Konzentration von PCL_{4,8}; die Diagramme der Polymere PCL_{2,1} und PCL_{2,3} befinden sich im Anhang (Kapitel B. 2).

Die Absorption bei 356 nm steigt bei einer PCL_{4,8}-Konzentration von 3 nM-4 µM kaum an, erst ab einer Konzentration von 19 µM ist ein deutlicher Anstieg der Absorption zu erkennen. Die Berechnung der Schnittpunkte der logarithmischen Regression zeigt, dass ab einer PCL_{4,8} Konzentration von 17 µM hydrophobe Substanzen nach der Partikelsynthese eingekapselt werden. Für das PCL_{2,1} ergibt sich analog eine Konzentration von 24 µM und für das PCL_{2,3} eine Konzentration von 91 µM in deionisiertem Wasser (siehe Anhang, Kapitel B. 2). Für alle erzeugten Nanopartikel konnte daher gezeigt werden, dass diese hydrophobe Substanzen einlagern können.

3.3.2 Einkapselung von Paclitaxel

Ziel der Arbeit ist die Synthese von Nanopartikeln zur Verwendung in *Drug Delivery* Systemen. Daher wurde der Einfluss einer Einkapselung des Chemotherapeutikums Paclitaxel (PTX), stellvertretend für andere hydrophobe Wirkstoffe, untersucht. Für die Herstellung von PCL-Nanopartikeln mit PTX wurde das PTX schon vor der Nanopräzipitation dem Polymer-Lösemittel Gemisch zugeben. Anschließend erfolgte die Synthese der Nanopartikel mit der in Kapitel 3.2.3 entwickelten Methode aus PCL_{4,8}. Dabei wur-

den der Polymer-Acetonitril-Lösung verschiedene Konzentrationen an PTX zugegeben. Die hydrodynamischen Durchmesser der resultierenden Nanopartikel wurden mittels DLS bestimmt (Abb. 3.18).

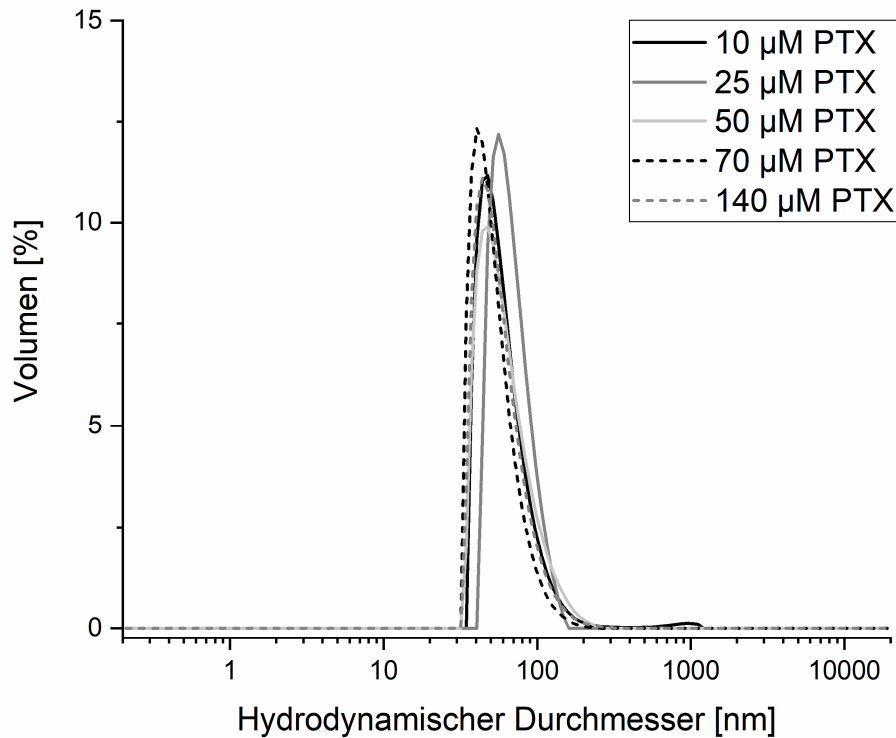


Abb. 3.18: Größenverteilung der volumengewichteten hydrodynamischen Durchmesser von PCL_{4,8}-NP, die mittels Nanopräzipitation im Batch-Verfahren hergestellt wurden. 400 μl Polymer-PTX-Lösung (PCL_{4,8}; 380 μg · ml⁻¹ bzw. 80 μM; PTX: zwischen 10 und 140 μM variiert, in Acetonitril) wurden zu 800 μl Ethanol gegeben und für 30 Minuten rührend inkubiert; anschließend wurden die Ansätze mit deionisiertem Wasser verdünnt und das Acetonitril und Ethanol am Rotationsverdampfer entfernt.

Die gemessenen Größenverteilungen zeigen, dass alle eingesetzten PTX-Konzentrationen keinen Einfluss auf den hydrodynamischen Durchmesser der Nanopartikel haben, die mittleren hydrodynamischen Durchmesser liegen zwischen 54 nm und 69 nm und lediglich ein Volumenanteil von 4-9 % der in den Ansätzen enthaltenen Partikel liegen oberhalb einer Größe von 100 nm. Daher wurde ebenfalls bestimmt, ob neben dem PTX in den Nanopartikeln auch freies PTX in den Ansätzen vorhanden war. Dazu wurden 2 ml der hergestellten Nanopartikel-Suspension über Zentrifugaleinheiten (Vivaspin® 500 PES, Sartorius Stedim Biotech GmbH) aufgereinigt. Die Nanopartikel

bleiben dabei vor der Filtermembran zurück, während freies PTX die Membran passieren kann. Anschließend wurde die Filtereinheit mit deionisiertem Wasser gewaschen, um auch verbliebenes freies PTX in Flüssigkeitsrückständen oder an der Membran adsorbiertes PTX in die Analyse mit einzubeziehen. Die Durchläufe wurden getrocknet und das zurückbleibende PTX in einem definierten Volumen Acetonitril gelöst. Die PTX-Konzentration in diesen Proben wurde an der HPLC bestimmt.

Dabei konnte lediglich im Ansatz der Nanopartikel, die mit 140 μM PTX hergestellt wurden, freies PTX nachgewiesen werden (0,1 % des zur Herstellung der Nanopartikel verwendeten PTX). Für die Interpretation dieses Ergebnisses ist jedoch zu beachten, dass PTX während der Filtration an die Filtermembran adsorbiert, sodass kleinere Mengen an freiem PTX möglicherweise nicht detektierbar sind. Für die weitere Herstellung von Nanopartikeln mit PTX wurde daher eine PTX-Konzentration von 70 μM gewählt, da lediglich bei einer Konzentration von 140 μM PTX eine detektierbare Menge an freiem PTX verbleibt. Um zu überprüfen, ob die Einkapselung von PTX einen Einfluss auf den hydrodynamischen Durchmesser der PCL-Nanopartikel hat, wurde mit den Polymeren PCL_{2,1}, PCL_{2,3} und PCL_{4,8} Nanopartikel hergestellt, bei deren Herstellung 70 μM PTX zum Ansatz gegeben wurde und anschließend deren hydrodynamischer Durchmesser bestimmt. Tabelle 3.3 zeigt vergleichend die mittleren hydrodynamischen Durchmesser der PCL-Nanopartikel, die mit und ohne eingekapseltes PTX und den verschiedenen Polymeren hergestellt wurden (ein Teil der Daten wurde bereits veröffentlicht [69]).

Tabelle 3.3: Vergleich der mittleren hydrodynamischen Durchmesser der PCL-Nanopartikel, bei Herstellung aus Polymeren mit unterschiedlichen mittleren Molekülmassen, sowie ohne oder mit Zusatz von PTX.

Polymer	Mittlerer hydrodynamischer Durchmesser PCL-Nanopartikel (Mittelwert \pm Standardabweichung; n = 3)	Mittlerer hydrodynamischer Durchmesser PCL-PTX Nanopartikel (Mittelwert \pm Standardabweichung; n = 3)
PCL _{2,1}	59 \pm 10 nm	64 \pm 4 nm
PCL _{2,3}	21 \pm 0,5 nm	19 \pm 4 nm
PCL _{4,8}	64 \pm 19 nm	37 \pm 3 nm

Die mittleren hydrodynamischen Durchmesser der Nanopartikel mit eingekapseltem PTX betragen für die PCL_{2,1}-PTX-NP 64 ± 4 nm, wobei ein Volumenanteil von 89-92 % der Partikel einen hydrodynamischen Durchmesser im Bereich von 20-100 nm haben. Damit sind die Nanopartikel mit eingekapseltem PTX etwas größer als die Nanopartikel ohne PTX (59 ± 10 nm), diese Abweichung liegt jedoch im Bereich der Standardabweichung. Von den PCL_{2,3}-PTX-NP liegt lediglich ein Volumenanteil von 16-60 % der Partikel im Größenbereich zwischen 20 und 100 nm. Der mittlere hydrodynamische Durchmesser beträgt 19 ± 4 nm und ist damit etwa so groß wie bei den entsprechenden Nanopartikeln ohne eingekapseltes PTX ($21 \pm 0,5$ nm). Von den PCL_{4,8}-PTX-NP liegt ein Volumenanteil von 99-100 % der Partikel im Größenbereich zwischen 20 und 100 nm, der mittlere hydrodynamische Durchmesser beträgt 37 ± 3 nm. Damit zeigt die Einkapselung von PTX keinen Effekt auf den hydrodynamischen Durchmesser der Nanopartikel, die aus PCL_{2,1} und PCL_{2,3} hergestellt wurden. Die PCL_{4,8}-NP sind mit einem mittleren hydrodynamischen Durchmesser von 64 ± 19 nm größer als die PCL_{4,8}-PTX-NP, welche einen mittleren hydrodynamischen Durchmesser von 37 ± 3 nm haben. Möglicherweise sind diese Abweichungen auf Variationen der Umgebungsbedingungen zurückzuführen. Die weiteren Versuche wurden wiederum mit den Nanopartikeln, die aus PCL_{4,8} hergestellt wurden durchgeführt, da in diese theoretisch am meisten Wirkstoff eingekapselt werden kann, da deren hydrophober Anteil größer ist als bei den Polymeren mit einer Molekülmasse von 2,1 bzw. 2,3 kDa.

Nachdem die Herstellung der Nanopartikel und die Einkapselung von PTX optimiert wurde, könnten die Nanopartikel bereits als passives *Drug Delivery* System genutzt werden. Um die Spezifität des Systems zu erhöhen, sollen jedoch zusätzlich Aptamere an die Nanopartikel gekoppelt werden, um ein funktionales *Targeted Drug Delivery* System zu etablieren.

3.4 Modifikation von PCL-Nanopartikeln mit Aptameren

Um die Nanopartikel als *Targeted Drug Delivery* System einsetzen zu können, sollten in dieser Arbeit Aptamere auf der Oberfläche der Nanopartikel immobilisiert werden. PLC verfügt über endständige Carboxylgruppen, die nach entsprechender Aktivierung einfachen Zugang zur Veresterung oder Amidierung bieten. Jedoch stellt die geringe Konzentration der Nanopartikel bei deren Herstellung ein Problem für die Kopplung dar, da die Reaktion von zwei Komponenten bei einer geringen Konzentration unwahrscheinlicher ist, als bei hohen Konzentrationen der Reaktanden. Daher sollten die Nanopartikel-Suspension zunächst eingeeengt werden.

3.4.1 Methoden zur Erhöhung der Partikelkonzentration

Für den Prozessschritt der Partikelkonzentrierung wurden verschiedene Verfahren untersucht. So wurden unter anderem ein Vakuumkonzentrator (Flüssigkeiten werden aus Proben in einem Reaktionsgefäß unter vermindertem Druck bei Raumtemperatur unter leichter Zentrifugation entfernt) und ein Rotationsverdampfer (Flüssigkeiten werden aus Proben in einem drehenden Glaskolben unter vermindertem Druck entfernt) genutzt, mit denen ein Teil des Wassers aus der Nanopartikel-Suspension unter vermindertem Druck entfernt wurde. Alternativ wurde erprobt, ob die Nanopartikel mittels Zentrifugation pelletiert werden können, um sie anschließend in einem geringeren Volumen an Wasser resuspendieren zu können. Zusätzlich wurde überprüft, ob Wasser aus der Nanopartikel-Suspension über eine Zentrifugaleinheit mit einem *Molecular weight cut-off* (MWCO) von 100 kDa (mittlerer Porendurchmesser von 7-8 nm [72]) entfernt werden kann. Nach Abschluss der Volumenreduktion wurde der hydrodynamische Durchmesser der jeweiligen Nanopartikel-Suspension mittels DLS bestimmt (Abb. 3.19).

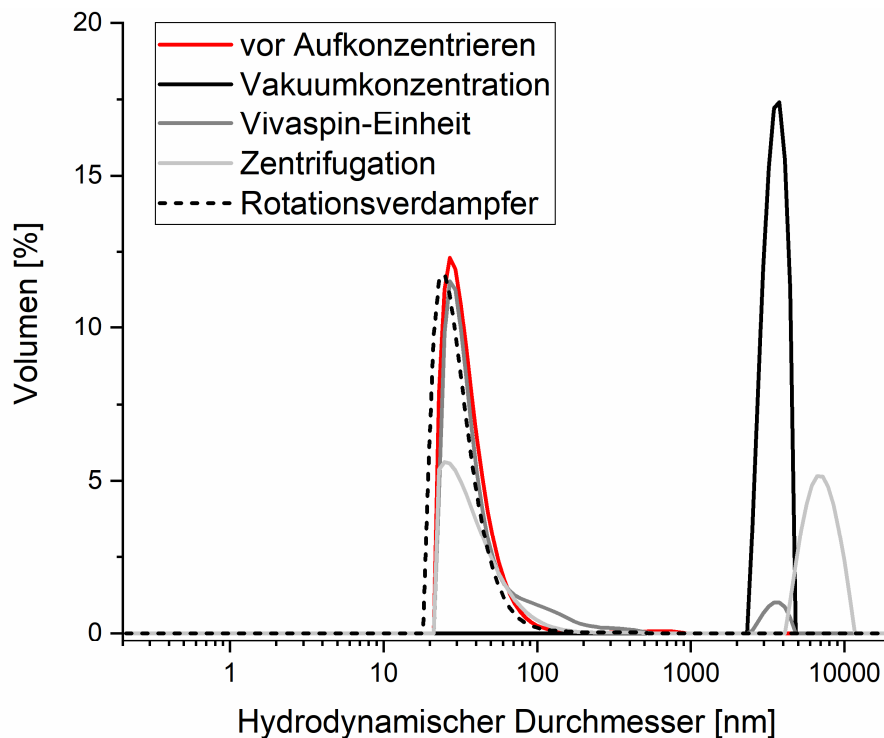


Abb. 3.19: Größenverteilung der volumengewichteten hydrodynamischen Durchmesser von PCL_{4,8}-NP, deren Suspensionen mit verschiedenen Methoden eingengt wurden. Die rote Linie zeigt zum Vergleich eine Größenverteilung von PCL_{4,8}-Nanopartikeln, deren Suspension nicht eingengt wurde.

Die Größenverteilungen der Nanopartikel, deren Suspensionen mittels Vivaspin-Einheit oder Zentrifugation eingengt wurden, zeigen sowohl Nanopartikel im gewünschten Größenbereich (20-100 nm), jedoch auch Nanopartikel mit einer Größe von über 2000 nm. Die Nanopartikel, deren Suspension mittels Vakuumkonzentration eingengt wurde, sind mit 2500-4400 nm deutlich größer als gewünscht. Die Nanopartikel, deren Suspension mittels Rotationsverdampfer eingengt wurde, liegen mit einem Volumenanteil von 94 % im Größenbereich zwischen 20 und 100 nm. Damit ist die Volumenreduktion im Rotationsverdampfer von den untersuchten Verfahren als einziges Verfahren geeignet. Die Entstehung von Nanopartikel-Aggregaten in den anderen Verfahren ist möglicherweise auf die hohen Zentrifugalkräfte zurückzuführen, die in den anderen Verfahren auftreten.

Während der Herstellung der Nanopartikel wird der Rotationsverdampfer bereits genutzt um die Lösemittel aus dem Reaktionsansatz zu entfernen. Daher wurde ebenfalls untersucht, ob die Volumenreduktion direkt in die Herstellung der Nanopartikel integriert werden kann. Dazu wurden in drei unabhängigen Reaktionsansätzen 400 μl einer 80 μM PCL-Acetonitril-Lösung (50 °C) schnell zu 800 μl Ethanol (27 °C) gegeben und bei 1000 rpm inkubiert. Nach 30 Minuten wurde dieses Gemisch zu 4,8 ml deionisiertem Wasser gegeben und durchmischt. Die Lösemittel, sowie ein Teil des deionisierten Wassers wurden anschließend bei 45 °C und 20 mbar am Rotationsverdampfer entfernt. Die hydrodynamischen Durchmesser wurden mittels DLS bestimmt (Abb. 3.20).

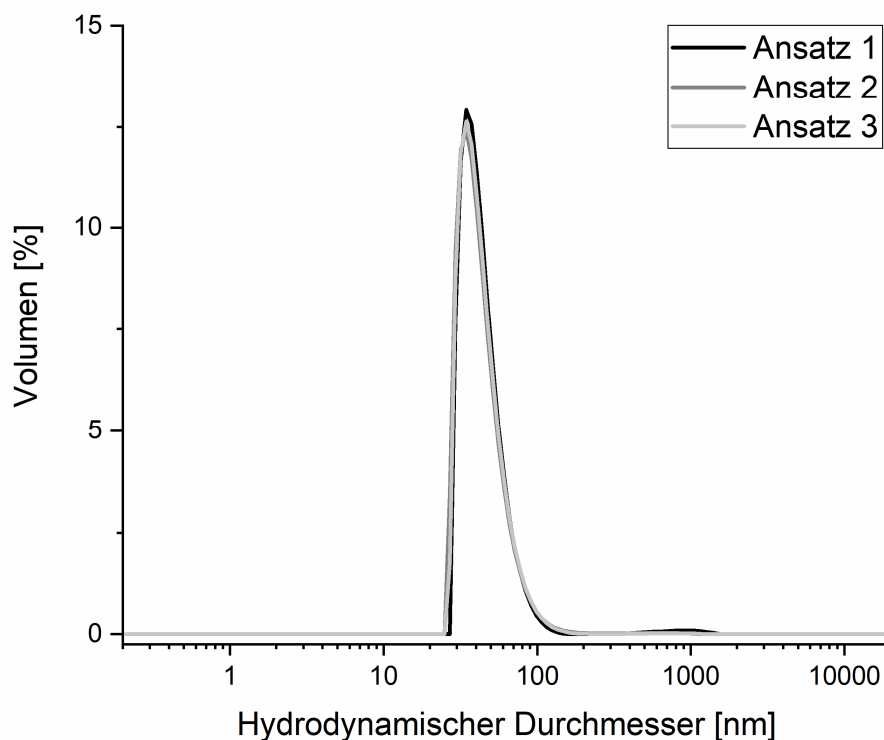


Abb. 3.20: Größenverteilung der volumengewichteten hydrodynamischen Durchmesser von PCL_{4,8}-NP, die mittels Nanopräzipitation im Batch-Verfahren hergestellt und deren Suspensionen am Rotationverdampfer direkt während der Herstellung der Nanopartikel eingengt wurden.

Die drei Reaktionsansätze weisen eine beinahe identische Größenverteilung und einen mittleren Durchmesser von 48 ± 4 nm auf. Demnach ist diese Methode gut geeignet, um Nanopartikel-Suspensionen direkt während ihrer Synthese einzuengen, ohne dass deren

Größe im Vergleich zur bisherigen Herstellungsmethode abweicht. Mit dieser Methode konnte das Volumen der Nanopartikel-Suspension von 4 ml auf etwa 600 µl eingengt werden, dies entspricht einem Faktor von etwa 7. In einem nächsten Prozessschritt sollen nun Aptamere an die Partikeloberfläche gekoppelt werden, um die bisher unspezifischen Nanopartikel zu einem *Targeted* DDS zu erweitern.

3.4.2 Kopplung von aminomodifizierten Aptameren an die Nanopartikel-Oberfläche

Die Kopplung der Aptamere an die Partikeloberfläche erfolgte nach Aktivierung der Carboxylgruppen auf der Nanopartikeloberfläche mit 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimid (EDC) über eine 5' terminale Aminomodifikation der Aptamere. Für die Reaktion wurden Nanopartikel und aminomodifizierte Aptamere im Verhältnis 1:80.000 in Natriumboratpuffer (10 mM, pH 7,4) gemischt. Zu diesem Gemisch wurde anschließend eine frisch hergestellte EDC-Lösung in Natriumboratpuffer gegeben, sodass die finale Konzentration der Nanopartikel 8 pM und die Konzentration des Aptamers 660 nM betrug. Der Reaktionsansatz wurde über Nacht bei 20 °C und 1000 rpm schüttelnd inkubiert. Danach wurde die Reaktion durch Zugabe von Natriumboratpuffer mit pH 8,3 (50 mM) gestoppt, da die Reaktion hauptsächlich bei sauren bis neutralen pH-Werten ablaufen kann [73]. Anschließend wurde die Menge an immobilisiertem Aptamer densitometrisch in einem Agarosegel bestimmt. Dabei wandern die Nanopartikel aufgrund ihrer Größe nicht in das Agarosegel, sondern verbleiben in der Tasche. So können nicht immobilisierte Aptamere während des Gellaufs von den Nanopartikeln und den darauf immobilisierten Aptameren getrennt werden. Der Anteil des nicht immobilisierten Aptamers kann dann im Vergleich zu einer Referenzprobe (Aptamere wurden auf dieselbe Weise behandelt, wie bei der Kopplung, jedoch wurden keine Nanopartikel zum Ansatz gegeben) bestimmt werden. Auf diese Weise konnte der Erfolg der Kopplung nachgewiesen werden. Es wurden pro Nanopartikel etwa 2.400 Aptamere immobilisiert.

