



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Kontrastmittel für die Magnetresonanztomographie: Herstellung und
Charakterisierung von Gadolinium beladenen PLGA Nanosphären

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Verfasserin: Andrea Geiger
Matrikel-Nummer: 0408661
Studienrichtung: A449-Pharmazie

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

Ausgeführt am Department für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie
Universität Wien
Wien 2008

Meiner Familie

INHALTSVERZEICHNIS

- 1. Einleitung
- 2. Grundlagen
 - 2.1. Magnetresonanztomographie
 - 2.2 MR-Kontrastmittel
 - 2.3 Nanopartikel
 - 2.4 Poly(D,L-lactid-co-glycolid)
 - 2.5 Poloxamer
 - 2.6 Zetapotential
- 3. Methoden
 - 3.1 Herstellung von PLGA-Nanosphären
 - 3.2 Reinigung der Partikelsuspension
 - 3.2.1 Diafiltration
 - 3.2.2 Gelfiltration
 - 3.3 Partikelgröße mittels DLS
 - 3.4 Bestimmung des Zetapotentials
 - 3.5 Bestimmung der Partikelausbeute
 - 3.6 Gadolinium Quantifizierung mittels ICP-OES
 - 3.7 FT-IR

4. Ergebnisse

4.1 Markierung von PLGA-Nanosphären mit Gadolinium

4.1.1 Modifikation der Partikeloberfläche mit Gadolinium-Chelaten

4.1.1.1 Schritt 1 – Kopplung mit Ethylendiamin bzw. Lysin

4.1.1.1.1 Protokoll A – detaillierte Beschreibung

4.1.1.1.2 Protokoll B – detaillierte Beschreibung

4.1.1.1.3 Protokoll C – detaillierte Beschreibung

4.1.1.2 Schritt 2 – Kopplung mit DTPA

4.1.1.3 Schritt 3 – Beladen der DTPA-Nanopartikel mit Gadolinium

4.1.1.3.1 Herstellung der $Gd(NTA)_2Na_3$ -Lösung

4.1.1.3.2 Beladen der Nanopartikel mit Gadolinium

4.1.2 Gadolinium Einbau in Partikel aus unmodifiziertem PLGA

4.1.3 Gadolinium Einbau in Partikel aus DTPA-modifiziertem PLGA

4.1.3.1 Herstellung von DTPA-modifiziertem PLGA (DTPA-PLGA)

4.1.3.1.1 Vorversuche

4.1.3.1.2 Darstellung von DTPA-PLGA

4.1.3.1.3 Charakterisierung von DTPA-PLGA mittels FT-IR

4.1.3.2 Herstellung von Nanosphären aus DTPA-ED-PLGA

4.1.4 Inkubation von unmodifizierten PLGA-Nanosphären mit $Gd(NTA)_2Na_3$

4.2 Zetapotential und Größe

4.2.1 PLGA Nanopartikel mit Gadolinium-Chelat modifizierter Oberfläche

4.2.1.1 Zetapotential

4.2.1.2 Größe

4.2.2 Gadolinium beladene Nanopartikel aus unmodifiziertem PLGA

4.2.2.1 Zetapotential

4.2.2.2 Größe

4.2.3 Gadolinium Nanopartikel aus DTPA-modifiziertem PLGA

4.2.4 Absättigung von unmodifizierten PLGA-Nanosphären mit $Gd(NTA)_2Na_3$

4.2.4.1 Zetapotential

4.2.4.2 Größe

4.2.5 Zusammenfassung

4.3 Stabilität

4.3.1 Elektrostatische Stabilisierung

4.3.2 Sterische Stabilisierung

4.4 Partikelausbeute

4.4.1 Partikelausbeute, Gadolinium Gehalt

4.4.2 Zusammenhang zwischen Partikelausbeute und Waschzyklen

4.5 Gelfiltration

5. Zusammenfassung

6. Anhang

6.1 FT-IR Spektren

6.2 Danksagung

6.3 Literaturverzeichnis

6.4 Lebenslauf

6.5 Abkürzungen

6.6 Materialien

1 EINLEITUNG

Die Magnetresonanztomographie (MRT) wird seit Beginn der 80er Jahre in der medizinischen Diagnostik zur Bildgebung am Menschen genutzt. Dank der rasanten technologischen Entwicklung gehört MRT heute zu den routinemäßig verwendeten Verfahren für die Diagnose tumoröser, entzündlicher und traumatischer Erkrankungen.