Nachfolgend wurde untersucht, ob die Immobilisierung der Aptamere zu Veränderungen im hydrodynamischen Durchmesser der Nanopartikel führt. Dabei entstehen durch die Immobilisierung der Aptamere zwei gegenläufige Effekte. Zum einen sorgen die Aptamere aufgrund ihrer Größe für eine Vergrößerung des hydrodynamischen Durchmessers. Zum anderen sorgt die negative Ladung der Aptamere dafür, dass die Hydrathülle stärker angezogen wird, sodass dadurch der hydrodynamische Durchmesser verringert wird [74]. Um die Effekte der Kopplung von Aptameren auf die PCL_{4,8}-Nanopartikel zu untersuchen, wurden daher Nanopartikel mit und ohne immobilisierte Aptamere mittels DLS untersucht. Zusätzlich wurde der Einfluss der zur Kopplung eingesetzten Reagenzien untersucht. Alle Ansätze wurden, nach Abschluss der Reaktion, für zwei Tage gegen deionisiertes Wasser dialysiert, um unreaktiertes EDC, ungebundene Aptamer, sowie andere Pufferbestandteile abzutrennen. Anschließend wurden die Nanopartikel mittels DLS hinsichtlich ihres hydrodynamischen Durchmessers (Abb. 3.21) untersucht.

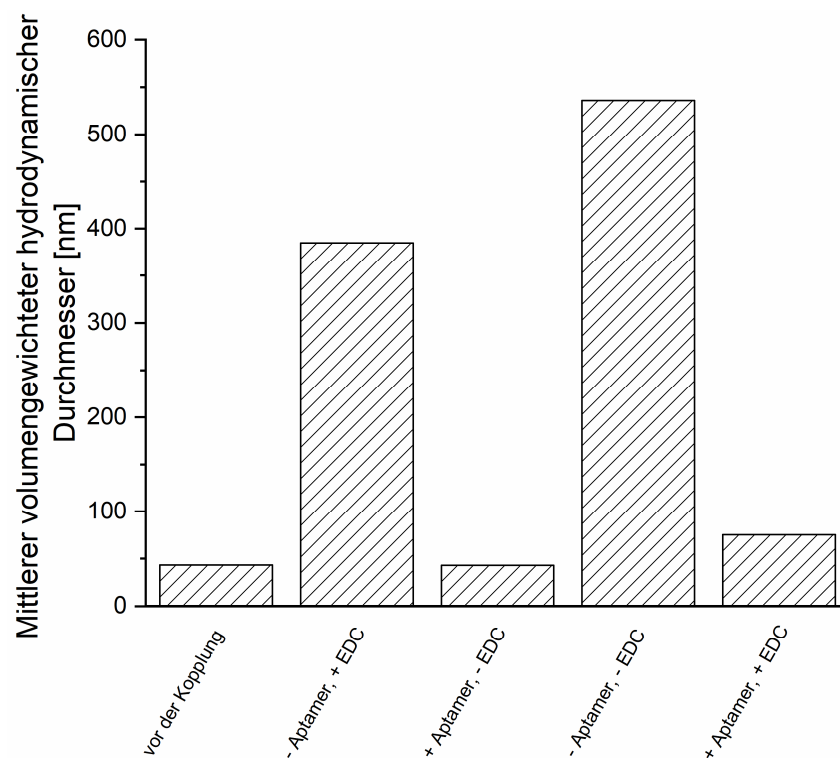


Abb. 3.21: Mittlere volumengewichtete hydrodynamische Durchmesser von PCL_{4,8}-NP. Verglichen wurden unbehandelte Nanopartikel (vor der Kopplung), verschiedene Negativkontrollen sowie Nanopartikel, die mit Aptamer konjugiert wurden (+ Aptamer, + EDC).

Die PCL_{4,8}-Nanopartikel haben vor der Inkubation mit den verschiedenen bei der Kopplung genutzten Reagenzien einen hydrodynamischen Durchmesser von 43 nm. Werden die Nanopartikel genauso behandelt, wie bei der Kopplung, dem Ansatz jedoch kein Aptamer und kein EDC zugegeben (- Aptamer, - EDC) steigt der mittlere hydrodynamische Durchmesser deutlich auf 536 nm an. Die Größenverteilung zeigt dabei zwei Peaks, ein Volumenanteil der Nanopartikel von 86 % liegt trotz des großen mittleren hydrodynamischen Durchmessers im gewünschten Größenbereich zwischen 20 und 100 nm, es tritt jedoch ein zweiter Peak auf, der Nanopartikel im Größenbereich zwischen 1823-6663 nm zeigt. Möglicherweise fördern die geladenen Ionen des Puffers oder die Temperatur von 20 °C während der Inkubation die Aggregation eines Teils der Nanopartikel. Wird dem Ansatz EDC, jedoch kein Aptamer zugegeben (- Aptamer, + EDC), steigt der mittlere hydrodynamische Durchmesser ebenfalls deutlich an (385 nm), jedoch nicht so stark, wie bei der Behandlung der Nanopartikel ohne EDC. Jedoch haben hier alle Nanopartikel einen hydrodynamischen Durchmesser zwischen 148 und 748 nm. Das heißt, dass in diesem Fall alle Nanopartikel aggregiert sind, jedoch nicht so große Aggregate entstehen, wie bei der Inkubation der Nanopartikel ohne EDC. Die Aggregation könnte durch Kopplung von Hydroxylgruppen der Polymere mit aktivierten Carboxylgruppen der Nanopartikel entstehen, wodurch Nanopartikel untereinander konjugiert werden würden. Wird dem Ansatz lediglich Aptamer und kein EDC zugegeben (+ Aptamer, - EDC) entspricht der hydrodynamische Durchmesser genau der Größe der Nanopartikel vor der Kopplung, das Aptamer stabilisiert demnach die Nanopartikel. Der hydrodynamische Durchmesser der Nanopartikel aus dem Kopplungsansatz mit allen Kopplungsbestandteilen ist im Vergleich zu den Nanopartikeln vor der Kopplung auf 75 nm angestiegen, jedoch nicht so stark wie in den Ansätzen, in denen die Nanopartikel nur mit Puffer oder mit Puffer und EDC inkubiert wurden. Dies deutet darauf hin, dass das Aptamer die Nanopartikel stabilisiert und vor Aggregation schützt. Ein Volumenanteil von 92 % der mit Aptamer gekoppelten Nanopartikel im gewünschten Größenbereich zwischen 20 und 100 nm. Auch die Aptamer-Nanopartikel-Konjugate sind somit hinsichtlich ihrer Größe für das *Drug Delivery* geeignet. Zudem konnte erfolgreich ein *Targeted Drug Delivery* System aufgebaut werden, dessen Anwendbarkeit in Modellversuchen im folgenden Kapitel untersucht wird.

3.5 Anwendbarkeit der entwickelten PCL-Nanopartikel für *Targeted Drug Delivery Systeme*

Ziel der Arbeit war die Entwicklung eines TDDS auf Basis von PCL-Nanopartikeln. Nachfolgend soll die Anwendbarkeit des entwickelten Systems in einer *in vitro* Studie untersucht werden. In diesem TDDS-Modell wurde das Aptamer S15 als Affinitätsligand gewählt. S15 wurde gegen humane, nicht-kleinzellige Lungenkarzinom-Zellen (A549 Zellen) selektiert [75], sodass mit dem Aptamer S15 gekoppelte Nanopartikel an diese Zellen binden können. Die selektive Bindung und Aufnahme von Aptamer S15-modifizierten Nanopartikeln, in A549 Zellen wurde bereits in der Literatur beschrieben, allerdings für Nanopartikel aus PEG-PCL [67]. Neben der Bindung der Nanopartikel an die Zielzellen sind weitere Parameter für die Einsetzbarkeit entscheidend, welche im Folgenden beschrieben werden.

3.5.1 Zytotoxizität von Polycaprolacton-Nanopartikeln

Der Einfluss der entwickelten Nanopartikel und des Modell TDDS auf A549 Zellen wurde untersucht, indem die Zellen nach dem Teilen zunächst für 24 Stunden kultiviert wurden. Anschließend wurden die jeweilige Proben (verdünnt in Medium; maximal 48 Stunden vor der Zugabe zu den Zellen hergestellt) zu den Zellen gegeben und für 72 Stunden mit den Zellen inkubiert. Zur Bestimmung der Viabilität wurde im Anschluss ein *CellTiter Blue* (CTB) Assay durchgeführt.

Zunächst wurde die Zytotoxizität von unmodifizierten Nanopartikeln aus reinem PCL_{4,8} und dieser Nanopartikel mit gekoppeltem Aptamer untersucht. Die erzeugten Nanopartikel ohne PTX sind in diesen Analysen unabhängig von ihrer Modifikation für A549 Zellen nicht zytotoxisch (Daten nicht gezeigt). Im nächsten Schritt wurde die Zytotoxizität von Nanopartikel mit eingekapseltem PTX im Vergleich zum freien Wirkstoff untersucht. Gleichzeitig wurde der Effekt einer Modifikation der PTX-Nanopartikel mit dem Aptamer S15 als Affinitätsliganden oder eines randomisierten Kontroll-Oligonukleotids untersucht. Es konnte jedoch bei gleicher PTX-Konzentration kein Unterschied in der Wirksamkeit von freiem PTX zu PTX-PCL_{4,8}-Nanopartikeln festgestellt

werden (Daten nicht gezeigt). Zudem konnten keine Unterschiede in der Viabilität der Zellen festgestellt werden, die mit den mit Aptamer S15 bzw. mit den Kontroll-Oligonukleotid modifizierten Nanopartikeln inkubiert wurden.

Mögliche Ursachen könnten eine zu schnelle Freisetzung des PTX aus den Nanopartikeln, bzw. ein Zerfall der Nanopartikel sein. Dadurch würde das PTX in das Medium gelangen und unselektiv auf die Zellen wirken. Um diese Hypothese zu überprüfen wurde die Lagerstabilität sowie die Stabilität der Nanopartikel unter physiologischen Bedingungen untersucht.

3.5.2 Lagerstabilität von PCL_{4,8}-PTX-Nanopartikeln

Für den Einsatz von Nanopartikeln in einem *Drug Delivery* System ist neben deren Größe besonders deren Stabilität entscheidend. Von der Stabilität hängt ab, über welchen Zeitraum die Nanopartikel vom Zeitpunkt der Herstellung, bis zu ihrem Einsatz, gelagert werden können. Daher wurde zum einen die Stabilität der Nanopartikel hinsichtlich ihres hydrodynamischen Durchmessers und zum anderen die PTX-Freisetzung unter Lagerungsbedingungen untersucht.

Größe und Polydispersitätsindex

Um die Stabilität der Nanopartikel während der Lagerung zu untersuchen, wurden zunächst PCL-PTX-Nanopartikel aus PCL_{4,8} hergestellt, wobei der Polymer-Acetonitril-Lösung bei der Herstellung der Partikel 70 µM PTX zugefügt wurden. Die Partikel wurden anschließend bei 4 °C für 21 Tage in deionisiertem Wasser in einem Reaktionsgefäß gelagert. Zur Untersuchung der Partikelstabilität wurde der hydrodynamische Durchmesser nach 21 Tagen mit den Ausgangswerten verglichen. Es wurden drei unabhängig voneinander hergestellte Ansätze untersucht. Die Abbildung 3.22 zeigt die hydrodynamischen Durchmesser und die Polydispersitätsindizes der Ansätze direkt nach der Herstellung und nach 21-tägiger Lagerung.

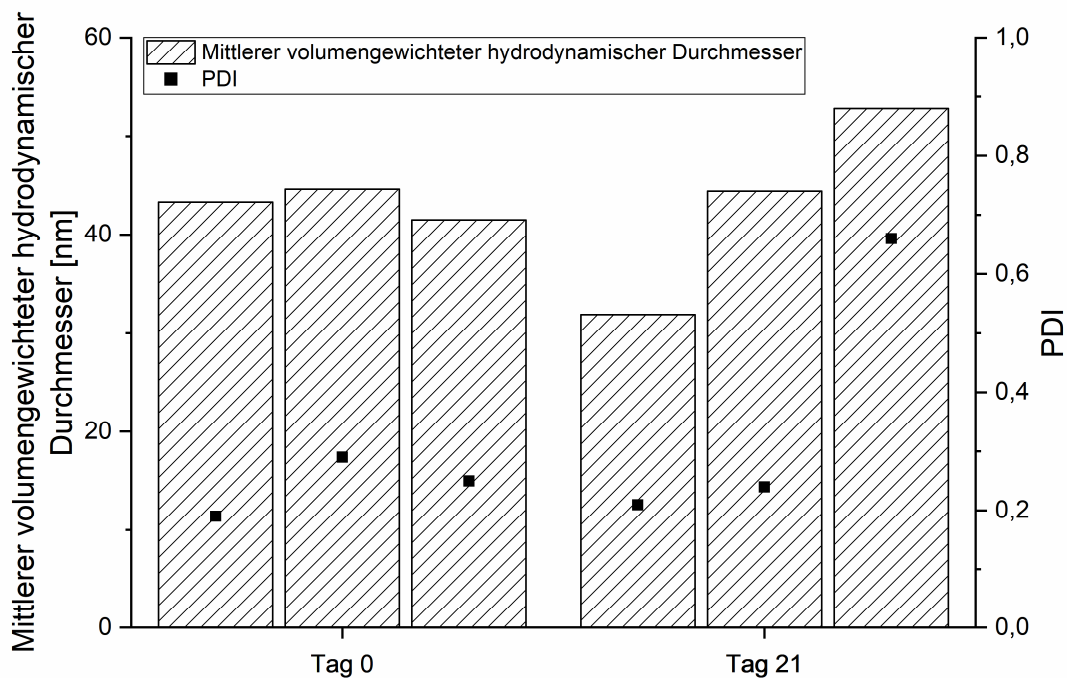


Abb. 3.22: Mittlere volumengewichtete hydrodynamische Durchmesser und Polydispersitätsindizes (PDI) von PCL_{4,8}-PTX-Nanopartikeln nach der Herstellung bzw. nach 21 Tagen Lagerung bei 4 °C in Wasser. Gezeigt sind die Daten von drei unabhängig hergestellten Ansätzen.

Direkt nach der Herstellung der Nanopartikel haben die drei Ansätze einen hydrodynamischen Durchmesser von 42-45 nm. Nach 21-tägiger Lagerung ist der hydrodynamische Durchmesser von Ansatz A auf 32 nm gesunken, der hydrodynamische Durchmesser von Ansatz C ist jedoch auf 53 nm gestiegen, lediglich der hydrodynamische Durchmesser von Ansatz B ist mit 44 nm etwa gleich geblieben. Die Lagerung bei 4 °C im Reaktionsgefäß hat demnach nur geringe Auswirkungen auf den hydrodynamischen Durchmesser der Nanopartikel. Dies zeigt, dass die Nanopartikel hinsichtlich ihrer Größe mindestens über einen Zeitraum von 21 Tagen nahezu stabil sind.

Die Polydispersitätsindizes der Nanopartikel in den drei Ansätzen liegen direkt nach der Herstellung zwischen 0,19 und 0,29. Dies zeigt, dass die Nanopartikel eine gute Homogenität bezüglich des hydrodynamischen Durchmessers aufweisen. Nach einer Lagerung von 21 Tagen liegen die PDI der ersten beiden Ansätze weiter zwischen 0,21 und

0,24, die Partikel haben also auch nach 21 Tagen eine gute Homogenität. In Ansatz drei hingegen ist der PDI auf 0,66 angestiegen, was auf eine breite Größenverteilung hindeutet. Insgesamt gesehen, sind die Nanopartikel hinsichtlich ihres hydrodynamischen Durchmessers auch nach einer Lagerung von 21 Tagen weiter in einem Größenbereich, der gut für das *Drug Delivery* geeignet ist.

Freisetzung von PTX unter Lagerbedingungen

Neben der Größe der Nanopartikel ist in *Drug Delivery* Systemen jedoch auch die Stabilität hinsichtlich der Wirkstofffreisetzung entscheidend. Die Nanopartikel müssen unter Lagerungsbedingungen den Wirkstoff möglichst lange einkapseln, sodass der Wirkstoff in den Nanopartikeln verbleibt bis die Nanopartikel im Patienten zum Einsatz kommen.

Die Freisetzung von Wirkstoffen aus Nanopartikeln kann auf verschiedene Weisen untersucht werden, am geläufigsten sind die Methoden *Sample and Separate*, *Continuous Flow* und das Dialysemembranverfahren [76, 77]. Beim *Sample and Separate* Verfahren werden Nanopartikel direkt mit einem Freisetzungsmedium durchmischt. Zur Probenentnahme müssen die Partikel dann durch Ultrafiltration oder Ultrazentrifugation vom Freisetzungsmedium getrennt werden. Der Wirkstoffgehalt kann anschließend im Überstand bzw. Filtrat bestimmt werden. Der Aufbau zur Untersuchung der Freisetzung ist bei diesem Verfahren sehr einfach, da lediglich ein Gefäß benötigt wird, jedoch ist die Probenentnahme aufwendig [76, 77]. Bei der Untersuchung der Freisetzung von Wirkstoffen mittels *Continuous Flow* ist der apparative Aufwand größer, die Probenentnahme jedoch einfacher. Die Nanopartikel werden hier in eine Säule gegeben, durch welche kontinuierlich das Freisetzungsmedium zirkuliert, die Nanopartikel werden jedoch in der Säule zurückgehalten. Der Wirkstoffgehalt wird in Proben des Freisetzungsmediums bestimmt [76, 77]. Beim Dialysemembranverfahren sind sowohl der Aufbau, als auch die Probenentnahme einfach. Die mit Wirkstoff beladenen Nanopartikel werden in einen Dialyseschlauch gegeben, dessen *Molecular Weight Cut-Off* so gewählt wird, dass die Nanopartikel die Membran im Gegensatz zum Wirkstoff nicht pas-

sieren können. Dieser Dialyseschlauch wird dann in ein Freisetzungsmedium gegeben. Zur Bestimmung der Menge an freigesetztem Wirkstoff werden Proben des Freisetzungsmediums genommen [76, 77]. Bei der Freisetzung von hydrophoben Wirkstoffen wie z. B. PTX muss jedoch deren schlechte Löslichkeit und geringe Stabilität in wässrigem Medium [78], sowie eine mögliche Adsorption an hydrophobe Oberflächen beachtet werden.

In dieser Arbeit wurde aufgrund des geringen apparativen Aufwandes das Dialys membranverfahren zur Untersuchung der Freisetzung des PTX aus den Nanopartikeln genutzt. Um Probleme wie die schlechte Löslichkeit und geringe Stabilität des PTX in wässrigem Medium sowie eine mögliche Adsorption des PTX an die hydrophobe Gefäßwand zu vermeiden wurde hier jedoch die verbliebene PTX-Menge in den Nanopartikeln bestimmt. Dazu wurden zunächst Nanopartikel hergestellt. Pro Ansatz wurden 28 nmol PTX zugesetzt (70 μ M in 400 μ l Acetonitril). Die Nanopartikel-Suspensionen von insgesamt 11 Ansätzen wurden zusammen gegeben. Die Startmenge an PTX in der Nanopartikel-Suspension wurde bestimmt, indem ein Milliliter der Nanopartikel-Suspension unter vermindertem Druck getrocknet und anschließend die Nanopartikel durch Zugabe von Acetonitril und Erhitzen zerstört wurden. Die Konzentration des PTX wurde mittels HPLC bestimmt. Die Startmenge an PTX wurde daraus berechnet und lag bei 5,64 nmol (pro 2 ml Nanopartikel-Suspension die für jede Probe verwendet wurden). PCL, welches möglicherweise in der Probe verbleibt, zeigt bei einer Wellenlänge von 228 nm im Gegensatz zum PTX keine Absorption, sodass die Bestimmung der PTX-Konzentration durch das PCL nicht gestört wird. Von der Nanopartikel-Suspension wurden jeweils 2 ml in einen Dialyseschlauch gegeben (MWCO: 3,5 kDa) und in 10 ml deionisiertem Wasser bei 4 °C inkubiert. Über einen Zeitraum von 21 Tagen wurden Proben der Nanopartikel genommen, dafür wurde die gesamte Nanopartikel-Suspension aus dem Dialyseschlauch entnommen und unter vermindertem Druck getrocknet. Je Messzeitpunkt wurden dabei drei unabhängige Proben entnommen. Die Proben wurden anschließend bei 50 °C mit 100 μ l Acetonitril schüttelnd inkubiert. Bei dieser Temperatur löst sich das PCL_{4,8}, sodass das noch enthaltene PTX in Lösung geht. Die Menge an enthaltenem PTX wurde anschließend mittels HPLC bestimmt. Aus die-

sen Messergebnissen kann anschließend die prozentuale Menge an freigesetztem PTX berechnet werden (Abb. 3.23).