Kontrastmittel werden in der Magnetresonanztomographie routinemäßig appliziert und liefern relevante Zusatzinformationen. Das extrazelluläre Kontrastmittel Magnevist® mit dem Wirkstoff Gadopentetat-Dimeglumin hat die breiteste Zulassung und ist seit 1988 für die klinische Diagnostik auf dem Markt. Die kontrastverstärkende Wirkung wird über das paramagnetische Gadolinium vermittelt, das als Komplex mit Diethylentriaminpentaessigsäure (DTPA) vorliegt.

Freies Gadolinium ist ein Kalziumkanalblocker und damit toxisch (1). Daher muss Gadolinium für die Anwendung als Diagnostikum von einem starken und spezifischen Komplexliganden gebunden sein. Durch einen entsprechenden Komplexliganden wird gewährleistet, dass das Zentralatom Gadolinium nicht durch andere Metallionen ausgetauscht und somit freigesetzt wird. DTPA hat sich hier als besonders geeignet erwiesen (2).

Niedermolekulare Kontrastmittel wie Gadopentetat-Dimeglumin eignen sich aufgrund ihrer kurzen Verteilungshalbwertszeit zur Untersuchung von extravaskulären Regionen, aber nicht besonders gut zur Darstellung des Blutgefäßsystems. Blood-Pool-Kontrastmittel sind höhermolekulare Verbindungen, die nicht oder nur sehr langsam durch die Kapillarwände diffundieren können. Sie ermöglichen unter anderem die Detektion von Regionen mit gestörter Kapillarbarriere wie etwa bei Tumoren, Infektionen oder Blutungen. Dafür eignen sich insbesondere partikuläre Kontrastmittel.

Eine weitere Gruppe von Nanopartikeln für MRT sind die RES-spezifischen Kontrastmittel. Da Nanopartikel nach i.v. Gabe von Zellen des retikuloendothelialen Systems (RES) phagozytiert werden, können Unterschiede in der Aufnahme rate unter anderem zur Charakterisierung von Leberläsionen eingesetzt werden.

Ein Fokus bei der Entwicklung neuer Kontrastmittel für die Magnetresonanztomographie liegt daher auf partikulären Systemen. Dabei werden

vorwiegend Eisenoxid Nanopartikel eingesetzt, doch es wird nach Alternativen gesucht. Paschkunova-Martic et al. haben erstmals Nanopartikel aus Polystyrol mit Gadolinium markiert (12). Diese sind allerdings nicht bioabbaubar. In der pharmazeutischen Technologie besitzen Nanopartikel zunehmende Bedeutung für diagnostische ebenso wie für therapeutische Zwecke (3). Für medizinische Anwendungen sollen sie nicht nur biokompatibel, sondern auch bioabbaubar sein.

Als Partikelmatrix eignet sich daher das von der FDA zugelassene synthetische Polymer Poly(D,L-lactid-co-glycolid) (PLGA) besonders gut. PLGA-Partikel können mit lipophilen und hydrophilen Substanzen beladen werden. Ihre Oberfläche kann chemisch modifiziert werden, wodurch sie für verschiedenste Anwendungen funktionalisiert werden können (4).

Da Nanopartikel in der pharmazeutischen Technologie nicht nur für therapeutische, sondern zunehmend auch für diagnostische Zwecke eingesetzt werden, soll im Rahmen dieser Arbeit Gadolinium als DTPA-Komplex in die Partikelmatrix aus biokompatiblen und bioabbaubarem PLGA inkorporiert oder an der Partikeloberfläche immobilisiert werden. Ziel dieser Diplomarbeit ist die Herstellung und Charakterisierung von Gadolinium markierten PLGA Nanosphären als ein neuartiges, bioabbaubares Kontrastmittel für die Magnetresonanztomographie.

2 GRUNDLAGEN

2.1 Magnetresonanztomographie

Die Kernspin- oder auch Magnetresonanztomographie (MRT) wird als bildgebendes Verfahren in der medizinischen Diagnostik eingesetzt. Es erlaubt eine Darstellung von Struktur und Funktion der Gewebe und Organe im Körper.

Die physikalische Grundlage der MRT bildet die Kernspinresonanz (Nuclear Magnetic Resonance, NMR). Zur Bildgebung werden die Kerne von Wasserstoffatomen (^1H) verwendet. Die Methode beruht auf einer elektromagnetischen Anregung der Atome und der Messung der Signale, die diese erzeugen, während sie wieder in den Grundzustand zurückkehren (1). Protonen besitzen neben ihrer positiven elektrischen Ladung einen Drehimpuls (Spin). Rotierende elektrische Ladungen verhalten sich wie kleine Magnete. Sie werden von äußeren Magnetfeldern und elektromagnetischen Wellen beeinflusst. In einem starken statischen Magnetfeld werden sie parallel zum Feld ausgerichtet. Ein zusätzlich angelegtes, hochfrequentes Wechselfeld bewirkt eine Auslenkung der Rotationsachse aus der Richtung des statischen Magnetfelds. In der Folge kommt es zu einer Präzessionsbewegung. Dabei rotiert die Achse des Spins um die Feldrichtung des statischen Magnetfelds. Alle angeregten Kernspins rotieren mit derselben Frequenz, und die Magnetvektoren der einzelnen Spins werden addiert. Die rotierende Magnetisierung wirkt wie ein elektrischer Generator und induziert in der Empfangsspule eine Wechselspannung, die als MR-Signal gemessen wird. Nach Abschalten des hochfrequenten Wechselfeldes klingt die Magnetisierung ab und der stabile Ausgangszustand wird wieder erreicht. Für dieses Abklingen des MR-Signals sind zwei voneinander unabhängige Vorgänge verantwortlich, die Spin-Gitter-Wechselwirkung und die Spin-Spin-Wechselwirkung. Bei der Spin-Gitter-Wechselwirkung, die auch als T1-Relaxation oder Longitudinale Relaxation bezeichnet wird, wird Energie an die Umgebung (das „Gitter“) abgegeben. Die dafür nötige Zeit (T1-Zeit) ist abhängig von der inneren Bewegung der Moleküle und der Stärke des äußeren Magnetfeldes. Sie gibt an, wie schnell sich die Spins von einer Anregung erholen und wieder anregbar werden. Bei der Spin-Spin-Wechselwirkung, auch T2-Relaxation oder Transversale Relaxation, geht die Magnetisierung durch Energieaustausch der Spins untereinander verloren. Die T2-Zeit gibt an, wie rasch das MR-Signal nach einer Anregung abklingt. T1- und T2-Relaxation laufen gleichzeitig ab. Tatsächlich zerfällt das MR-Signal aufgrund der T2-Relaxation lange bevor der Grundzustand durch die T1-Relaxation

vollständig wiederhergestellt ist.

Der Bildkontrast im MR-Bild hängt im Wesentlichen von drei Parametern ab, der Protonendichte, also der Zahl anregbarer Spins pro Volumeneinheit, sowie der T1- und der T2-Zeit. Diese unterscheiden sich für verschiedene Gewebe sehr stark und bestimmen deren Helligkeit im MR-Bild. Bei einer Messung wird je nach Fragestellung einer dieser Parameter betont. Dadurch ist es in manchen Fällen bereits ohne Kontrastmittel möglich, Gewebe voneinander abzugrenzen. Häufig werden jedoch Kontrastmittel benötigt, um die Signalintensitätsdifferenz zweier Gewebe und somit den Bildkontrast zu erhöhen.

2.2 MR-Kontrastmittel

MR-Kontrastmittel sind Arzneimittel, die durch Kontrastanhebung zur Erhöhung der Sensitivität und Spezifität eingesetzt werden. Zusätzlich kann durch ihre pharmakokinetischen Eigenschaften eine funktionelle Information gewonnen werden.

Sie verändern die Eigenschaften der Gewebe entweder direkt durch Veränderung der Protonendichte oder indirekt durch Veränderung des lokalen Magnetfeldes und damit der T1- und T2-Zeiten (1).

Die meisten klinisch verwendeten MR-Kontrastmittel sind Lösungen paramagnetischer Metallionen, wie etwa Gadolinium oder Mangan sowie Eisenoxide. Paramagnetische Substanzen besitzen aufgrund von ungepaarten Elektronen in den äußeren Orbitalen oder ungepaarten Nukleonen ein magnetisches Moment. In einem äußeren Magnetfeld richten sich diese wie die Protonen aus. Das dreiwertige Gadolinium (Gd^{3+}) verfügt über sieben einzeln besetzte Elektronenorbitale und gehört daher zu den stärksten paramagnetischen Vertretern.