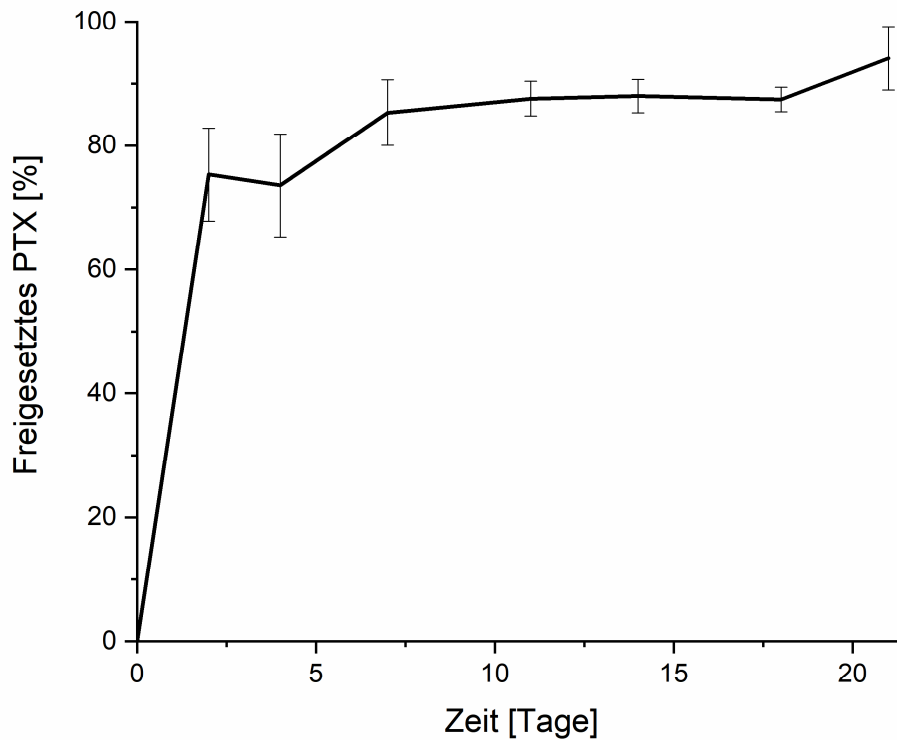


Abb. 3.23: Freisetzung von PTX aus PCL_{4,8}-PTX-Nanopartikeln während der Lagerung in Wasser bei 4 °C (Mittelwerte und Standardabweichungen einer Dreifachbestimmung). 100 % PTX entspricht 5,64 nmol PTX, welches in den eingesetzten 2 ml Nanopartikel-Suspension vorhanden war.

Die Kurve der PTX-Freisetzung zeigt einen steilen Anstieg und nach zwei Tagen sind bereits 75 % des PTX aus den Nanopartikeln freigesetzt worden. Danach steigt der Anteil des freigesetzten PTX bis Tag 21 auf 94 % langsam an. Die schnelle Freisetzung zu Beginn der Untersuchung kann bei vielen *Drug Delivery* Systemen beobachtet werden [67]. Dabei kann die Freisetzung von Wirkstoffen aus biodegradierbaren Nanopartikeln über verschiedene Mechanismen erfolgen, beispielsweise über den Zerfall der Partikel, Diffusion des Wirkstoffs aus den Partikeln über die Polymerwand/Partikelmatrix, sowie über die Desorption von oberflächengebundenen Wirk-

stoffmolekülen [79]. Dabei wird zunächst adsorbiertes PTX von der Partikeloberfläche freigesetzt, anschließend erfolgt eine langsamere Freisetzung des eingekapselten PTX. Da unter Lagerungsbedingungen das Freisetzungsmedium nicht gewechselt wurde, hat sich nach sieben Tagen vermutlich ein Gleichgewicht zwischen dem gelösten PTX innerhalb und außerhalb des Dialyseschlauches und dem verbliebenen PTX in den Nanopartikeln ausgebildet. Eine Probe der Nanopartikel-Suspension kann daher weiterhin PTX enthalten, auch wenn dieses nicht mehr in den Nanopartikeln eingekapselt ist. Insgesamt zeigen die Nanopartikel mit der starken Freisetzung zu Beginn der Untersuchung ein typisches Freisetzungsverhalten. Jedoch muss für einen möglichen Einsatz als *Drug Delivery System* beachtet werden, dass unter den untersuchten Lagerungsbedingungen bereits nach zwei Tagen ein Großteil des PTX freigesetzt wird. Die Nanopartikel, die für die Untersuchung der Zytotoxizität verwendet wurden, wurden maximal 48 Stunden vor ihrer Inkubation mit den Zellen hergestellt. Zu diesem Zeitpunkt war also ein Großteil des PTX bereits während der Lagerung aus den Partikeln freigesetzt, sodass die unselektive Wirkung der Proben auf die Zellen zum Teil durch diese Freisetzung erklärt werden kann.

In der bisherigen therapeutischen Anwendung wird PTX gelöst in Ethanol in Kombination mit Cremophor EL (mehrfach ethoxyliertes Rizinusöl) genutzt, die Stabilität dieser Formulierung wird jedoch lediglich mit 27 Stunden angegeben [80]. Demnach müsste das in dieser Arbeit entwickelte *Drug Delivery System*, wie auch die konventionelle Formulierung des Paclitaxels vor der Verwendung frisch hergestellt werden. Im Gegensatz zur konventionellen Formulierung weist die Formulierung als *Drug Delivery System* jedoch die Vorteile des EPR-Effekts auf, sodass Nebenwirkungen, die in der konventionellen Therapie entstehen, durch die Verwendung von Nanopartikeln verringert und die Wirksamkeit der Therapie erhöht werden können.

Da die Zellen für 72 Stunden mit den Nanopartikeln inkubiert wurden, sollte die Wirkstofffreisetzung zusätzlich unter physiologischen Bedingungen untersucht werden.

3.5.3 Freisetzung von PTX unter simulierten physiologischen Bedingungen

Im Körper umgeben die Nanopartikel andere Bedingungen als bei der Lagerung. Um diese Bedingungen und deren Einfluss auf die Freisetzung des PTX zu simulieren, wurde wiederum das Dialysemembranverfahren genutzt. Unter physiologischen Bedingungen würde das aus den Nanopartikeln freigesetzte PTX im Körper verteilt und zudem abgebaut werden. Diese Verteilung im Körper sorgt dafür, dass sich unter physiologischen Bedingungen kein Gleichgewicht zwischen freigesetztem Wirkstoff und Wirkstoff im Nanopartikel ausbilden kann. Daher sollten bei *in vitro* Freisetzungsversuchen die Bedingungen so gewählt werden, dass die Einstellung eines Gleichgewichts verhindert wird. Dies kann erfolgen, indem eine kleine Menge an Nanopartikel-Suspension gegen ein großes Volumen an Freisetzungsmedium dialysiert wird, oder indem Lösungsvermittler zum Freisetzungsmedium gegeben werden [78]. Als Lösungsvermittler werden dabei in der Regel Emulgatoren verwendet [76]. Als Freisetzungsmedium werden oft wässrige Puffer verwendet, um die Freisetzung unter verschiedenen physiologisch vorkommenden pH-Werten simulieren zu können.

In dieser Arbeit wurde als Freisetzungsmedium PBS-Puffer verwendet, da dieser auf verschiedene pH-Werte eingestellt werden kann. Es wurde dafür unter anderem ein pH-Wert von 7,4 gewählt, welcher dem pH-Wert von Blut entspricht [81], der pH-Wert im Tumorgewebe ist mit 6,8 dagegen etwas niedriger [82], daher wurde die Freisetzung des PTX auch bei diesem pH-Wert untersucht. Um das Freisetzungsverhalten des Wirkstoffs aus den Nanopartikeln bei einer möglichen Aufnahme in die Zellen über die Endosome und Lysosome zu simulieren, wurde zusätzlich ein pH-Wert von 5,0 gewählt, da in diesen Kompartimenten ein pH-Wert zwischen 4,5 und 6,5 herrscht [82].

Wie zuvor beschrieben wurden PCL-PTX-Nanopartikel hergestellt. Zur Bestimmung der Menge an in der Nanopartikel-Suspension enthaltenem PTX wurde ein Milliliter dieser Nanopartikel-Suspension unter vermindertem Druck getrocknet, und die enthaltene Menge an PTX mittels HPLC bestimmt (Start-PTX-Mengen in jeweils 2 ml Nanopartikel-Suspension: pH 5,0: 7,16 nmol ; pH 6,8: 6,58 nmol; pH 7,4: 6,75 nmol). Von der restlichen Nanopartikel-Suspension wurden jeweils 2 ml in Dialyseschläuche gegeben (MWCO: 3,5 kDa). Diese wurden in 1 l des jeweiligen Puffers gegeben und bei

37 °C rührend inkubiert. Die Ausbildung eines Gleichgewichts zwischen dem freien PTX im FreisetzungsmEDIUM und dem verbliebenen PTX in den Nanopartikeln sollte durch den Zusatz von 0,1 % Tween 80 zum FreisetzungsmEDIUM und den Wechsel des FreisetzungsmEDIUMS alle 24 Stunden verhindert werden. Über einen Zeitraum von etwa 100 Stunden wurden je Zeitpunkt drei unabhängige Proben der Nanopartikel genommen, dafür wurde jeweils die gesamte Nanopartikel-Suspension aus einem Dialyseschlauch entnommen und unter vermindertem Druck getrocknet. Wiederum wurden die getrockneten Nanopartikel bei 50 °C in 100 µl Acetonitril gelöst, sodass auch das PTX in Lösung geht. Die Menge an enthaltenem PTX wurde anschließend mittels HPLC bestimmt, in Relation zur Startmenge ergibt sich anschließend der Anteil an freigesetztem PTX (Abb. 3.24). Für eine bessere Übersicht, ist nachfolgend nur die Menge an freigesetztem PTX für den Zeitraum von 0-20 Stunden dargestellt. Zu den Messzeitpunkten 44, 68 und 92 Stunden war bei allen drei pH-Werten bereits das gesamte PTX freigesetzt.

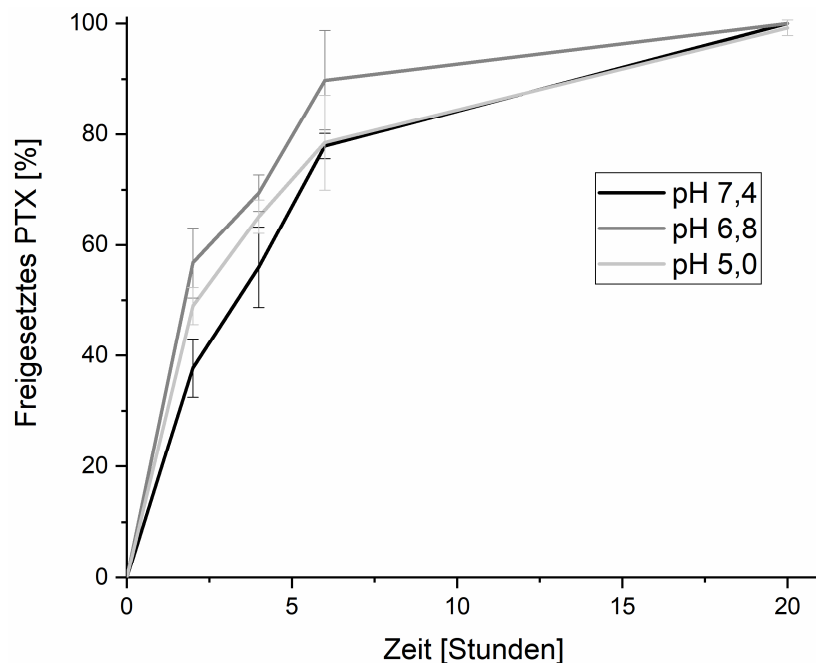


Abb. 3.24: Freisetzung von PTX aus PCL_{4,8}-PTX-Nanopartikeln unter verschiedenen simulierten physiologischen Bedingungen (Variation der pH-Werte, jeweils in 1x PBS mit 0,1 % Tween 80 bei 37°C); (Mittelwerte und Standardabweichungen einer Dreifachbestimmung). Zur besseren Übersicht wurden die Werte der Probenentnahmen nach 44, 68 und 92 Stunden nicht dargestellt, dort waren bei allen untersuchten pH-Werten bereits 100 % des PTX freigesetzt.

Ähnlich zur Freisetzung von PTX in Wasser steigt die Menge des freigesetzten PTX bei allen untersuchten pH-Werten zunächst stark an. Nach zwei Stunden wurde bei pH 7,4 im Mittel bereits 38 % des PTX freigesetzt, bei den pH-Werten von 6,8 und 5,0 waren es mit 57 % und 49 % freigesetztem PTX jedoch deutlich mehr. Nach 20 Stunden wurde aus den Nanopartikeln bei allen untersuchten pH-Werten bereits nahezu das gesamte PTX freigesetzt. Die Freisetzung des PTX erfolgt bei einem pH-Wert von 7,4 insgesamt etwas langsamer als bei den pH-Werten 6,8 und 5,0, diese Unterschiede sind jedoch gering, sodass davon ausgegangen werden kann, dass die Freisetzung von PTX aus den PCL_{4,8}-PTX-Nanopartikeln bei den untersuchten pH-Werten ähnlich schnell erfolgt.

Zur Untersuchung der Zytotoxizität der Nanopartikel wurden diese für 72 Stunden mit den A549 Zellen inkubiert. Die Versuche zur Freisetzung unter physiologischen Bedingungen zeigen, dass während dieser Zeit das gesamte PTX aus den Partikeln freigesetzt wird. Aufgrund dieser Ergebnisse und der in Kapitel 3.5.2 gezeigten Freisetzung des PTX aus den Nanopartikeln während der Lagerung kann die Hypothese, dass das PTX zu schnell aus den Partikeln freigesetzt wird und daher unspezifisch auf die Zellen wirken kann, bestätigt werden.

Dabei ist die schnelle Freisetzung des PTX aus den Nanopartikeln nicht nur für die Untersuchung der Zytotoxizität problematisch. In Mäusen tritt der EPR-Effekt bereits nach 30 Minuten auf, eine größere Akkumulation erfolgt jedoch erst nach mehreren Stunden [83, 84]. Im Menschen dauert die Verteilung der Partikel vermutlich etwas länger, wird jedoch ebenfalls in dieser Zeitspanne erfolgen. Da die Nanopartikel in den hier gezeigten *in vitro* Untersuchungen bereits nach 2 Stunden je nach pH-Wert 38-57 % des PTX freisetzen, kann davon ausgegangen werden, dass PTX bereits im Blut und nicht erst im Zielgewebe freigesetzt wird. Dadurch würden im Patienten aufgrund der unspezifischen Verteilung im Körper Nebenwirkungen entstehen. Um dies zu verhindern, sollten die Nanopartikel in zukünftigen Arbeiten so weiter entwickelt werden, dass die Freigabe des PTX langsamer verläuft.

Eine Möglichkeit dazu wäre z. B. die Modifikation der Nanopartikeloberfläche mit Polymeren wie Polyethylenglykol [85]. In der Literatur ist z. B. für Polylactid-

Nanopartikel beschrieben, dass die Freisetzung von eingekapseltem Rifampicin verlangsamt werden kann, wenn zusätzlich zum Polylactid Polyethylenglykol als Polymer genutzt wird [85]. Neben Polyethylenglykol kann auch das Polymer Poly(N-Isopropylacrylamid) genutzt werden, um die Freisetzung von Wirkstoffen aus Nanopartikeln zu verlangsamen [86]. Das Polymer wurde beispielsweise als Copolymer mit PCL genutzt und bildet dabei eine thermosensitive Hydrogelschicht auf der Nanopartikeloberfläche [86]. Dadurch entsteht eine zusätzliche Diffusionsbarriere, die die Freisetzung von Wirkstoffen verlangsamt [86]. Die Bildung einer Schicht auf der Nanopartikeloberfläche, welche die Diffusion aus den Nanopartikeln verlangsamt ist ebenfalls mit Chitosan möglich [87]. Auch die Verwendung von PCL mit einer höheren Polymermolekülmasse könnte die Wirkstofffreisetzung verlangsamen. Für Nanopartikel aus Polylactid wurde beispielsweise gezeigt, dass eine höhere Molekülmasse des Polylactids die Freisetzung von BSA verlangsamt [55]. Auch bei einer höheren Polymermolekülmasse von PEG-PCL konnte eine verlangsamte Freisetzung aus den Nanopartikeln beobachtet werden [59]. Yoo *et al.* konnten durch eine kovalente Konjugation von Doxorubicin mit PLGA die vollständige Freisetzung von Doxorubicin aus Nanopartikeln von 5 Tagen auf 25 Tage verlangsamen [88]. Damit ist auch eine kovalente Bindung des Wirkstoffs an das Polymer eine mögliche Alternative, wobei jedoch darauf geachtet werden muss, dass die Aktivität des Wirkstoffs nicht beeinträchtigt wird.

Insgesamt gesehen stellt das entwickelte *Targeted Drug Delivery* System eine gute Basis für die Optimierung der Wirkstofffreisetzung dar und bietet breite Einsatzmöglichkeiten, da der verwendete Wirkstoff und das Aptamer einfach variiert werden können und so das TDDS nach Optimierung der Wirkstofffreisetzung für verschiedene Anwendungen genutzt werden kann.

4 Zusammenfassung und Ausblick

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung von Nanopartikeln, die für *Targeted Drug Delivery* Systeme geeignet sind. Ein besonderer Fokus wurde auf die Größe der Nanopartikel gelegt, da diese entscheidend für die Verteilung der Nanopartikel im Körper ist. Die Größe der entwickelten Nanopartikel sollte daher zwischen 20 und 100 nm liegen. Um eine zytotoxische Wirkung der Nanopartikel selbst zu verhindern, wurde das bioabbaubare und nicht toxische Polymer Polycaprolacton (PCL) zur Herstellung der Nanopartikel genutzt, welches in dieser Arbeit mit verschiedenen Polymermolekülmassen (2,1, 2,3 und 4,8 kDa) hergestellt wurde.

In dieser Arbeit wurden verschiedene Methoden zur Herstellung von Nanopartikeln aus PCL mit einer Molekülmasse von 4,8 kDa optimiert, um Nanopartikel im gewünschten Größenbereich herzustellen. Mittels Nanopräzipitation konnten schließlich sowohl im Batch-Verfahren, als auch mittels Mikrofluidik Nanopartikel mit einer Größe zwischen 20 und 100 nm hergestellt werden. Dabei ist jedoch die Größe der Nanopartikel, die im mikrofluidischen System hergestellt werden, abhängig vom Zustand der genutzten Mischkammer (Kartusche). Im Batch-Verfahren konnten die Nanopartikel dagegen reproduzierbar im gleichen Größenbereich sowohl mit PCL_{4,8} (64 ± 19 nm), als auch mit PCL_{2,1} (59 ± 10 nm) und PCL_{2,3} ($21 \pm 0,5$ nm) hergestellt werden.

Des Weiteren konnte mit Hilfe eines Farbstoffs, dessen Absorptionsverhalten abhängig von der Hydrophobizität seines Milieus ist, gezeigt werden, dass hydrophobe Moleküle in die Nanopartikel eingekapselt werden können. Daher wurde die Einkapselung des hydrophoben Wirkstoffs Paclitaxel (PTX) während der Nanopartikelsynthese untersucht. Wiederum konnten im Batch-Verfahren reproduzierbar Nanopartikel im gewünschten Größenbereich hergestellt werden. Um das entwickelte passive *Drug Delivery* System zu einem *Targeted Drug Delivery* System zu erweitern, wurden die Nanopartikel mit dem Aptamer S15 modifiziert. Aptamer-modifizierte und unmodifizierte Nanopartikel ohne PTX zeigten in *in vitro* Studien keine zytotoxischen Eigenschaften. Der Nachweis des positiven Effekts einer Aptamermodifikation der PTX-haltigen Na-

nanopartikel im Vergleich zu einem Kontroll-Oligonukleotid konnte jedoch nicht erbracht werden. Eine Untersuchung der Partikelstabilität unter Lagerbedingungen (Wasser; 4 °C) und unter simulierten physiologischen Bedingungen (1x PBS mit 0,1 % Tween 80; 37 °C; pH-Wert 5,0, 6,8 bzw. 7,4) zeigte eine schnelle Freisetzung des PTX, die dem Nachweis der besseren Selektivität des TDDS entgegensteht. Unter Lagerbedingungen waren die Nanopartikel hinsichtlich ihres hydrodynamischen Durchmessers über einen Zeitraum von mindestens 21 Tagen stabil. Das enthaltene PTX wurde jedoch bereits innerhalb der ersten zwei Tage zu 75 % freigesetzt. Unter simulierten physiologischen Bedingungen erfolgte die Freisetzung des PTX innerhalb der ersten sechs Stunden zu etwa 80-90 %, nach 20-stündiger Inkubation war unabhängig vom pH-Wert das gesamte PTX freigesetzt. Diese Ergebnisse zeigen, dass während der dreitägigen Inkubation der Nanopartikel mit den Zellen das gesamte PTX aus den Nanopartikeln freigesetzt wird und dass es daher zu einer unspezifischen Wirkung des freien PTX auf die Zellen kommt. Für eine Anwendung des DDS/TDDS ist daher neben der Lagerstabilität auch die Zeit entscheidend, in der die Nanopartikel im Tumorgewebe angereichert werden müssen bevor systemische Nebenwirkungen entstehen. Der EPR-Effekt tritt in Mäusen bereits nach 30 Minuten ein, wobei eine größere Akkumulation im Tumorgewebe erst nach mehreren Stunden erfolgt [83, 84], im Menschen ist die systemische Verteilung im Körper vermutlich noch etwas langsamer, sodass die Wirkstofffreisetzung aus den Nanopartikeln für eine größere Zeitspanne optimiert werden muss. Dafür eignet sich z. B. die Ummantelung der Partikel, sodass eine zusätzliche Diffusionsbarriere entsteht, die Verwendung von weiteren Polymeren auf der Nanopartikeloberfläche, eine kovalente Bindung der Wirkstoffe an das Polymer oder die Verwendung von PCL mit einer höheren Polymermolekülmasse [55, 59, 85-88].

Zusammengefasst konnten in dieser Arbeit sowohl ein passives DDS als auch ein *Targeted Drug Delivery* System entwickelt werden, welche auf unschädlichen, biodegradierbaren Polycaprolacton-Nanopartikeln basieren und hydrophobe Wirkstoffe aufnehmen können. Die Freisetzung der hydrophoben Wirkstoffe sollte dabei durch zusätzliche Maßnahmen verlangsamt werden, um die verstärkte Selektivität von (*Targeted Drug Delivery* Systemen besser nutzen zu können. Nach der Optimierung der Wirk-

stofffreisetzung stellen die entwickelten Nanopartikel eine gute Basis für zukünftige (*Targeted*) *Drug Delivery* Systeme dar. Da in dem hier entwickelten DDS/TDDS einfach andere Wirkstoffe oder Liganden eingesetzt werden können, eröffnen sich viele weitere Anwendungsmöglichkeiten.

Abkürzungsverzeichnis

ACN	Acetonitril
CTB	<i>CellTiter-Blue</i>
DDS	<i>Drug Delivery System</i>
DLS	Dynamische Lichtstreuung
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPH	1,6-Diphenyl-1,3,5-Hexatrien
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EPR	<i>Enhanced Permeability and Retention</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FKS	Fötale Kälberserum
FRR	<i>Flow Rate Ratio</i>
GAS	<i>Gas antisolvent process</i>
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
MPS	Mononukleäres Phagozytensystem

MWCO	<i>Molecular Weight Cut-Off</i>
NMR	Kernspinresonanzspektroskopie
NP	Nanopartikel
NTA	<i>Nanoparticle tracking analysis</i>
P/S	Penicillin/Streptomycin
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCL	Polycaprolacton
PDI	Polydispersitätsindex
PEG	Polyethylenglykol
P-gp	P-Glykoprotein
PLGA	Poly-D-L-lactid-co-glycolid
PTX	Paclitaxel
<i>RESS</i>	<i>Rapid expansion of supercritical solutions</i>
<i>SAS</i>	<i>Supercritical antisolvent process</i>
SBB	<i>Sodium Borate Buffer</i> (Natriumborat-Puffer)
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TDDS	<i>Targeted Drug Delivery System</i>
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TFR	<i>Total Flow Rate</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UV	Ultraviolett

Anhang

A Material und Methoden

A.1 Verbrauchsmaterialien

96-Well-Platte (Mikrotiterplatte BRAND-plates®, 96-Well, cellGrade™, klar, U-Boden)	BRAND GMBH + CO KG, Wertheim, Deutschland (DE)
100 µl Einsätze für Braunglasflasche (Micro-Insert 0,1 ml)	VWR International GmbH, Darmstadt, DE
Braunglasflaschen (1,5ML KGW-Flasche braun)	VWR International GmbH, Darmstadt, DE
Deckel für Braunglasflasche (PP-Schraubkappe 9mm)	VWR International GmbH, Darmstadt, DE
Dialysetubes (Float-A-Lyzer® G2)	Spectrum Laboratories Inc., Piscataway, USA
Dialysierschlauch (ZelluTrans aus regenerierter Zellulose MWCO 3500)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
Einmalhandschuhe (Rotiprotect-Nitril light)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
Einmalpipetten (2,5; 5; 10 und 25 ml Costar® Stripette)	Corning Inc., Oneonta, USA
Einmalpipetten (50 ml)	SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht, DE
Kryoröhrchen (CryoPure 1,6 mL rot)	SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht, DE
Pasteurpipetten (145 mm)	BRAND GMBH + CO KG, Wertheim, DE
Pipettenspitzen (10, 200 und 1000 µl)	BRAND GMBH + CO KG, Wertheim, DE
Reagiergefäße (1,5; 2 und 5 ml)	SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht, DE
Spitzen für Multipette (ViscoTip® 10 ml)	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Spritzen 1 ml (NORM-JECT® Tuberkulinspritze 1ml)	Henke-Sass, Wolf Mikrooptik GmbH, Tuttlingen, DE

Spritzen 3 ml	BD, Temse, Belgien
Spritzenvorsatzfilter (Minisart® PES 0,22 µm,)	Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen, DE
T75-Flaschen	SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht, DE
T175-Flaschen	SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht, DE
Zellkulturplatte, 96-Well, Standard-Wachstumsoberfläche für adhärente Zellen	SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht, DE
Zentrifugalfilter (Vivaspin® 500 PES 100.000 Da MWCO)	Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen, DE
Zentrifugenröhrchen (Corning®; 15 und 50 ml)	Corning Inc., Oneonta, USA

A. 2 Geräte

DLS-Geräte:

- Zetasizer Nano ZS	Malvern Panalytical GmbH, Kassel, DE
- Particle Analyzer Litesizer™ 500	Anton Paar GmbH, Graz, Österreich
Elektrophorese-Apparatur (EC105)	Thermo EC, Thermo Fisher Scientific Inc., Hillsboro, USA
Feinwaage (Pioneer™)	Ohaus Corp., Parsippany, USA
Fluoroscans Ascent Platereader	Thermo electron Corp., Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Gefrierbehälter (Nalgene® Mr. Frosty® Cryo 1°C Freezing Containers)	NALGENE, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Gefrierschrank (-80 °C: Forma 900 Series)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
HPLC (Pumpe, Autosampler, Säulenofen, UV-VIS-Detektor: VWR-Hitachi Chromaster)	VWR International GmbH, Darmstadt, DE
HPLC-Säule (C-18 Kinetex 2,6 u, 100 x 4,6 nm)	Phenomenex Inc., Torrance, USA
Inkubationsschrank (Heracell™ 240i)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Küvetten für DLS- und Zetapotentialmessung:	
- Gefaltete Einweg-Kapillarzelle	Malvern Panalytical GmbH, Kassel, DE
- Omegaküvette	Anton Paar GmbH, Graz, Österreich
Magnetrührer mit Temperaturkontrolle (MR Hei-Mix L)	Heidolph Instruments GmbH & Co.KG, Schwabach, DE
Mikroskop (CKX 41)	Olympus Europa SE & Co. KG, Hamburg, DE
Mikrowellenherd	GoldStar, Südkorea
NanoAssemblr® Benchtop	Precision NanoSystems Inc., Vancouver, Kanada

Neubauer Zählkammer	Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co KG, Sondheim vor der Rhön, DE
NMR-Gerät (Avance™ 400)	Bruker Corporation, Billerica, USA
NTA-Messgerät (Nanoparticle Analysis System, Firefly Camera; Modul LM10)	NanoSight Ltd., Malvern Instruments Limited, Malvern, UK
pH-Meter (HI 221)	Hanna Instruments Deutschland GmbH, Vöhringen, DE
Pipetten (2,5; 10; 100; 200 und 1000 µL Transferpette® S)	BRAND GMBH + CO KG, Wertheim, DE
Pipettierhilfe (Accujet pro)	BRAND GMBH + CO KG, Wertheim, DE
Reinstwasseranlage (Arium 611)	Sartorius AG, Göttingen, DE
Rotationsverdampfer:	
- IKA® HB 10 control	IKA®-Werke GmbH & CO. KG, Staufen, DE und
- IKA® RV 10 control	VWR International GmbH, Darmstadt, DE
- RC-10 Digital Ciller von VWR	
- vacuumbrand for VWR	
Sicherheitswerkbank (Tecnoflow)	INTEGRA Biosciences GmbH, Biebertal, DE
Spektralphotometer (96-Well-Platten: Epoch Microplate Spectrophotometer)	BioTek Instruments, Inc., Winooski, USA
Multipette® E3	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Spektralphotometer (Kleinstvolumina: ND-1000)	PEQLAB Biotechnologie GmbH, VWR International GmbH, Darmstadt, DE
Thermomixer comfort	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Transmissionselektronenmikroskop (Tecnai G2 F20 TMP)	FEI Company, Thermo Fisher Scientific Inc., Hillsboro, USA
Ultraschallbad (Sonorex Super R4 510 H)	BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Berlin, DE
Ultraschallsonde (Labsonic® M)	Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen, DE

UV-Tisch (UV-Systeme)	Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen, DE
Vakuumzentrifuge (Concentrator 5301)	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Vortex-Schüttler	VWR International GmbH, Darmstadt, DE
Wärmeschränke: - IPP 30 - ED53	Memmert GmbH + Co KG, Schwabach, DE und Binder, Tuttlingen, DE
Wasserbad (WNB)	Memmert GmbH + Co. KG, Schwabach, DE
Zentrifugen: - Micro Star 17R - Heraeus™ Megafuge™ 8 - Mini-Zentrifuge ROTILABO®	VWR International GmbH, Darmstadt, DE Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE

A. 3 Chemikalien

Accutase® Lösung	Sigma-Aldrich; Merck KGaA, Darmstadt, DE
Acetonitril	VWR International GmbH, Darmstadt, DE
Agarose Standard	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
Amphotericin B (250 µg · ml ⁻¹)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Borsäure	Sigma-Aldrich; Merck KGaA, Darmstadt, DE
ε-Caprolacton	Sigma-Aldrich; Merck KGaA, Darmstadt, DE
<i>CellTiter-Blue</i> ® Cell Viability Assay	Promega Corporation, Madison, USA
Chloroform-d1	Deutero GmbH, Kastellaun, DE
Dichlormethan	Sigma-Aldrich; Merck KGaA, Darmstadt, DE
Dimethylformamid	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich; Merck KGaA, Darmstadt, DE
Dinatriumhydrogenphosphat	Sigma-Aldrich; Merck KGaA, Darmstadt, DE
1,6-Diphenyl-1,3,5-Hexatrien (DPH)	Sigma-Aldrich; Merck KGaA, Darmstadt, DE
<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium – high glucose</i> (DMEM)	Sigma-Aldrich; Merck KGaA, Darmstadt, DE
1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimid (EDC)	Alfa Aesar, Thermo Fisher (Kandel) GmbH, Kandel, DE
Eisessig	AppliChem GmbH, Darmstadt, DE
Ethanol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) (10 % ige Lösung)	Honeywell Fluka™, Fisher Scientific GmbH, Schwerte, DE
Fötale Kälberserum (FKS)	Biochrom GmbH, Berlin, DE
<i>5x Green GoTaq</i> ® <i>Reaction Buffer</i> (Ladepuffer)	Promega GmbH, Walldorf, DE

Kaliumchlorid	Sigma-Aldrich; Merck KGaA, Darmstadt, DE
Kaliumdihydrogenphosphat	Sigma-Aldrich; Merck KGaA, Darmstadt, DE
Methanol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
Methansulfonsäure	Sigma-Aldrich; Merck KGaA, Darmstadt, DE
Natriumchlorid	Honeywell Fluka™, Fisher Scientific GmbH, Schwerte, DE
Natriumhydroxid	AppliChem GmbH, Darmstadt, DE
Nuklease freies Wasser	Promega, Madison, USA
Paclitaxel	Cayman Chemical, Ann Arbor, USA
PBS Tabletten (Gibco®)	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, DE
Penicillin/Streptomycin	Biochrom GmbH, Berlin, DE
Roti® Gelstain	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
Salzsäure	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
Toluol	Honeywell Riedel-de-Haën™, Fisher Scientific GmbH, Schwerte, DE
Triethylamin	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
Tris: Trizma®-Base	Sigma-Aldrich; Merck KGaA, Darmstadt, DE
Trypanblau-Lösung (0,4 %)	VWR International GmbH, Darmstadt, DE
Tween® 80	Sigma-Aldrich; Merck KGaA, Darmstadt, DE

A. 4 Aptamere und DNA-Oligonukleotide

Aptamer/Oligonukleotid	Bezugsquelle
S15-Amino	Biospring GmbH, Frankfurt, DE
Rnd-Amino	Integrated DNA Technologies, Inc., Coralville, USA

S15-Aptamer:

Das verwendete Aptamer S15 [75] besteht aus 85 Nukleotiden mit einer Amino-Modifizierung am 5'-Terminus. Die Molekülmasse beträgt 26,579 kDa. Der Extinktionskoeffizient beträgt $825 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Das aminomodifizierte S15-Aptamer hat einen GC-Gehalt von 54 %, die Schmelztemperatur beträgt 79 °C. Die Sequenz lautet:

5'-/5AmMC6/ACG CTC GGA TGC CAC TAC AGG CTA TCT TAT GGA AAT TTC
GTG TAG GGT TTG GTG TGG CGG GGC TAC TCA TGG ACG TGC TGG TGA
C -3'

Rnd-Kontroll-Oligonukleotid:

Das Kontroll-Oligonukleotid Rnd dient als Negativkontrolle für das S15-Aptamer. Es hat mit 85 Nukleotiden die gleiche Länge wie das S15-Aptamer. Zudem ist der GC-Gehalt mit 54,1 % und die Schmelztemperatur mit 72,8 °C der vom S15-Aptamer sehr ähnlich. Der Extinktionskoeffizient beträgt $709,5 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Die Sequenz der aminomodifizierten Negativkontrolle lautet:

5'-/5AmMC6/GCA TTT AGT GAC TCG CGG ATG TCA AGA TTA GAC AAC
GCC AGC AGC ATC ATC CGA GCC TCT CTA ACT CGT ACG CAG GTC CGA
GGC T -3'

A. 5 Puffer, Lösungen und Medien

<p>DMEM-Basalmedium (<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium - high glucose</i>, Pulver von Sigma-Aldrich; Merck KGaA, Darmstadt, DE)</p>	<p>13,4 g/L DMEM-Pulver mit 3,7 g/L Natriumhydrogencarbonat Entspricht: L-Arginin • HCl 0,084 g/L L-Cystin • 2 HCl 0,0626 g/L L-Glutamin 0,584 g/L Glycin 0,03 g/L L-Histidin • HCl • H₂O 0,042 g/L L-Isoleucin 0,105 g/L L-Leucin 0,105 g/L L-Lysin • HCl 0,146 g/L L-Methionin 0,03 g/L L-Phenylalanin 0,066 g/L L-Serin 0,042 g/L L-Threonin 0,095 g/L L-Tryptophan 0,016 g/L L-Tyrosin • 2 Na • 2 H₂O 0,10379 g/L L-Valin 0,094 g/L Cholinchlorid 0,004 g/L Folsäure 0,004 g/L myo-Inositol 0,0072 g/L Niacinamid 0,004 g/L D-Pantothensäure hemicalcium 0,004 g/L Pyridoxal • HCl 0,004 g/L Riboflavin 0,0004 g/L Thiamin • HCl 0,004 g/L Calciumchlorid (wasserfrei) 0,2 g/L Eisennitrat • 9 H₂O 0,0001 g/L Magnesiumsulfat (wasserfrei) 0,09767 g/L Kaliumchlorid 0,4 g/L Natriumchlorid 6,4 g/L Natriumphosphat Monobasic (wasserfrei) 0,109 g/L Glukose 4,5 g/L Phenol Rot • Na 0,0159 g/L Natriumhydrogencarbonat 3,7 g/L</p>
<p>DMEM-Medium</p>	<p>88 % DMEM-Basalmedium, 10 % FKS, 1 % Penicillin/Streptomycin (entspricht 100 U · ml⁻¹ Penicillin und 0,1 mg · ml⁻¹ Streptomycin), 1 % Amphotericin B (entspricht 2,5 µg · ml⁻¹)</p>
<p>DMEM-Kryomedium</p>	<p>70 % DMEM-Basalmedium, 20 % FKS, 10 % DMSO</p>

0,1x PBS-Puffer <i>Thin-film hydration</i> Methode	17,69 mM Natriumchlorid 0,27 mM Kaliumchlorid 1,01 mM Dinatriumhydrogenphosphat 0,18 mM Kaliumdihydrogenphosphat pH 7,4
1x PBS + 0,1 % Tween 80	176,9 mM Natriumchlorid 2,7 mM Kaliumchlorid 10,1 mM Dinatriumhydrogenphosphat 1,8 mM Kaliumdihydrogenphosphat 0,1 % Tween 80 pH 7,4; 6,8 oder 5
PBS-Puffer Zellkultur (Gibco®, Fisher Scientific GmbH, Schwerte, DE)	2 Tabletten auf 1 Liter entspricht: Natriumphosphat 0,95 g/L Kaliumchlorid 0,201 g/L Natriumchlorid 8,12 g/L, pH 7,4
SBB-Puffer Konjugation	10 mM Natriumborat, pH 7,4
SBB-Puffer Reaktionsstopp	50 mM Natriumborat, pH 8,3
TAE-Puffer	40 mM Tris Base 20 mM Eisessig 1 mM EDTA pH 8, sterilfiltriert

A. 6 Zelllinien

Zelllinie	Bezugsquelle
A549	Leibniz-Institut DSMZ – Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, DE

A. 7 Methoden

A.7.1 Herstellung von PCL

Die Herstellung von Polycaprolacton mit einer terminalen Carboxylgruppe erfolgt durch die Ringöffnungsreaktion von ϵ -Caprolacton nach Talom *et al.* [56]. Dafür werden zunächst 5 ml ϵ -Caprolacton (45 mmol) in Toluol gelöst, welches einen kleinen Teil Wasser und Methansulfonsäure enthält. Die Ringöffnung erfolgt anschließend rührend bei 50 °C und wird durch die Zugabe von Triethylamin gestoppt. In Ansatz 1 wird das ϵ -Caprolacton in 10 ml Toluol mit 9 μ l deionisiertem Wasser und 0,59 mmol Methansulfonsäure gelöst und für 90 Minuten bei 50 °C gerührt. Die Reaktion wird mit 9 μ l Triethylamin gestoppt. In Ansatz 2 wird das ϵ -Caprolacton in 20 ml Toluol mit 18 μ l deionisiertem Wasser und 1,15 mmol Methansulfonsäure gelöst und für 60 Minuten bei 50 °C gerührt. Gestoppt wird die Reaktion durch die Zugabe von 50 μ l Triethylamin. Ansatz 3 wird auf die gleiche Weise wie Ansatz 2 hergestellt, jedoch wird eine Reaktionszeit von 90 Minuten genutzt.

Die Aufreinigung aller Polymere erfolgt, indem zunächst die Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt werden, anschließend wird der Feststoff in 30 ml Dichlormethan gelöst und in 100 ml eiskaltes Methanol getropft, wodurch das Polycaprolacton präzipitiert. Der Feststoff wird pelletiert (7000 xg, 10 min) und der Überstand verworfen. Der Feststoff wird mit 100 ml eiskaltem Methanol gewaschen und anschließend bei 4 °C getrocknet. Die Lagerung erfolgt ebenfalls bei 4 °C.

A.7.2 Bestimmung der Polymermolekülmasse von PCL

Die Bestimmung der Polymermolekülmasse von Polycaprolacton erfolgt nach Claesson *et al.* [57] mittels $^1\text{H-NMR}$. Dazu wird zunächst Polycaprolacton in deuteriertem Chloroform gelöst und mit dem BRUKER-Avance-400 bei 400 MHz analysiert. Das Spektrum wird auf das Lösemittelsignal (Reste von undeuteriertem Chloroform) kalibriert. Die Ermittlung des Polymerisationsgrades erfolgt über einen Vergleich der Integrale der Protonen der Methylengruppe neben der Hydroxylgruppe (pro Molekül nur einmal vorhanden) mit dem Integral der Protonen der Methylengruppe neben dem Carbonyl-

Kohlenstoff (in jedem Monomer enthalten). Durch das Verhältnis kann die Anzahl der im Polymer enthaltenen Monomere bestimmt werden, woraus die Polymermolekülmasse berechnet werden kann.

A.7.3 Herstellung von NP mit der *Thin-film hydration* Methode

Für die Herstellung von Nanopartikeln mit der *Thin-film hydration* Methode wird das Polycaprolacton mit einer Polymermolekülmasse von 4,8 kDa bei 40 °C mit einer Konzentration von 5,29 mM in einem Lösemittel gelöst (entweder Acetonitril oder Dimethylformamid). 250 µl dieses Lösemittel-Polymer-Gemisches werden in ein gewünschtes Gefäß gegeben (hier entweder 1,5 ml Reagiergefäß aus Polypropylen oder 10 ml Glaskolben). Anschließend wird das Lösemittel verdampft und damit der Polymerfilm auf der Oberfläche des genutzten Gefäßes gebildet. Um das Lösemittel aus 1,5 ml Reagiergefäßen zu entfernen, wird der Concentrator 5301 der Eppendorf AG bei 45 °C genutzt. Die Verdampfung des Lösemittels aus Glaskolben erfolgt am Rotationsverdampfer bei 52 °C und 20 mbar. Das Rehydrieren des Polymerfilms erfolgt in den 1,5 ml Reagiergefäßen schüttelnd mit 1 ml 0,1x PBS pH 7,4 bei 60 °C für 3 Tage. Im Glaskolben werden 5 ml des PBS Puffers bzw. 5 ml deionisiertes Wasser genutzt und die Inkubation erfolgt rührend mit 700 rpm für 3 bzw. 24 Stunden. Alle Ansätze werden für 60 Minuten im Ultraschallbad homogenisiert. Ansätze die PBS enthalten werden anschließend für 24 Stunden gegen deionisiertes Wasser dialysiert (MWCO: 3,5 kDa). Anschließend können die Nanopartikel mittels DLS analysiert werden.

A.7.4 Herstellung von NP mittels Mikrofluidik

Für die Herstellung von Nanopartikeln mittels Mikrofluidik wird der NanoAssemblr® Benchtop von Precision Nanosystems Inc. genutzt. Dieser verfügt über eine Kartusche, in der sich ein mikrofluidisches Mischsystem befindet. Über zwei Anschlüsse der Kartusche können in einer Spritze das PCL_{4,8}-Acetonitril-Gemisch (80,05 µM, auf 30 °C vorgeheizt) und in einer anderen Spritze deionisiertes Wasser (auf 30 °C vorgeheizt) angeschlossen werden. In einem Programm wird die totale Flussrate (*total flow rate*

TFR) auf $12 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ und das Flussverhältnis zwischen den beiden Lösungen (*flow rate ratio* FRR) auf 3:1 (deio. Wasser : PCL_{4,8}-ACN-Gemisch) eingestellt. Da sich bei der Durchmischung der Flüssigkeiten zunächst ein Gleichgewicht einstellen muss, werden die ersten 250 μl und die letzten 50 μl des Gemisches verworfen. Das restliche Flüssigkeitsgemisch wird in einem Zentrifugiergefäß aufgefangen. Im Anschluss an die Durchmischung wird das organische Lösungsmittel aus dem Gemisch mit Hilfe eines Rotationsverdampfers entfernt. Anschließend liegen die Nanopartikel in wässriger Lösung vor und können mittels dynamischer Lichtstreuung untersucht werden.

A.7.5 Herstellung von NP im Batch-Verfahren mittels Nanopräzipitation

Die Herstellung von Nanopartikeln im Batch-Verfahren erfolgt mit verschiedenen Variationen. Zum einen werden 400 μl einer 13,11 mM bzw. 7,87 mM PCL_{4,8}-Acetonitril-Lösung langsam in 5 ml deionisiertes Wasser (bei 70 °C) getropft und für 3 Stunden gerührt. Eine Homogenisation erfolgt mit einer Ultraschallsonde für 60 Sekunden. Das Acetonitril wird am Rotationsverdampfer bei 54 °C, 150 mbar entfernt.

In einer Abwandlung der oberen Herstellung von Nanopartikeln im Batch-Verfahren werden 400 μl einer 80,05 μM PCL_{4,8}-Acetonitril-Lösung langsam in 800 μl deionisiertes Wasser, bzw. in verdünnte Chlorwasserstoff-Lösung (pH 2) oder in verdünnte Natriumhydroxid-Lösung (pH 10) getropft, welche mit 1000 rpm bei Raumtemperatur rühren. Das Acetonitril wird über Nacht rührend im offenen Gefäß verdampft.

In einer anderen Variation dieser Methode werden 400 μl einer 80,05 μM PCL_{4,8}-Acetonitril-Lösung schnell zu 800 μl deionisiertem Wasser (27 °C) gegeben und bei 1000 rpm inkubiert. Nach 10, 30 bzw. 60 Minuten wird dieses Gemisch zu 4,8 ml deionisiertem Wasser gegeben und durchmischt. Das Lösemittel wird am Rotationsverdampfer entfernt (45 °C, 100 mbar) anschließend wird das Volumen auf 5 ml mit deionisiertem Wasser aufgefüllt. Aggregate werden mittels Zentrifugation bei 3000 xg für 10 Minuten entfernt. Von den 5 ml Nanopartikel-Suspension werden nur die oberen 4 ml genutzt.

Bei der Herstellung von Nanopartikeln mit dem optimierten Protokoll der Nanopräzipitation im Batch-Verfahren werden zunächst 400 μl einer 0,38 $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ PCL-Acetonitril-Lösung (50 °C) schnell zu 800 μl Ethanol (27 °C) gegeben und bei 1000 rpm schüttelnd inkubiert. Nach 30 Minuten wird dieses Gemisch zu 4,8 ml deionisiertem Wasser gegeben und durchmischt. Die Lösemittel werden am Rotationsverdampfer entfernt (45 °C, 100 mbar) anschließend wird das Volumen auf 5 ml mit deionisiertem Wasser aufgefüllt. Aggregate werden mittels Zentrifugation bei 3000 $\times g$ für 10 Minuten entfernt. Von den 5 ml Nanopartikel-Suspension werden nur die oberen 4 ml genutzt. Sollen die Nanopartikel für die Kopplung mit Aptameren oder die Inkubation mit Zellen eingesetzt werden, werden die Ansätze bei 45 °C und 20 mbar auf ein kleineres Volumen eingeeengt, mehrere Ansätze werden zusammengegeben und erneut eingeeengt, in diesen Fällen entfällt der Zentrifugationsschritt. Soll in die Nanopartikel PTX eingekapselt werden, wird das PTX vor der Partikelsynthese in der gewünschten Konzentration zur PCL-Acetonitril-Lösung gegeben.

A.7.6 Analytik von Nanopartikeln mittels DLS

Die Ermittlung des hydrodynamischen Durchmessers und des Polydispersitätsindex der Nanopartikel erfolgt mittels dynamischer Lichtstreuung (DLS). Dafür wird entweder der Zetasizer Nano ZS der Malvern Panalytical Ltd oder der Particle Analyzer Litesizer™ 500 der Firma Anton Paar GmbH genutzt. Vergleichsmessungen der gleichen Probe zeigen, dass die resultierenden Ergebnisse mit beiden Geräten vergleichbar sind. Für die Bestimmung des hydrodynamischen Durchmessers wird die Nanopartikel-Suspension zunächst für 5 Minuten im Ultraschallbad homogenisiert. Anschließend wird sie blasenfrei in eine Omegaküvette (Küvette geeignet zur Bestimmung des hydrodynamischen Durchmessers und des Zetapotentials) gegeben und in die Messkammer gestellt. Dort wird die Probe mit einem Laser bestrahlt. Die Nanopartikel streuen dieses Licht. Abhängig von ihrer Brownschen Molekularbewegung ändert sich das Streumuster und über die zeitliche Änderung der Lichtstreuung kann die Geschwindigkeit der Brownschen Molekularbewegung bestimmt werden. Darüber wird mit der Stokes-Einstein-Beziehung der hydrodynamische Durchmesser bestimmt [89].

Für die Messungen wird ein Messwinkel von 175 °, eine Zieltemperatur von 20,0 °C bzw. 25 °C und eine Equilibrierungszeit von 30 bzw. 60 Sekunden genutzt. Als Analysemmodell wird die Einstellung "Allgemein" genutzt, die ISO 22412 wird als Kumulan-tenmodell genutzt. Filter, Fokusposition und Justagemodus werden automatisch be- stimmt. Die Anzahl der Messungen des hydrodynamischen Durchmessers werden au- tomatisch bestimmt. Die Materialeigenschaften des PCLs sind ein Brechungsindex von 1,46 und eine Absorption von 0,0. Das Lösemittel der Nanopartikel ist Wasser mit ei- nem Brechungsindex von 1,3307, einer Viskosität von 1,0019 mPa · s (Voreinstellung des Litesizer™ 500 bei 20 °C) bzw. 0,8872 mPa · s (Voreinstellung des Zetasizer Nano ZS bei 25 °C) und einer relativen Permittivität/dielektrischen Konstante von 80,18 (Voreinstellung des Litesizer™ 500 bei 20 °C) bzw. 78,5 (Voreinstellung des Zetasizer Nano ZS bei 25 °C).

A.7.7 Analytik von Nanopartikeln mittels TEM

Um Nanopartikel mittels Transmissionselektronenspektroskopie visualisieren zu kön- nen, wird ein Tropfen der Nanopartikel in Wasser auf ein mit Kohlenstoff beschichtetes Kupfergitter gegeben und getrocknet. Die Messung erfolgt im Hellfeld-Modus mit dem FEI Tecnai G2 F20 TMP-TEM bei 120 kV FEG.

A.7.8 Bestimmung der Einkapselung hydrophober Moleküle in PCL-NP

Die Bestimmung der Fähigkeit von Nanopartikeln hydrophobe Moleküle einzukapseln zu können erfolgt abgewandelt nach Zhang *et al.* [64]. Diese Methode nutzt die Solubili- sierung des Farbstoffs 1,6-Diphenyl-1,3,5-Hexatriene (DPH) in hydrophober Umge- bung, wodurch die Absorption des Farbstoffs steigt. Zunächst werden dafür Nanoparti- kel mit der Methode hergestellt, die auch ansonsten für deren Herstellung genutzt wird. Jedoch muss eine höhere Konzentration des Polymers gewählt werden, um die Nano- partikel auf verschiedene Konzentrationen verdünnen zu können. Dafür werden für je- des Polymer 400 µl einer PCL-Lösung in Acetonitril hergestellt und auf 50 °C erhitzt (PCL_{2,1}: 1,70 mM, PCL_{2,3}: 11,72 mM, PCL_{4,8}: 2,28 mM). Diese Lösung wird mit 800 µl

Ethanol für 30 Minuten bei 1000 rpm schüttelnd inkubiert und anschließend in 4,8 ml deionisiertes Wasser gegeben und durchmischt. Die Lösemittel werden am Rotationsverdampfer bei 45 °C und 100 mbar entfernt, anschließend wird das Volumen des Ansatzes auf 4,8 ml mit deionisiertem Wasser aufgefüllt. Es werden für jedes Polymer Verdünnungen hergestellt. Die Verdünnungen des PCL_{2,1} liegen in einem Bereich von 0,003-141,67 µM, die Verdünnungen des PCL_{2,3} liegen zwischen 0,018 und 976,69 µM, die Konzentrationen des PCL_{4,8} liegen zwischen 0,003 und 190,04 µM. Der Farbstoff DPH wird zunächst in einer Konzentration von 5 mM in Methanol gelöst und anschließend auf 400 µM mit Methanol verdünnt. Dann werden jeweils 297 µl der verdünnten Nanopartikel mit 3 µl des DPH in einer Flachboden-96-Well-Platte gemischt und für 18 Stunden bei 25 °C unter Lichtausschluss inkubiert. Die Absorption der Proben wird mit dem Epoch Microplate Spectrophotometer vermessen. Da bei 356 nm die Absorptionsefähigkeit von DPH in hydrophober Umgebung deutlich höher ist als in Wasser, kann bestimmt werden ob das DPH in die Nanopartikel eingekapselt wurde, indem die Absorption bei 356 nm gegen die Polymerkonzentration aufgetragen wird [64, 70, 71]. Sobald die Absorption bei 356 nm ansteigt, wird das DPH in Nanopartikel eingekapselt. Der Schnittpunkt einer logarithmischen Regression im Bereich der Basislinie mit einer logarithmischen Regressionen des Signalanstiegs bei höheren Polymerkonzentrationen ergibt die Konzentration des Polymers, ab dem das DPH in die synthetisierten Nanopartikel eingekapselt wird.

A.7.9 Analytik von Nanopartikeln mittels NTA

Der hydrodynamische Durchmesser und die Konzentration von Nanopartikeln können mittels *Nanoparticle tracking analysis* (NTA) ermittelt werden. In dieser Arbeit wurde die NTA jedoch nur zur Bestimmung der Konzentration von Nanopartikeln eingesetzt. Dabei wird die zu untersuchende Probe zunächst für 5 Minuten im Ultraschallbad homogenisiert und anschließend in die Probenkammer injiziert, wo die Partikel mit einem Laser bestrahlt werden. Über eine an ein Mikroskop angeschlossene Kamera wird das Streulicht der Nanopartikel in einem Bereich der Probenkammer über einen Zeitraum von 90 Sekunden aufgezeichnet. Bei der anschließenden Auswertung werden die Bewe-

gungen der Streulichtzentren über die Zeit ausgewertet. Die Ermittlung der Geschwindigkeit erfolgt dabei für jeden erfassten Partikel einzeln [90].

A.7.10 HPLC zur Bestimmung der PTX-Konzentration

Alle Proben, deren PTX-Konzentrationen mittels HPLC bestimmt werden sollen, werden zunächst im Concentrator 5301 der Eppendorf AG getrocknet. Anschließend werden die Proben in 100 μl Acetonitril resuspendiert. Enthalten die Proben Nanopartikel, werden die Partikel für 15 Minuten bei 50 °C und 1000 rpm schüttelnd inkubiert und zerstört und das Polymer anschließend für 10 Minuten bei 5000 xg pelletiert. Der Überstand mit dem PTX in Lösung wird dann in eine Braunglasflasche mit einem 100 μl Einsatz überführt.

Als Säule wird eine C18-Säule von Kintex (2,6 μm ; 100 A; 100x4,6 mm) bei einer Temperatur von 25 °C genutzt. Die mobile Phase besteht aus einem Wasser/Acetonitril-Gemisch (50/50, v/v) und wird mit einer Flussrate von 1 $\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$ für 5 Minuten pro Messung genutzt. Es werden 10 μl Probe injiziert. Die Detektion des PTX erfolgt über die Messung der Absorption mit dem Diodenarraydetektor bei 228 nm. Die Bestimmung der PTX-Konzentration erfolgt über die Peakfläche unter Verwendung einer zuvor vermessenen Kalibrationsgeraden.

A.7.11 Erhöhung der Partikelkonzentration

Versuche zum Einengen von Nanopartikel-Suspensionen erfolgen zum einen mit dem Concentrator 5301 der Eppendorf AG. In diesem wird der Nanopartikel-Suspension in einem Regiergefäß unter vermindertem Druck enthaltenes Wasser entzogen, wodurch die Nanopartikel-Suspension eingeengt wird (insgesamt wurden 24,1 ml Nanopartikel-Suspension bei Raumtemperatur auf 133,6 μl eingeengt). Ein anderer Versuch erfolgt, indem Nanopartikel-Suspension (insgesamt 3 ml) auf einen Vivaspin® 500 Zentrifugalfilter gegeben wird. Der Filter hat ein MWCO von 100 kDa, was in etwa einem Porendurchmesser von 7-8 nm entspricht [72]. Dieser Porendurchmesser verhindert somit,

dass Nanopartikel durch den Filter gelangen, Wasser hingegen kann ungehindert passieren. Durch Anlegen einer Zentrifugalkraft (3000 xg für maximal 2 Minuten) wird die Nanopartikel-Suspension eingeengt, dabei sollen die Partikel nicht trocken werden. Für das Konzentrieren von Nanopartikeln mittels Zentrifugation werden 3 ml einer Nanopartikel-Suspension für 120 Minuten bei 10.000 xg zentrifugiert. Anschließend werden 2,6 ml Überstand abgenommen und die verbliebene Nanopartikel-Suspension mittels DLS analysiert. Das Einengen der Nanopartikel-Suspension im Rotationsverdampfer erfolgt im Glaskolben bei Raumtemperatur und 25 mbar für 30 Minuten. Werden die Nanopartikel-Suspensionen direkt während der Synthese eingeengt, erfolgt die Entfernung des Lösemittels bei 45 °C und 20 mbar, wodurch auch ein Teil des Wassers aus dem Ansatz entfernt wird.

A.7.12 Kopplung von Aptameren oder Oligonukleotiden an Nanopartikel

Für die Kopplung von Aptameren und Oligonukleotiden an Nanopartikel werden zunächst 6,16 fmol Nanopartikel (entsprechendes Volumen der jeweiligen Nanopartikel-Suspension muss entsprechend der Partikelkonzentration berechnet werden; Partikelkonzentration wird mittels NTA bestimmt) mit 492,8 pmol Aptamer/Oligonukleotid (entsprechendes Volumen muss anhand der Aptamer/Oligonukleotid-Konzentration berechnet werden) in ein Reagiergefäß gegeben und mit Natriumboratpuffer (SBB-Puffer) (10 mM, pH 7,4) auf 700 µL aufgefüllt. Der Ansatz wird bei Raumtemperatur für 5 Minuten schüttelnd inkubiert. Anschließend werden 2,5 µmol EDC in Form einer EDC-Lösung (10 mg · ml⁻¹ in SBB-Puffer (10 mM, pH 7,4)) zugegeben und über Nacht bei 20 °C schüttelnd (1000 rpm) inkubiert. Die Kopplung wird gestoppt, indem 747 µl SBB-Puffer (50 mM, pH 8,3) zum Kopplungsansatz gegeben werden. Anschließend wird der Ansatz bei 20 °C, 1000 rpm für 60 Minuten inkubiert.

Die Aufreinigung eines Kopplungsansatzes erfolgt durch Dialyse gegen deionisiertes Wasser bei 4 °C für 48 Stunden, wobei das Wasser mehrfach erneuert wird. Für die Dialyse werden Dialyse-Einheiten mit einem MWCO von 100 kDa genutzt (Float-A-Lyzer® G2 von Spectrum Laboratories Inc.), sodass Nanopartikel und Nanopartikel-

Aptamer/Oligonukleotid-Konjugate die Membran nicht passieren können. Ungebundene Aptamere/Oligonukleotide, Pufferbestandteile sowie freies EDC und dessen Reaktionsprodukte werden dabei aus dem Ansatz entfernt. Nanopartikel, die für Zellkulturexperimente genutzt werden, werden jedoch ohne Aufreinigung direkt zu den Zellen gegeben.

Um den Kopplungserfolg zu überprüfen muss vor der Aufreinigung mittels Dialyse eine Probe des Kopplungsansatzes genommen werden (in dieser Probe sollten etwa 250 pmol Aptamer/Oligonukleotid enthalten sein). Diese wird bei Raumtemperatur am Concentrator 5301 der Eppendorf AG getrocknet, in 10 µl deionisiertem Wasser resuspendiert und anschließend mittels Agarosegelelektrophorese untersucht.

A.7.13 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese wird genutzt, um die Menge an gekoppeltem Aptamer/Oligonukleotid an den Nanopartikeln zu bestimmen. Da die Nanopartikel aufgrund ihrer Größe nicht oder nur wenig im Agarosegel wandern, kann mit dieser Methode das freie Aptamer/Oligonukleotid von den Aptamer/Oligonukleotid-Nanopartikel-Konjugaten abgetrennt werden. Durch einen Vergleich des freien Aptamers/Oligonukleotids eines Kopplungsansatzes mit einem Kopplungsansatz, in dem die Nanopartikel-Suspension durch deionisiertes Wasser ersetzt wird, kann so die Menge an gekoppeltem Aptamer berechnet werden.

Zur Herstellung eines Agarosegels (1 %) wird 1 g Agarose in 100 ml TAE-Puffer in der Mikrowelle geschmolzen. Dann werden unter Rühren 7 µl Roti[®] Gelstain zugegeben und die Agaroselösung wird in die Gelkammer gegossen, ein Kamm wird eingesteckt und eventuell vorhandene Luftblasen werden entfernt. Proben werden für die Agarosegelelektrophorese vorbereitet, indem sie mit 5x Green GoTaq Reaction Buffer (Promega) versetzt werden (je 5 µl Puffer zu 10 µl Probe). Anschließend werden die Proben in die Taschen des Gels gegeben und der Gellauf erfolgt für 20 Minuten bei 100 V. Mit Hilfe von UV-Licht wird die DNA mittels UV-Systeme von Intas Science Imaging Instruments GmbH sichtbar gemacht und mit der enthaltenen Kamera dokumentiert. Die

Belichtungszeit und weitere Parameter können im Programm Intas GDS eingestellt werden. Die Auswertung des Gels erfolgt densitometrisch mit dem Programm ImageJ. Dazu wird die Intensität jeder Bande bestimmt, über den Vergleich der Bandenintensität zur Kontrollprobe, kann die Differenz an freiem Aptamer/Oligonukleotid im Koppelungsansatz berechnet werden.

A.7.14 Zellkulturmethoden

Revitalisierung von kryokonservierten A549 Zellen

Ein Kryoröhrchen mit den kryokonservierten Zellen wird aus dem Behälter mit flüssigem Stickstoff entnommen und im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut. Daraufhin wird der Inhalt des Kryoröhrchens in eine T-Flasche (175 cm²) überführt, in die zuvor 30 ml auf 37 °C vorgewärmtes DMEM-Medium gegeben wurden. Die Zellen werden anschließend für mindestens 24 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert um die Anhaftung der Zellen an die Zellkulturoberfläche zu ermöglichen. Anschließend kann das Medium aus der Flasche abgesaugt und mit 24 ml frischem Medium ersetzt werden.

Kultivierung von A549 Zellen

A549 Zellen werden in DMEM-Medium (DMEM-Basalmedium mit 10 % fetalem Kälberserum (FKS), 1 % Penicillin/Streptomycin (P/S) (final 100 U · ml⁻¹ Penicillin und 0,1 mg · ml⁻¹ Streptomycin) und 1 % Amphotericin B (final 2,5 µg · ml⁻¹)) bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Für den Zellerhalt werden die Zellen in T-Flaschen (75 cm²) kultiviert. Bei einer Konfluenz von etwa 80 % werden die Zellen geteilt. Dazu wird zunächst das alte Medium abgesaugt und anschließend werden 5 ml, auf 37 °C vorgewärmtes, PBS in die Kulturflasche gegeben. Das PBS wird leicht in der Flasche geschwenkt und anschließend ebenfalls abgesaugt, damit Medienreste von den Zellen entfernt werden. Anschließend werden 2,5 ml Accutase Lösung (auf 37 °C vorgewärmt) zu den Zellen gegeben und für 5 Minuten bei 37 °C inkubiert. Dadurch werden die Zellen von der Kulturoberfläche abgelöst. Die Reaktion der Accutase wird abgestoppt, indem

2,5 ml Medium in die Kulturflasche gegeben werden. Anschließend werden die Zellen in ein Zentrifugiergefäß überführt und für 5 Minuten bei 300 xg zentrifugiert. Der Überstand wird abgesaugt und die Zellen in 2,5 ml frischem Medium resuspendiert. Werden die Zellen in einer T-Flasche mit 175 cm² kultiviert (z. B. nach dem Revitalisieren), werden die Zellen mit 10 ml PBS gewaschen und anschließend mit 4 ml Accutase abgelöst. Das Ablösen wird durch die Zugabe von 5 ml Medium gestoppt, die Zellen zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und die Zellen werden in 5 ml Medium resuspendiert.

Zur Bestimmung der Zellzahl werden 20 µl der Zellsuspension zu 20 µl Trypanblaulösung gegeben und die Zellen in einer Neubauer-Zählkammer gezählt. In eine neue T-Flasche (75 cm²) werden zu 10 ml frischem Medium 200.000 Zellen gegeben. Das Medium sollte spätestens nach 4 Tagen gewechselt werden, da das Antibiotikum nach dieser Zeit degradiert.

Herstellung von Kryokulturen von A549 Zellen

Die Zellen werden, wie zuvor beschrieben mit Accutase von den T-Flaschen abgelöst, abzentrifugiert und gezählt. Das Zellpellet wird in einer entsprechenden Menge Kryomedium (DMEM-Basalmedium mit 10 % DMSO und 20 % FKS) resuspendiert, sodass 1.000.000 Zellen · ml⁻¹ enthalten sind. Jeweils 1 ml der Zellsuspension wird in ein Kryoröhrchen gegeben. Daraufhin wird das Kryoröhrchen in einen Gefrierbehälter gegeben, der mit Ethanol gefüllt ist. Dieser wird zunächst bei – 80 °C für mindestens 24 Stunden gelagert, dann werden die Kryoröhrchen bis zum Revitalisieren in flüssigem Stickstoff gelagert.

CTB-Assay

Der *CellTiter Blue* (CTB) Assay nutzt den Farbstoff Resazurin. Dieser wird von Zellen, abhängig von ihrer Viabilität zum fluoreszierenden Resorufin reduziert, Zellen mit einer geringen Viabilität können dabei weniger Resorufin bilden als Zellen mit einer hohen Viabilität [91]. Für die Untersuchung der Zellviabilität wird das Medium (nach der In-

kubation der Zellen mit den Proben) von den Zellen abgesaugt und durch 100 µl CTB-Reagenz in Medium (DMEM-Basalmedium mit 10 % CTB-Reagenz) ersetzt, zusätzlich wird als Blank reines CTB in Medium in vier Wells gegeben. Die Zellen werden für 90 Minuten bei 37 °C mit diesem Reagenz inkubiert, anschließend wird mit dem Fluorocan Ascent (Thermo electron corporation) die Fluoreszenz bei einer Exzitation von 544 nm und einer Emission von 590 nm bestimmt. Die Bestimmung der Viabilität erfolgt dabei relativ zu einer Kontrolle (z. B. Zellen in Medium).

Untersuchung der Zytotoxizität von Nanopartikeln auf A549 Zellen

Für die Bestimmung der Zytotoxizität der Nanopartikel auf A549 Zellen werden zunächst in Vierfachbestimmung 6.000 Zellen in 100 µl Medium in ein Well einer 96-Well-Zellkulturplatte gegeben und für 24 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Anschließend wird das Medium abgesaugt und durch Medium mit verschiedenen Proben ersetzt. PTX-haltige Nanopartikel werden dabei in einer Menge eingesetzt, sodass die finale PTX-Konzentration der Probe im Medium 10 nM beträgt. Auch das freie PTX wird in einer Konzentration von 10 nM eingesetzt. Die Partikelanzahl der Proben für Nanopartikel ohne PTX ist dabei gleich zu den Partikelkonzentration in den korrespondierenden Proben mit PTX-haltigen Nanopartikeln. Als Kontrollen für Aptamer- oder Oligonukleotid-Nanopartikel-Konjugate werden Kopplungsansätze genutzt, die alle zur Kopplung genutzten Hilfsstoffe jedoch keine Nanopartikel enthalten. Als Kontrolle für reine Nanopartikel dient die gleiche Menge deionisiertes Wasser. Für die Probe mit reinem PTX wird die entsprechende Menge Acetonitril als Kontrolle auf die Zellen gegeben. Alle Proben werden mit Medium auf 100 µl verdünnt und in ein Well mit Zellen gegeben. Die Inkubation der Zellen mit den Proben erfolgt für 72 Stunden. Anschließend wird die Viabilität der Zellen mittels CTB-Assay bestimmt.

A.7.15 Bestimmung der Lagerstabilität in Bezug auf den hydrodynamischen Durchmesser der Nanopartikel

Zur Bestimmung der Lagerstabilität von Nanopartikeln werden Nanopartikel aus PCL_{4,8} mit dem optimierten Protokoll der Nanopräzipitation im Batch-Verfahren (siehe Kapitel A.7.5) hergestellt. Dabei werden 400 µl einer jeweils 80,05 µM PCL_{4,8}- 70 µM PTX-Lösung in Acetonitril verwendet. Die Lagerung erfolgt bei 4 °C in deionisiertem Wasser. Nach verschiedenen Lagerungszeiten werden die Nanopartikel durchmischt und eine Probe entnommen. Die Probe wird für 5 Minuten im Ultraschallbad homogenisiert und der hydrodynamische Durchmesser mittels DLS bestimmt. Die Lagerstabilität wird als Dreifachbestimmung untersucht, das heißt, dass drei unabhängige Ansätze von Nanopartikeln hergestellt und untersucht werden.

A.7.16 Bestimmung der Lagerstabilität in Bezug auf die Freisetzung von PTX aus den Nanopartikeln

Zur Bestimmung der Lagerstabilität von Nanopartikeln in Bezug auf die PTX-Freisetzung, werden Nanopartikel aus PCL_{4,8} mit dem optimierten Protokoll der Nanopräzipitation im Batch-Verfahren (siehe Kapitel A.7.5) hergestellt. Dabei werden 400 µl einer jeweils 80,05 µM PCL_{4,8}- 70 µM PTX-Lösung in Acetonitril verwendet. Von diesen Nanopartikeln werden für jeden Messzeitpunkt 2 ml in einen Dialyseschlauch gegeben (MWCO: 3,5 kDa). Dieser Dialyseschlauch wird dann in ein Zentrifugiergefäß mit 10 ml deionisiertem Wasser gegeben. Die Lagerung erfolgt bei 4 °C. Nach verschiedenen Lagerungszeiten werden die Nanopartikel aus dem Dialyseschlauch entnommen. Die Probe wird im Concentrator 5301 der Eppendorf AG getrocknet und die noch enthaltene PTX-Menge mittels HPLC bestimmt (siehe HPLC für PTX, Kapitel A.7.10). Um eine Freisetzung in Prozent vom eingesetzten PTX in den Nanopartikeln angeben zu können, wird ebenfalls der PTX-Gehalt in den eingesetzten Nanopartikeln bestimmt. Die Untersuchung erfolgt als Dreifachbestimmung.

A.7.17 Bestimmung der PTX-Freisetzung aus Nanopartikeln unter simulierten physiologischen Bedingungen

Zur Bestimmung der PTX-Freisetzung von Nanopartikeln unter simulierten physiologischen Bedingungen, werden Nanopartikel aus PCL_{4,8} mit dem optimierten Protokoll der Nanopräzipitation im Batch-Verfahren (siehe Kapitel A.7.5) hergestellt. Dabei werden 400 µl einer jeweils 80,05 µM PCL_{4,8}- 70 µM PTX-Lösung in Acetonitril verwendet. Von diesen Nanopartikeln werden für jeden Messzeitpunkt 2 ml in einen Dialyseschlauch gegeben (MWCO: 3,5 kDa). Dieser Dialyseschlauch wird dann gegen 1 l PBS mit 0,1 % Tween 80 mit den pH-Werten 5,0, 6,8 oder 7,4 dialysiert. Die Lagerung erfolgt bei 37 °C. Alle 24 Stunden wird der Puffer erneuert. Nach verschiedenen Inkubationszeiten werden die Nanopartikel aus dem Dialyseschlauch entnommen. Die Probe wird im Concentrator 5301 der Eppendorf AG getrocknet und die noch enthaltene PTX-Menge mittels HPLC bestimmt (siehe HPLC für PTX, Kapitel A.7.10). Um eine Freisetzung in Prozent vom eingesetzten PTX in den Nanopartikeln angeben zu können, wird ebenfalls der PTX-Gehalt in den eingesetzten Nanopartikeln bestimmt. Die Untersuchung erfolgt als Dreifachbestimmung.

A. 8 Programme

ImageJ	Open Source
Intas GDS (Geldokumentation)	Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen, DE
Kalliope™	Anton Paar GmbH, Graz, Österreich
Malvern Zetasizer Software v7.03	Malvern Panalytical GmbH, Kassel, DE
OpenLab Control Panel (HPLC-Steuerung)	Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, USA

B Zusätzliche Informationen

B.1 ¹H-NMR-Spektren von PCL

Die im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Polymere mit verschiedenen Molekülmassen wurden mittels ¹H-NMR charakterisiert (siehe Kapitel 3.1). Die ¹H-NMR-Spektren des Polycaprolactons, das in den Ansätzen eins und drei hergestellt wurde, sind in den Abbildungen 4.1 und 4.2 dargestellt.

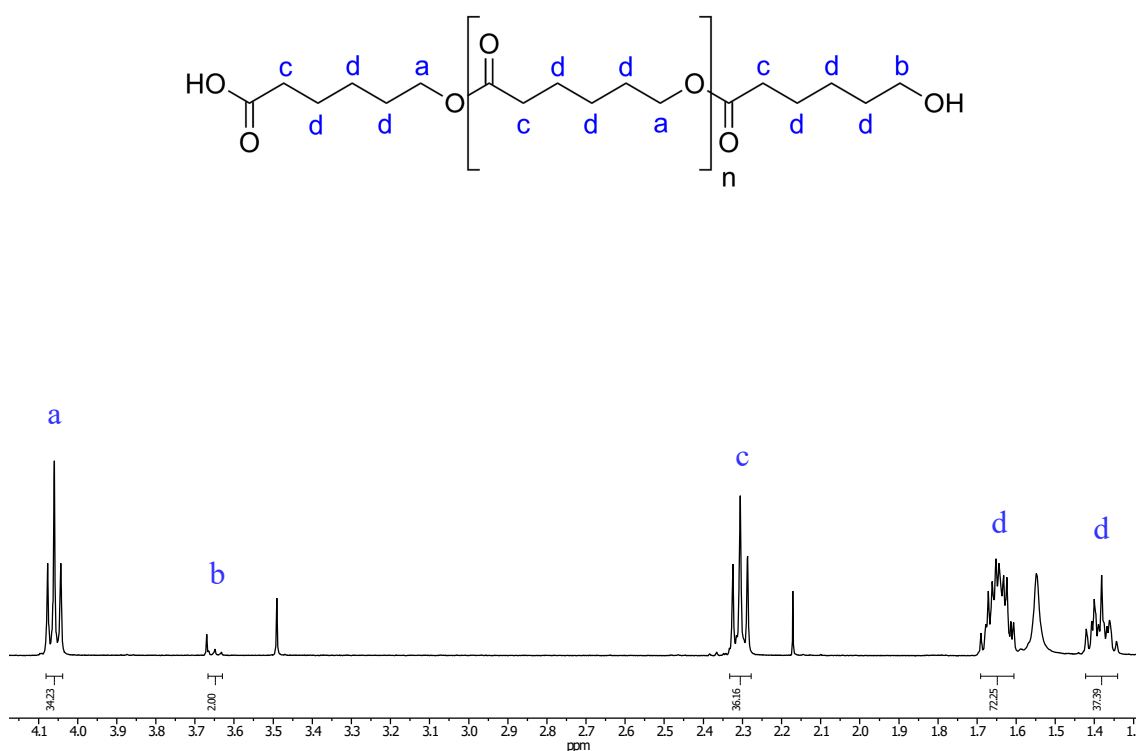


Abb. 4.1: ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, 298 K) und Strukturformel von Polycaprolacton aus Reaktionsansatz 1; die blaue Beschriftung ordnet die Gruppen den entsprechenden Peaks im ¹H-NMR-Spektrum zu.

Das ¹H-NMR-Spektrum des Reaktionsproduktes aus Ansatz 1 zeigt Signale bei den erwarteten Verschiebungen:

δ [ppm] = 4,06 (Triplet (t), $^3J_{a,d} = 6,69$ Hz, 34H, H-a), 3,65 (t, $^3J_{b,d} = 6,50$ Hz, 2H, H-b), 2,31 (t, $^3J_{c,d} = 7,51$ Hz, 36H, H-c), 1,68-1,60 (Multiplet (m), 72H, H-d), 1,42-1,34 (m, 37H, H-d).

Es konnte daher erfolgreich Polycaprolacton hergestellt werden, welches lediglich einen kleinen Rest an Lösemitteln enthält (Methanol (3,49 ppm), Aceton (2,17 ppm) und Wasser (1,56 ppm)).

Ein Vergleich der Integrale der Peakflächen zugehöriger Protonen der Methylengruppe neben der Hydroxylgruppe (in Abb. 4.1 mit b beschriftet) und der Protonen der Methylengruppe neben dem Carbonyl-Kohlenstoff (in Abb. 4.1 mit c beschriftet) ergibt ein Verhältnis von 2:36,16. Das heißt, dass pro PCL-Molekül im Mittel 18,08 Mal die Methylengruppe neben dem Carbonyl-Kohlenstoff vorhanden ist. In der Strukturformel in Abb. 4.1 ist zu erkennen, dass diese Gruppe auch am Anfang und Ende des PCLs vorhanden sind, sodass sich für n ein Wert von 16,08 ergibt. Über die atomaren Massen, der repetitiven und nicht repetitiven Einheiten, kann so die Molekülmasse des Polymers berechnet werden. Eine repetitive Einheit hat dabei eine Molekülmasse von $114,144 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$, die nicht repetitiven Einheiten des Polymers haben insgesamt eine Molekülmasse von $246,303 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$. Die mittlere Molekülmasse des synthetisierten PCLs liegt bei $2081,7 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$.

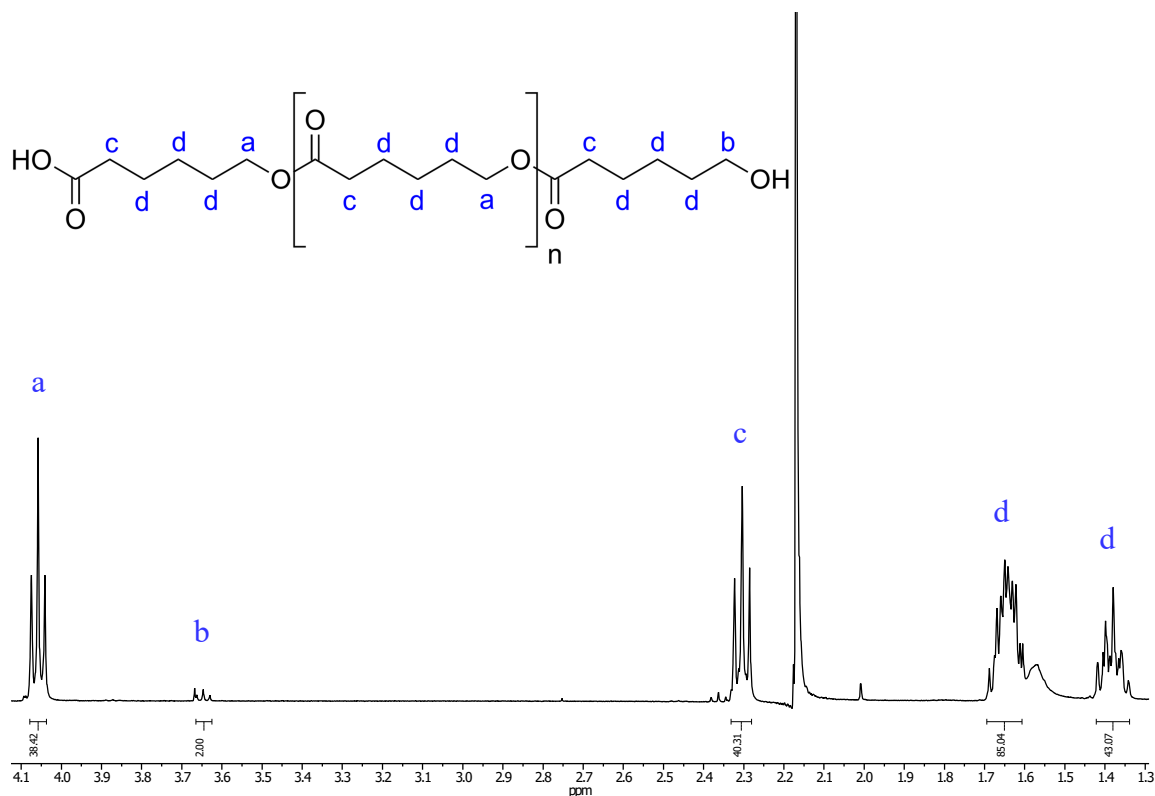


Abb. 4.2: $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , 298 K) und Strukturformel von Polycaprolacton aus Reaktionsansatz 3; die blaue Beschriftung ordnet die Gruppen den entsprechenden Peaks im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum zu.

Das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des Reaktionsproduktes aus Ansatz 3 zeigt wiederum Signale bei den erwarteten Verschiebungen:

δ [ppm] = 4,06 (t, $^3J_{a,d} = 6,70$ Hz, 38H, H-a), 3,65 (t, $^3J_{b,d} = 6,50$ Hz, 2H, H-b), 2,30 (t, $^3J_{c,d} = 7,51$ Hz, 40H, H-c), 1,68-1,60 (m, 85H, H-d), 1,42-1,34 (m, 43H, H-d).

Es konnte daher auch in diesem Reaktionsansatz erfolgreich Polycaprolacton hergestellt werden, welches lediglich einen kleinen Rest an Lösemitteln enthält (Aceton (2,17 ppm) und Wasser (1,56 ppm)).

Die Integrale der Peakflächen zugehöriger Protonen der Methylengruppe neben der Hydroxylgruppe und der Protonen der Methylengruppe neben dem Carbonyl-Kohlenstoff stehen im Verhältnis von 2:40,31. Die mittlere Polymermolekülmasse liegt demnach bei $2318,6 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$.

B. 2 Einkapselung von hydrophoben Molekülen in synthetisierte PCL-Nanopartikel

Die Bestimmung ob die PCL-Nanopartikel hydrophobe Substanzen einkapseln können erfolgt mittels Farbstoff-Solubilisierungsmethode mit 1,6-Diphenyl-1,3,5-Hexatrien (DPH) (siehe Kapitel 3.1.2). Nachfolgend ist die Absorption bei 356 nm für die Polymere PCL_{2,1} und PCL_{2,3} in Abhängigkeit der Polymerkonzentration dargestellt (Abb. 4.3 und 4.4).

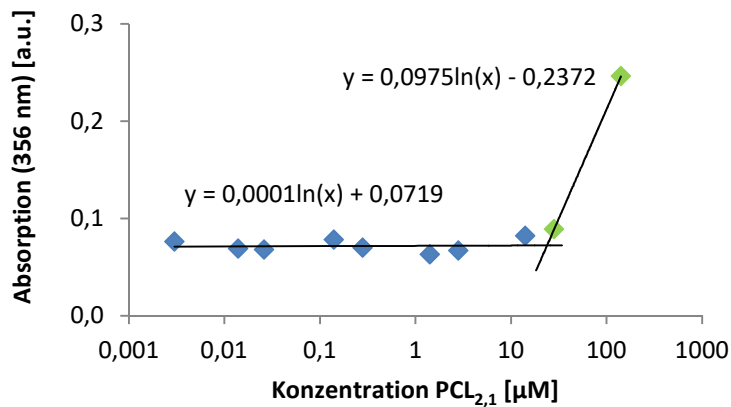


Abb. 4.3: Absorption von DPH in Abhängigkeit der Konzentration von PCL_{2,1}.

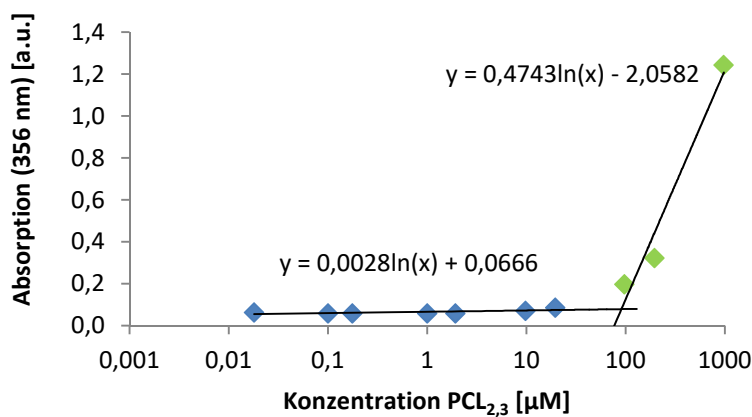


Abb. 4.4: Absorption von DPH in Abhängigkeit der Konzentration von PCL_{2,3}.

Die Absorption bei 356 nm steigt bei einer PCL_{2,1} Konzentration von 23,89 μM an, die Konzentration, ab der die Absorption bei Verwendung des Polymers PCL_{2,3} ansteigt, beträgt 90,6 μM . Damit sind auch diese Polymere in der Lage Nanopartikel zu bilden, in die hydrophobe Moleküle eingekapselt werden können.

Abbildungsverzeichnis

Abb. 2.1: Aufbau eines Nanopartikel-basierten <i>Drug Delivery Systems</i> (DDS), bzw. <i>Targeted DDS</i> (TDDS).....	3
Abb. 2.2: Der <i>Enhanced Permeability and Retention</i> Effekt (EPR-Effekt).....	5
Abb. 2.3: Einfluss der Nanopartikelgröße auf deren Eigenschaften bei der Verwendung als <i>Drug Delivery System</i>	8
Abb. 2.4: Verschiedene Formen von Nanopartikeln.	11
Abb. 2.5: Ringöffnungs-Polymerisation von ϵ -Caprolacton zu Polycaprolacton.	20
Abb. 3.1: $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , 298 K) und Strukturformel von Polycaprolacton aus Reaktionsansatz 2.	25
Abb. 3.2: Größenverteilung der volumengewichteten hydrodynamischen Durchmesser von Nanopartikeln aus $\text{PCL}_{4,8}$, die mit Acetonitril (A) bzw. mit Dimethylformamid (B) als Lösemittel mittels <i>Thin-film hydration</i> Methode hergestellt wurden.	28
Abb. 3.3: Größenverteilung der volumengewichteten hydrodynamischen Durchmesser der $\text{PCL}_{4,8}$ -NP, die im Glaskolben mit der <i>Thin-film hydration</i> Methode mit 0,1x PBS hergestellt wurden (vergleichend: rührende Rehydrierung des Polymerfilms für 3 bzw. 24 Stunden).....	30
Abb. 3.4: Größenverteilung des volumengewichteten hydrodynamischen Durchmessers der $\text{PCL}_{4,8}$ -NP, die im Glaskolben mit der <i>Thin-film hydration</i> Methode mit deionisiertem Wasser hergestellt wurden; Rehydrierung des Polymerfilms für 24 Stunden.	32
Abb. 3.5: Größenverteilung des volumengewichteten hydrodynamischen Durchmessers der $\text{PCL}_{4,8}$ -NP, die mittels NanoAssemblr [®] Benchtop hergestellt wurden. Totale Flussrate: $12 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, Verhältnis Wasser/Polymerlösung: 3:1; Lauf 5 der Kartusche.	35
Abb. 3.6: Transmissionselektronenmikrograph der $\text{PCL}_{4,8}$ -NP, die mit dem NanoAssemblr [®] Benchtop System hergestellt wurden..	36
Abb. 3.7: Vergleich der mittleren volumengewichteten hydrodynamischen Durchmesser und der Polydispersitätsindizes der $\text{PCL}_{4,8}$ -NP, die mit dem NanoAssemblr [®] Benchtop System hergestellt wurden.....	37

Abb. 3.8: Größenverteilung der volumengewichteten hydrodynamischen Durchmesser der PCL _{4,8} -NP, die mittels Nanopräzipitation im Batch-Verfahren hergestellt wurden. 400 µl Polymerlösung (PCL _{4,8} ; 13 mM in Acetonitril) wurden zu 5 ml deionisiertem Wasser getropft; Entfernung des Lösemittels nach 3 Stunden rührender Inkubation und einer Homogenisation mittels Ultraschall (Dreifachmessung eines Ansatzes).....	40
Abb. 3.9: Größenverteilung der volumengewichteten hydrodynamischen Durchmesser der PCL _{4,8} -NP, die mittels Nanopräzipitation im Batch-Verfahren hergestellt wurden. 400 µl Polymerlösung (PCL _{4,8} ; 8 mM in Acetonitril) wurden zu 5 ml deionisiertem Wasser getropft; Entfernung des Lösemittels nach 3 Stunden rührender Inkubation und einer Homogenisation mittels Ultraschall (Dreifachmessung eines Ansatzes).....	41
Abb. 3.10: Größenverteilung der volumengewichteten hydrodynamischen Durchmesser der PCL _{4,8} -NP, die mittels Nanopräzipitation im Batch-Verfahren hergestellt wurden. 400 µl Polymerlösung (PCL _{4,8} ; 80 µM in Acetonitril) wurden langsam zu 800 µl deionisiertem Wasser getropft; Entfernung des Lösemittels durch rührende Inkubation bei 1000 rpm über Nacht.	42
Abb. 3.11: Größenverteilung der volumengewichteten hydrodynamischen Durchmesser von PCL _{4,8} -NP, die mittels Nanopräzipitation im Batch-Verfahren hergestellt wurden. 400 µl Polymerlösung (PCL _{4,8} ; 80 µM in Acetonitril) wurden zu 800 µl verdünnter Natriumhydroxid-Lösung (pH 10) bzw. verdünnter Chlorwasserstoff-Lösung (pH 2) gegeben und das Lösemittel über Nacht bei 1000 rpm rührend verdampft.....	44
Abb. 3.12: Größenverteilung der volumengewichteten hydrodynamischen Durchmesser von PCL _{4,8} -NP, die mittels Nanopräzipitation im Batch-Verfahren hergestellt wurden. 400 µl Polymerlösung (PCL _{4,8} ; 80 µM in Acetonitril) wurden zu 800 µl deionisiertem Wasser gegeben und für 10, 30 bzw. 60 Minuten rührend inkubiert; anschließend wurden die Ansätze mit deionisiertem Wasser verdünnt und das Lösemittel am Rotationsverdampfer entfernt.	46

Abb. 3.13: Größenverteilung der volumengewichteten hydrodynamischen Durchmesser von PCL _{4,8} -NP, die mittels Nanopräzipitation im Batch-Verfahren hergestellt wurden. 400 µl Polymerlösung (PCL _{4,8} ; 80 µM in Acetonitril) wurden zu 800 µl Ethanol gegeben und für 30 Minuten rührend inkubiert; anschließend wurden die Ansätze mit deionisiertem Wasser verdünnt und das Acetonitril und Ethanol am Rotationsverdampfer entfernt.	47
Abb. 3.14: TEM-Mikrographen von PCL _{4,8} -Nanopartikeln. Die Nanopartikel wurden auf einem Kupfergitter getrocknet und anschließend im Helllicht-Modus bei 120 kV vermessen.	49
Abb. 3.15: Größenverteilung der volumengewichteten hydrodynamischen Durchmesser von PCL _{2,1} -NP, die mittels Nanopräzipitation im Batch-Verfahren hergestellt wurden. 400 µl Polymerlösung (PCL _{2,1} ; 380 µg · ml ⁻¹ bzw. 183 µM in Acetonitril) wurden zu 800 µl Ethanol gegeben und für 30 Minuten rührend inkubiert; anschließend wurden die Ansätze mit deionisiertem Wasser verdünnt und das Acetonitril und Ethanol am Rotationsverdampfer entfernt.	50
Abb. 3.16: Größenverteilung der volumengewichteten hydrodynamischen Durchmesser von PCL _{2,3} -NP, die mittels Nanopräzipitation im Batch-Verfahren hergestellt wurden. 400 µl Polymerlösung (PCL _{2,3} ; 380 µg · ml ⁻¹ bzw. 164 µM in Acetonitril) wurden zu 800 µl Ethanol gegeben und für 30 Minuten rührend inkubiert; anschließend wurden die Ansätze mit deionisiertem Wasser verdünnt und das Acetonitril und Ethanol am Rotationsverdampfer entfernt.	51
Abb. 3.17: Bestimmung der Absorption von DPH bei 356 nm in Abhängigkeit der Konzentration von PCL _{4,8} ; die Diagramme der Polymere PCL _{2,1} und PCL _{2,3} befinden sich im Anhang (Kapitel B. 2).....	54
Abb. 3.18: Größenverteilung der volumengewichteten hydrodynamischen Durchmesser von PCL _{4,8} -NP, die mittels Nanopräzipitation im Batch-Verfahren hergestellt wurden. 400 µl Polymer-PTX-Lösung (PCL _{4,8} ; 380 µg · ml ⁻¹ bzw. 80 µM; PTX: zwischen 10 und 140 µM variiert, in Acetonitril) wurden zu 800 µl Ethanol gegeben und für 30 Minuten rührend inkubiert; anschließend wurden die Ansätze mit deionisiertem Wasser verdünnt und das Acetonitril und Ethanol am Rotationsverdampfer entfernt. ...	55

Abb. 3.19: Größenverteilung der volumengewichteten hydrodynamischen Durchmesser von PCL _{4,8} -NP, deren Suspensionen mit verschiedenen Methoden eingeeengt wurden. Die rote Linie zeigt zum Vergleich eine Größenverteilung von PCL _{4,8} -Nanopartikeln, deren Suspension nicht eingeeengt wurde.....	59
Abb. 3.20: Größenverteilung der volumengewichteten hydrodynamischen Durchmesser von PCL _{4,8} -NP, die mittels Nanopräzipitation im Batch-Verfahren hergestellt und deren Suspensionen am Rotationverdampfer direkt während der Herstellung der Nanopartikel eingeeengt wurden.....	60
Abb. 3.21: Mittlere volumengewichtete hydrodynamische Durchmesser von PCL _{4,8} -NP. Verglichen wurden unbehandelte Nanopartikel (vor der Kopplung), verschiedene Negativkontrollen sowie Nanopartikel, die mit Aptamer konjugiert wurden (+ Aptamer, + EDC).....	62
Abb. 3.22: Mittlere volumengewichtete hydrodynamische Durchmesser und Polydispersitätsindizes (PDI) von PCL _{4,8} -PTX-Nanopartikeln nach der Herstellung bzw. nach 21 Tagen Lagerung bei 4 °C in Wasser. Gezeigt sind die Daten von drei unabhängig hergestellten Ansätzen.	66
Abb. 3.23: Freisetzung von PTX aus PCL _{4,8} -PTX-Nanopartikeln während der Lagerung in Wasser bei 4 °C (Mittelwerte und Standardabweichungen einer Dreifachbestimmung). 100 % PTX entspricht 5,64 nmol PTX, welches in den eingesetzten 2 ml Nanopartikel-Suspension vorhanden war.....	69
Abb. 3.24: Freisetzung von PTX aus PCL _{4,8} -PTX-Nanopartikeln unter verschiedenen simulierten physiologischen Bedingungen (Variation der pH-Werte, jeweils in 1x PBS mit 0,1 % Tween 80 bei 37°C); (Mittelwerte und Standardabweichungen einer Dreifachbestimmung). Zur besseren Übersicht wurden die Werte der Probenentnahmen nach 44, 68 und 92 Stunden nicht dargestellt, dort waren bei allen untersuchten pH-Werten bereits 100 % des PTX freigesetzt.....	72
Abb. 4.1: ¹ H-NMR (400 MHz, CDCl ₃ , 298 K) und Strukturformel von Polycaprolacton aus Reaktionsansatz 1; die blaue Beschriftung ordnet die Gruppen den entsprechenden Peaks im ¹ H-NMR-Spektrum zu.	106

Abb. 4.2: ^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3 , 298 K) und Strukturformel von Polycaprolacton aus Reaktionsansatz 3; die blaue Beschriftung ordnet die Gruppen den entsprechenden Peaks im ^1H -NMR-Spektrum zu.	108
Abb. 4.3: Absorption von DPH in Abhängigkeit der Konzentration von $\text{PCL}_{2,1}$	109
Abb. 4.4: Absorption von DPH in Abhängigkeit der Konzentration von $\text{PCL}_{2,3}$	109

Tabellenverzeichnis

Tabelle 3.1: Mittlere Molekülmasse und Bezeichnung der hergestellten Polymere	26
Tabelle 3.2: Mittlere volumengewichtete hydrodynamische Durchmesser von PCL _{4,8} -NP, die mittels <i>Thin-film hydration</i> Methode hergestellt wurden, die Rehydration erfolgte für 24 Stunden mit deionisiertem Wasser	32
Tabelle 3.3: Vergleich der mittleren hydrodynamischen Durchmesser der PCL-Nanopartikel, bei Herstellung aus Polymeren mit unterschiedlichen mittleren Molekülmassen, sowie ohne oder mit Zusatz von PTX.	56

Literatur

1. Lindley, C., McCune, J. S., Thomason, T. E., Lauder, D., Sauls, A., Adkins, S., Sawyer, W. T., Perception of Chemotherapy Side Effects Cancer versus Noncancer Patients. *Cancer Practice* 1999, 7, 2: 59-65, doi:10.1046/j.1523-5394.1999.07205.x.
2. Zhang, H., Zhou, L., Zhu, Z., Yang, C., Recent Progress in Aptamer-Based Functional Probes for Bioanalysis and Biomedicine. *Chem. Eur. J.* 2016, 22, 9886 – 9900, doi:10.1002/chem.201503543.
3. Torchilin, V. P., in: Schäfer-Korting, M., Drug Delivery, Handbook of Experimental Pharmacology. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2010: Vol. 197.
4. Tran, S., DeGiovanni, P.-J., Piel, B., Rai, P., Cancer nanomedicine: a review of recent success in drug delivery. *Clin Trans Med* 2017, 6, 44: doi:10.1186/s40169-017-0175-0.
5. Albanese, A., Tang, P. S., Chan, W. C. W., The Effect of Nanoparticle Size, Shape, and Surface Chemistry on Biological Systems. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 2012/14: 1-16, doi:10.1146/annurev-bioeng-071811-150124.
6. Perrault, S. D., Walkey, C., Jennings, T., Fischer, H. C., Chan, W. C. W., Mediating Tumor Targeting Efficiency of Nanoparticles Through Design. *NANO LETTERS* 2009, 9, 5: 1909-1915, doi:10.1021/nl900031y.
7. Prieto, C., Calvo, L., The encapsulation of low viscosity omega-3 rich fish oil in polycaprolactone by supercritical fluid extraction of emulsions. *Journal of Supercritical Fluids* 2017, 128, 227-234, doi:10.1016/j.supflu.2017.06.003.
8. Mei, L., Zhang, Y., Zheng, Y., Tian, G., Song, C., Yang, D., Chen, H., Sun, H., Tian, Y., Liu, K., Li, Z., Huang, L., A Novel Docetaxel-Loaded Poly (ϵ -Caprolactone)/Pluronic F68 Nanoparticle Overcoming Multidrug Resistance for Breast Cancer Treatment. *Nanoscale Res Lett* 2009, 4, 1530–1539, doi:10.1007/s11671-009-9431-6.
9. Lince, F., Marchisio, D. L., Barresi, A. A., Strategies to control the particle size distribution of poly- ϵ -caprolactone nanoparticles for pharmaceutical applications. *Journal of Colloid and Interface Science* 2008, 322, 505–515, doi:10.1016/j.jcis.2008.03.033.
10. de Paz, E., Rodríguez, S., Kluge, J., Martín, Á., Mazzotti, M., Cocero, M. J., Solubility of β -carotene in poly-(ϵ -caprolactone) particles produced in colloidal state by Supercritical Fluid Extraction of Emulsions (SFEE). *J. of Supercritical Fluids* 2013, 84, 105– 112, doi:10.1016/j.supflu.2013.09.017.
11. Tiwari, G., Tiwari, R., Sriwastawa, B., Bhati, L., Pandey, S., Pandey, P., Bannerjee, S. K., Drug delivery systems: An updated review. *Int J Pharma Investig* 2012, 2, 1: 2-11, doi:10.4103/2230-973X.96920.
12. Li, Y., Thambi, T., Lee, D. S., Co-Delivery of Drugs and Genes Using Polymeric Nanoparticles for Synergistic Cancer Therapeutic Effects. *Adv. Healthcare Mater.* 2018, 7, 1700886, doi:10.1002/adhm.201700886.
13. Bromberg, L., Polymeric micelles in oral chemotherapy. *Journal of Controlled Release* 2008, 128, 99-112, doi:10.1016/j.jconrel.2008.01.018.

14. Vahed, S. Z., Fathi, N., Samiei, M., Dizaj, S. M., Sharifi, S., Targeted cancer drug delivery with aptamerfunctionalized polymeric nanoparticles. *Journal of Drug Targeting* 2018 doi:10.1080/1061186X.2018.1491978.
15. Dudley, A. C., Tumor Endothelial Cells. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2012, 2:a006536, 1-18, doi:10.1101/cshperspect.a006536.
16. Allen, T. M., Cullis, P. R., Drug Delivery Systems: Entering the Mainstream. *Science* 2004, 303, 5665: 1818-1822, doi: 10.1126/science.1095833.
17. Farokhzad, O. C., Langer, R., Impact of Nanotechnology on Drug Delivery. *acsnano* 2009, 3, 1: 16-20, doi:10.1021/nn900002m.
18. Oh, K. T., Baik, H. J., Lee, A. H., Oh, Y. T., Youn, Y. S., Lee, E. S., The Reversal of Drug-Resistance in Tumors Using a Drug-Carrying Nanoparticulate System. *Int. J. Mol. Sci.* 2009, 10, 3776-3792, doi:10.3390/ijms10093776.
19. Feng, S-S., Nanoparticles of biodegradable polymers for newconcept chemotherapy. *Expert Rev. Medical Devices* 2004, 1, 1: 115-125, doi:10.1586/17434440.1.1.115.
20. Truong, N. P., Whittaker, M. R., Mak, C. W., Davis, T. P., The importance of nanoparticle shape in cancer drug delivery. *Expert Opin. Drug Deliv.* 2015, 12, 1: 129-142, doi:10.1517/17425247.2014.950564.
21. Rejman, J., Oberle, V., Zuhorn, I. S., Hoekstra, D., Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrinand caveolae-mediated endocytosis. *Biochem. J.* 2004, 377, 159–169, doi:10.1042/BJ20031253.
22. Kumari, A., Yadav, S. K., Yadav, S. C., Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2010, 75, 1–18, doi:10.1016/j.colsurfb.2009.09.001.
23. He, C., Hu, Y., Yin, L., Tang, C., Yin, C., Effects of particle size and surface charge on cellular uptake and biodistribution of polymeric nanoparticles. *Biomaterials* 2010, 31, 3657–3666, doi:10.1016/j.biomaterials.2010.01.065.
24. Jain, R. K., Stylianopoulos, T., Delivering nanomedicine to solid tumors. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 2010, 7, 653–664, doi:10.1038/nrclinonc.2010.139.
25. Gratton, S. E. A., Ropp, P. A., Pohlhaus, P. D., Luft, J. C., Madden, V. J., Napier, M. E., DeSimone, J. M., The effect of particle design on cellular internalization pathways. *PNAS* 2008, 105, 33: 11613–11618, doi:10.1073/pnas.0801763105.
26. Slowing, I., Trewyn, B. G., Lin, V. S.-Y., Effect of Surface Functionalization of MCM-41-Type Mesoporous Silica Nanoparticles on the Endocytosis by Human Cancer Cells. *J. AM. CHEM. SOC.* 2006, 128, 14792-14793, doi:10.1021/ja0645943.
27. Lieleg, O., Baumgärtel, R. M., Bausch, A. R., Selective Filtering of Particles by the Extracellular Matrix: An Electrostatic Bandpass. *Biophysical Journal* 2009, 97, 1569–1577, doi:10.1016/j.bpj.2009.07.009.
28. Xu, F., Yuan, Y., Shan, X., Liu, C., Tao, X., Sheng, Y., Zhou, H., Long-circulation of hemoglobin-loaded polymeric nanoparticles as oxygen carriers with modulated surface charges. *International Journal of Pharmaceutics* 2009, 377, 199–206, doi:10.1016/j.ijpharm.2009.05.015.

29. Gref, R., Minamitake, Y., Peracchia, M. T., Trubetskoy, V., Torchilin, V., Langer, R., Biodegradable Long-Circulating Polymeric Nanospheres. *SCIENCE* 1994, 263, 5153: 1600-1603, doi:10.1126/science.8128245.
30. Cai, S., Vijayan, K., Cheng, D., Lima, E. M., Discher, D. E., Micelles of Different Morphologies—Advantages of Worm-like Filomicelles of PEO-PCL in Paclitaxel Delivery. *Pharmaceutical Research* 2007, 24, 11: 2099-2109, doi:10.1007/s11095-007-9335-z.
31. Christian, D. A., Cai, S., Garbuzenko, O. B., Harada, T., Zajac, A. L., Minko, T., Discher, D. E., Flexible Filaments for in Vivo Imaging and Delivery: Persistent Circulation of Filomicelles Opens the Dosage Window for Sustained Tumor Shrinkage. *MOLECULAR PHARMACEUTICS* 2009, 6, 5: 1343–1352, doi:10.1021/mp900022m.
32. Geng, Y., Dalheimer, P., Cai, S., Tsai, R., Tewari, M., Minko, T., Discher, D. E., Shape effects of filaments versus spherical particles in flow and drug delivery. *nature nanotechnology* 2007, 2, 249-255, doi:10.1038/nnano.2007.70.
33. Zhou, Z., Ma, X., Jin, E., Tang, J., Sui, M., Shen, Y., Van Kirk, E. A., Murdoch, W. J., Radosz, M., Linear-dendritic drug conjugates forming long-circulating nanorods for cancer-drug delivery. *Biomaterials* 2013, 34, 5722-5735, doi:10.1016/j.biomaterials.2013.04.012.
34. Feng, G., Mao, D., Liu, J., Goh, C. C., Ng, L. G., Kong, D., Tang, B. Z., Liu, B., Polymeric Nanorods with Aggregation-Induced Emission Characteristics for Enhanced Cancer Targeting and Imaging. *Nanoscale* 2018, 10, 13: 5869-5874, doi:10.1039/C7NR09196F.
35. Zhang, Y., Tekobo, S., Tu, Y., Zhou, Q., Jin, X., Dergunov, S. A., Pinkhassik, E., Yan, B., Permission to Enter Cell by Shape: Nanodisk vs Nanosphere. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 2012, 4, 4099–4105, doi:10.1021/am300840p.
36. Rao, J. P., Geckeler, K. E., Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters. *Progress in Polymer Science* 2011, 36, 887–913, doi:10.1016/j.progpolymsci.2011.01.001.
37. Yeo, S.-D., Kiran, E., Formation of polymer particles with supercritical fluids: A review. *J. of Supercritical Fluids* 2005, 34, 287–308, doi:10.1016/j.supflu.2004.10.006.
38. Ajiboye, A. L., Trivedi, V., Mitchell, J. C., Preparation of polycaprolactone nanoparticles via supercritical carbon dioxide extraction of emulsions. *Drug Deliv. and Transl. Res.* 2018, 8, 1790–1796, doi:10.1007/s13346-017-0422-3.
39. Allémann, E., Leroux, J.-C., Gurny, R., Doelker, E., In Vitro Extended-Release Properties of Drug-Loaded Poly(DL-Lactid Acid) Nanoparticles Produced by a Salting-Out Procedure. *Pharmaceutical Research* 1993, 10, 12: 1732-1737, doi:10.1023/A:1018970030327.
40. Song, Z., Zhu, W., Liu, N., Yang, F., Feng, R., Linolenic acid-modified PEG-PCL micelles for curcumin delivery. *International Journal of Pharmaceutics* 2014, 471, 312–321, doi:10.1016/j.ijpharm.2014.05.059.
41. Zhang, L., Chen, Z., Wang, H., Wu, S., Zhao, K., Sun, H., Kong, D., Wang, C., Leng, X., Zhu, D., Preparation and evaluation of PCL-PEG-PCL polymeric nanoparticles for doxorubicin delivery against breast cancer. *RSC Advances* 2016, 6, 60: 54727–54737, doi:10.1039/c6ra04687h.

42. Zhao, J., Wang, Y., Luan, L., Star-Shaped Polycaprolactone-Polyethyleneglycol Copolymer Micelle-Like Nanoparticles for Picropodophyllin Delivery. *J. Biomed. Nanotechnol.* 2014, *10*, 8: 1627–1634, doi:10.1166/jbn.2014.1835.
43. Byun, Y., Hwang, J. B., Bang, S. H., Darby, D., Cooksey, K., Dawson, P. L., Park, H. J., Whiteside, S., Formulation and characterization of α -tocopherol loaded poly ϵ -caprolactone (PCL) nanoparticles. *LWT - Food Science and Technology* 2011, *44*, 24-28, doi:10.1016/j.lwt.2010.06.032.
44. Behera, A. K., Barik, B. B., Pandya, S., Joshi, S., Formulation and evaluation of Isoniazid loaded Σ -polycaprolactone nanoparticles. *Journal of Pharmacy Research* 2012, *5*, 2: 798-802.
45. Fessi, H., Puisieux, F., Devissaguet, J. Ph., Ammoury, N., Benita, S., Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *International Journal of Pharmaceutics* 1989, *55*, 1: R1-R4, doi:10.1016/0378-5173(89)90281-0.
46. Molpeceres, J., Guzman, M., Aberturas, M. R., Chacon, M., Berges, L., Application of Central Composite Designs to the Preparation of Polycaprolactone Nanoparticles by Solvent Displacement. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 1996, *85*, 2: 206-213, doi:10.1021/js950164r.
47. Ahmad, A., Fauzia, E., Kumar, M., Mishra, R. K., Kumar, A., Khan, M. A., Raza, S. S., Khan, R., Gelatin-Coated Polycaprolactone Nanoparticle-Mediated Naringenin Delivery Rescue Human Mesenchymal Stem Cells from Oxygen Glucose Deprivation-Induced Inflammatory Stress. *ACS Biomater. Sci. Eng.* 2019, *5*, 683–695, doi:10.1021/acsbiomaterials.8b01081.
48. Badri, W., Miladi, K., Robin, S., Viennet, C., Nazari, Q. A., Agusti, G., Fessi, H., Elaissari, A., Polycaprolactone Based Nanoparticles Loaded with Indomethacin for Anti-Inflammatory Therapy: From Preparation to Ex Vivo Study. *Pharm Res* 2017, *34*, 1773–1783, doi:10.1007/s11095-017-2166-7.
49. Hong, S. H., Patel, T., Ip, S., Garg, S., Oh, J. K., Microfluidic Assembly To Synthesize Dual Enzyme/Oxidation-Responsive Polyester-Based Nanoparticulates with Controlled Sizes for Drug Delivery. *Langmuir* 2018, *34*, 3316–3325, doi:10.1021/acs.langmuir.8b00338.
50. Operti, M. C., Dölen, Y., Keulen, J., van Dinther, E. A. W., Figdor, C. G., Tagit, O., Microfluidics-Assisted Size Tuning and Biological Evaluation of PLGA Particles. *Pharmaceutics* 2019, *11*, 590, doi:10.3390/pharmaceutics11110590.
51. Chiesa, E., Dorati, R., Pisani, S., Conti, B., Bergamini, G., Modena, T., Genta, I., The Microfluidic Technique and the Manufacturing of Polysaccharide Nanoparticles. *Pharmaceutics* 2018, *10*, 267, doi:10.3390/pharmaceutics10040267.
52. Prieto, C., Calvo, L., Supercritical fluid extraction of emulsions to nanoencapsulate vitamin E in polycaprolactone. *Journal of Supercritical Fluids* 2017, *119*, 274-282, doi:10.1016/j.supflu.2016.10.004.
53. Feng, R., Zhu, W., Song, Z., Zhao, L., Zhai, G., Novel star-type methoxy-poly(ethylene glycol) (PEG)–poly(ϵ -caprolactone) (PCL) copolymeric nanoparticles for controlled release of curcumin. *J Nanopart Res* 2013, *15*, 1748: doi:10.1007/s11051-013-1748-5.

54. Vangeyte, P., Gautier, S., Jérôme, R., About the methods of preparation of poly(ethylene oxide)-b-poly(ϵ -caprolactone) nanoparticles in water Analysis by dynamic light scattering. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* 2004, 242, 203–211, doi:10.1016/j.colsurfa.2004.04.070.
55. Lu, Z., Bei, J., Wang, S., A method for the preparation of polymeric nanocapsules without stabilizer. *Journal of Controlled Release* 1999, 61, 1-2: 107-112, doi:10.1016/S0168-3659(99)00112-1.
56. Talom, R. M., Fuks, G., Mingotaud, C., Gineste, S., Gauffre, F., Investigation of the reversibility of the unimer-to-aggregate transition in block copolymers by surface tension-measurements. *Journal of Colloid and Interface Science* 2012, 387, 180–186, doi:10.1016/j.jcis.2012.07.009.
57. Claesson, H., Malmström, E., Johansson, M., Hult, A., Synthesis and characterisation of star branched polyesters with dendritic cores and the effect of structural variations on zero shear rate viscosity. *Polymer* 2002, 43, 12: 3511-3518, doi:10.1016/S0032-3861(02)00073-3.
58. Letchford, K., R. Liggins und H. Burt, Solubilization of hydrophobic drugs by methoxy poly(ethylene glycol)-block-polycaprolactone diblock copolymer micelles: theoretical and experimental data and correlations. *J Pharm Sci* 2008, 97, 3: 1179-90, 10.1002/jps.21037.
59. Kim, S. Y., Shin, I. G., Lee, Y. M., Cho, C. S., Sung, Y. K., Methoxy poly(ethylene glycol) and ϵ -caprolactone amphiphilic block copolymeric micelle containing indomethacin. II. Micelle formation and drug release behaviours. *Journal of Controlled Release* 1998, 51, 1: 13–22, doi:10.1016/S0168-3659(97)00124-7.
60. Park, E. K., Kim, S. Y., Lee, S. B., Lee, Y. M., Folate-conjugated methoxy poly(ethylene glycol)/poly(ϵ -caprolactone) amphiphilic block copolymeric micelles for tumor-targeted drug delivery. *Journal of Controlled Release* 2005, 109, 158–168, doi:10.1016/j.jconrel.2005.09.039.
61. Ai, X., Zhong, L., Niu, H., He, Z., Thin-film hydration preparation method and stability test of DOX-loaded disulfide-linked polyethylene glycol 5000-lysine-di-tocopherol succinate nanomicelles. *asian journal of pharmaceutical sciences* 2014, 9, 244-250, doi:10.1016/j.ajps.2014.06.006.
62. Hoang, B., Lee, H., Reilly, R. M., Allen, C., Noninvasive Monitoring of the Fate of ¹¹¹In-Labeled Block Copolymer Micelles by High Resolution and High Sensitivity MicroSPECT/CT Imaging. *MOLECULAR PHARMACEUTICS* 2009, 6, 2: 581–592, doi:10.1021/mp8002418.
63. Gu, Q., Xing, J. Z., Huang, M., He, C., Chen, J., SN-38 loaded polymeric micelles to enhance cancer therapy. *Nanotechnology* 2012, 23, 205101, doi:10.1088/0957-4484/23/20/205101.
64. Zhang, L., He, Y., Ma, G., Song, C., Sun, H., Paclitaxel-loaded polymeric micelles based on poly(ϵ -caprolactone)-poly(ethylene glycol)-poly(ϵ -caprolactone) triblock copolymers: in vitro and in vivo evaluation. *Nanomedicine: NBM* 2012, 8, 925–934, doi:10.1016/j.nano.2011.11.005.
65. Saito, S., Salt Effect on Polymer Solutions. *Journal of Polymer Science Part A-1: Polymer Chemistry* 1969, 7, 7: 1789-1802, doi:10.1002/pol.1969.150070719.

66. Hyde, A. M., Zultanski, S. L., Waldman, J. H., Zhong, Y.-L., Shevlin, M., Peng, F., General Principles and Strategies for Salting-Out Informed by the Hofmeister Series. *Org. Process Res. Dev.* 2017, 21, 1355-1370, doi:10.1021/acs.oprd.7b00197.
67. Engelberg, S., Netzer, E., Assaraf, Y. G., Livney, Y. D., Selective eradication of human non-small cell lung cancer cells using aptamer-decorated nanoparticles harboring a cytotoxic drug cargo. *Cell Death and Disease* 2019, 10, 702, doi:10.1038/s41419-019-1870-0.
68. Reisch, A., Runser, A., Arntz, Y., Mély, Y., Klymchenko, A. S., Charge-Controlled Nanoprecipitation as a Modular Approach to Ultrasmall Polymer Nanocarriers: Making Bright and Stable Nanoparticles. *acsnano* 2015, 9, 5: 5104–5116, doi:10.1021/acs.nano.5b00214.
69. Witt, S., Scheper, T., Walter, J.-G., Production of polycaprolactone nanoparticles with hydrodynamic diameters below 100 nm. *Eng Life Sci.* 2019, 19, 658–665, doi:10.1002/elsc.201800214.
70. Jeong, B., Lee, D. S., Shon, J.-I., Bae, Y. H., Kim, S. W., Thermoreversible Gelation of Poly(Ethylene Oxide) Biodegradable Polyester Block Copolymers. *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry* 1999, 37, 6: 751–760, doi:10.1002/(SICI)1099-0518(19990315)37:6<751::AID-POLA10>3.0.CO;2-0.
71. Alexandridis, P., Holzwarth, J. F., Hatton, T. A., Micellization of Poly(ethylene oxide)-Poly(propylene oxide)-Poly(ethylene oxide) Triblock Copolymers in Aqueous Solutions: Thermodynamics of Copolymer Association. *Macromolecules* 1994, 27, 2414-2425, doi:10.1021/ma00087a009.
72. Guo, L., Santschi, P., in: Wilkinson, K. J., Lead, J. R., Environmental Colloids and Particles. IUPAC, 2007.
73. Thermo Fisher Scientific Inc., Carbodiimide Crosslinker Chemistry (2020). <https://www.thermofisher.com/de/de/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/carbodiimide-crosslinker-chemistry.html> (abgerufen am 08.06.2020).
74. Modrejowski, J., Walter, J.-G., Kretschmer, I., Kemal, E., Green, M., Belhadj, H., Blume, C., Scheper, T., Aptamer-modified polymer nanoparticles for targeted drug delivery. *BioNanoMaterials* 2016, 17, 1-2: 43-51, doi:10.1515/bnm-2015-0027.
75. Zhao, Z., Xu, L., Shi, X., Tan, W., Fang, X., Shangguan, D., Recognition of subtype non-small cell lung cancer by DNA aptamers selected from living cells. *Analyst* 2009, 134, 1808–1814, doi:10.1039/b904476k.
76. D'Souza, S., A Review of In Vitro Drug Release Test Methods for Nano-Sized Dosage Forms. *Advances in Pharmaceutics* 2014doi:10.1155/2014/304757.
77. Shen, J., Burgess, D. J., In vitro dissolution testing strategies for nanoparticulate drug delivery systems: recent developments and challenges. *Drug Deliv. and Transl. Res.* 2013, 3, 409–415, doi:10.1007/s13346-013-0129-z.
78. Abouelmagd, S. A., Sun, B., Chang, A. C., Ku, Y. J., Yeo, Y., Release Kinetics Study of Poorly Water-Soluble Drugs from Nanoparticles: Are We Doing It Right? *Mol Pharm.* 2015, 12, 3: 997–1003, doi:10.1021/mp500817h.

79. Sahana, D. K., Mittal, G., Bhardwaj, V., Ravi Kumar, M. N. V., PLGA Nanoparticles for Oral Delivery of Hydrophobic Drugs: Influence of Organic Solvent on Nanoparticle Formation and Release Behavior In Vitro and In Vivo Using Estradiol as a Model Drug. *JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES* 2008, *97*, 4: 1530-1542, doi:10.1002/jps.21158.
80. Trissel, L. A., Pharmaceutical Properties of Paclitaxel and Their Effects on Preparation and Administration. *PARMACOTHERAPY* 1997, *17*, 5P2: 133S-139S, doi:10.1002/j.1875-9114.1997.tb03815.x.
81. Lale, S. V., A. R. G., Aravind, A., Kumar, D. S., Koul, V., AS1411 Aptamer and Folic Acid Functionalized pH-Responsive ATRP Fabricated pPEGMA-PCL-pPEGMA Polymeric Nanoparticles for Targeted Drug Delivery in Cancer Therapy. *Biomacromolecules* 2014, *15*, 5: 1737-1752, doi:10.1021/bm5001263.
82. Ge, Z., Liu, S., Functional block copolymer assemblies responsive to tumor and intracellular microenvironments for site-specific drug delivery and enhanced imaging performance. *Chem. Soc. Rev.* 2013, *42*, 7289-7325, doi:10.1039/c3cs60048c.
83. Maeda, H., Nakamura, H., Fang, J., The EPR effect for macromolecular drug delivery to solid tumors: Improvement of tumor uptake, lowering of systemic toxicity, and distinct tumor imaging in vivo. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2013, *65*, 71-79, doi:10.1016/j.addr.2012.10.002.
84. Noguchi, Y., Wu, J., Duncan, R., Strohalm, J., Ulbrich, K., Akaike, T., Maeda, H., Early Phase Tumor Accumulation of Macromolecules: A Great Difference in Clearance Rate between Tumor and Normal Tissues. *Jpn. J. Cancer Res.* 1998, *89*, 3: 307-314, doi:10.1111/j.1349-7006.1998.tb00563.x.
85. Rajan, M., Raj, V., Formation and characterization of chitosan-poly(lactic acid)-poly(ethylene glycol)-gelatin nanoparticles: A novel biosystem for controlled drug delivery. *Carbohydrate Polymers* 2013, *98*, 951-958, doi:10.1016/j.carbpol.2013.05.025.
86. Choi, C., Chae, S. Y., Nah, J.-W., Thermosensitive poly(N-isopropylacrylamide)-b-poly(ϵ -caprolactone) nanoparticles for efficient drug delivery system. *Polymer* 2006, *47*, 4571-4580, doi:10.1016/j.polymer.2006.05.011.
87. Kim, B.-S., Kim, C.-S., Lee, K.-M., The Intracellular Uptake Ability of Chitosan-coated Poly (D,L-lactide-co-glycolide) Nanoparticles. *Arch Pharm Res* 2008, *31*, 8: 1050-1054, doi:10.1007/s12272-001-1267-5.
88. Yoo, H. S., Oh, J. E., Lee, K. H., Park, T. G., Biodegradable Nanoparticles Containing Doxorubicin-PLGA Conjugate for Sustained Release. *Pharmaceutical Research* 1999, *16*, 7: 1114-1118, doi:10.1023/A:1018908421434.
89. Malvern Panalytical Ltd., Dynamische Lichtstreuung (DLS) (2020). <https://www.malvernpanalytical.com/de/products/technology/light-scattering/dynamic-light-scattering> (abgerufen am 05.06.2020).

90. AZoNano, NanoParticle Tracking Analysis (NTA) and Dynamic Light Scattering (DLS) - Comparison Between NTA and DLS (2020). <https://www.azonano.com/article.aspx?ArticleID=2274> (abgerufen am 05.06.2020).
91. Promega Corporation, CellTiter Blue® Cell Viability Assay, Technical Bulletin (2020). <https://www.promega.de/resources/protocols/technical-bulletins/101/celltiter-blue-cell-viability-assay-protocol/> (abgerufen am 25.01.2020).

Betreute Abschlussarbeiten im Rahmen der Promotion

Masterarbeit von Thassilo Haupt

Titel: Optimierung von Polycaprolacton-Nanopartikeln für das Drug Delivery

Jahr: 2018-2019

Bachelorarbeit von Rieke Oehlmann

Titel: Untersuchung der Stabilität und Wirkstofffreisetzung aus Polycaprolacton-Nanopartikeln

Jahr: 2019

Publikationen

Witt, S. (90 %), Scheper, T., Walter, J.-G., Production of polycaprolactone nanoparticles with hydrodynamic diameters below 100 nm. *Eng Life Sci.* 2019, 19: 658–665, doi:10.1002/elsc.201800214

Kurth, T., **Witt, S.** (20 %), Bolten, S., Waniek, J.-J., Kortmann, C., Lavrentieva, A., Scheper, T., Walter, J.-G., Development of Aptamer-Based TID Assays Using Thermophoresis and Microarrays. *Biosensors* 2019, 9 (4), 124; doi:10.3390/bios9040124

Eilers, A., **Witt, S.** (50 %), Walter, J.-G., Aptamer-Modified Nanoparticles in Medical Applications. In: *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. Springer, Berlin, Heidelberg, 2020; doi:10.1007/10_2020_124

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Sandra Witt geb. Kuhlmeier

Nationalität: Deutsch

Geburtsdatum: 02.01.1992

Geburtsort: Warendorf

Beruflicher Werdegang:

01/2017 - **Wissenschaftliche Hilfskraft / Wissenschaftlicher Mitarbeiter:**
12/2019 **Institut für Technische Chemie**
Gottfried-Wilhelm-Leibniz Universität Hannover (LUH), Hannover,
Deutschland

11/2015 - **Studentische Hilfskraft: Institut für Technische Chemie**
01/2016 LUH, Hannover, Deutschland

Ausbildung:

Seit 01/2017 **Promotionsvorhaben im Fach Chemie: Institut für Technische
Chemie**
LUH, Hannover, Deutschland

10/2014 - **Master Life Science: LUH**
10/2016 Hannover, Deutschland

10/2011 - **Bachelor Life Science: LUH**
09/2014 Hannover, Deutschland

2008 - **Allgemeine Hochschulreife: Augustin-Wibbelt-Gymnasium**
2011 Warendorf, Deutschland