Bei der MRT sieht man nicht die Kontrastmittel selbst, sondern nur ihren Einfluss auf die Relaxationseigenschaften der umgebenden Protonen.

Die T1- und T2-Relaxationszeiten werden verkürzt. Je kürzer die Relaxationszeit ist, desto höher ist die Relaxivität und somit die Stärke eines MR-Kontrastmittels.

Die Relaxivität wird einerseits durch Geräte- und Messparameter beeinflusst, andererseits auch durch die Konzentration der paramagnetischen Substanz. Die Dosis-Wirkungskurven sind allerdings nicht linear, sondern weisen in Abhängigkeit von den Messbedingungen einen Peak mit optimaler Kontrastmittelkonzentration auf. Weiters entspricht die doppelte Relaxivität nicht einer doppelt so hohen Signalstärke. In der Praxis führt nicht unbedingt die höchste Gadolinium Konzentration zum höchsten Signalanstieg. Ein weiterer Faktor, der die Relaxivität eines MR-Kontrastmittels beeinflusst, ist die Wasserzugänglichkeit. Je besser die Wechselwirkung

mit den umliegenden Protonen erfolgen kann, desto mehr wird der Kontrast verstärkt.

Anhand der Pharmakokinetik können MR-Kontrastmittel in verschiedene Gruppen unterteilt werden. Niedermolekulare wasserlösliche Verbindungen, die sich nach i.v. Applikation vaskulär und im interstitiellen Raum verteilen, werden als extrazelluläre Kontrastmittel bezeichnet. Dazu gehören die meisten der Gadolinium(III)-Komplexe, die heute klinisch eingesetzt werden. Der wichtigste Vertreter ist Gadopentetat-Dimeglumin, das 1988 unter dem Namen Magnevist® als erstes MR-Kontrastmittel zugelassen wurde und nach wie vor zu den meistverwendeten Präparaten zählt.

Eine weitere Gruppe ist die der intravaskulären oder Blood-Pool-Kontrastmittel. Dabei handelt es sich vorwiegend um Makromoleküle oder partikuläre Systeme, die nicht oder nur langsam durch die Kapillarmembran diffundieren. Sie werden für die MR-Angiographie verwendet. Außerdem geben sie Aufschluss über Schädigungen der Kapillarbarriere wie etwa bei Tumoren, Traumata, Blutungen oder Infektionen.

Bei den RES-spezifischen Kontrastmitteln handelt es sich ebenfalls um partikuläre Systeme. Diese werden von den Zellen des retikuloendothelialen Systems phagozytiert. Veränderungen der Aufnahmerate können unter anderem zur Diagnose von krankhaften Leberveränderungen herangezogen werden.

Darüber hinaus gibt es hepatozyten- und lymphknotenspezifische Kontrastmittel, hyperpolarisierte Gase zur Darstellung der Lungenventilation oder anderer Hohlkörper und gastrointestinale Kontrastmittel.

Bei der Entwicklung neuer MR-Kontrastmittel wird besonders intensiv an gewebspezifischen Systemen gearbeitet. Dabei sollen durch verschiedene Targeting-Strategien die Kontrastmittel ein bestimmtes Gewebe markieren. So wurden etwa Folatezeptor-spezifische Kontrastmittel zur Darstellung Folatezeptor-positiver Tumore hergestellt [5].

Im Allgemeinen sind die derzeit klinisch verwendeten Kontrastmittel gut verträglich. Bei den Gadolinium-haltigen Kontrastmitteln ist eine starke und spezifische Komplexierung nötig. Freies Gadolinium wäre toxisch. Da Gd^{3+} praktisch denselben Ionendurchmesser wie Ca^{2+} besitzt, kann es an Kalziumkanäle binden und wirkt daher als Kalzium Antagonist. Dadurch können Zellatmung, Muskelkontraktilität und Blutgerinnung gestört sein. Starke Komplexbildner wie Diethylenetriaminpentaessigsäure dianhydrid (DTPABA), 1,4,7,10-Tetraazacyclododecan-1,4,7,10-tetraessigsäure (DOTA) oder Benzyloxypropionictetra-acetate (BOPTA) reduzieren die Freisetzung von Gadolinium und somit toxische Nebenwirkungen auf ein Minimum. Daneben sind die Komplexliganden auch für die Verteilungseigenschaften des Kontrastmittels verantwortlich.

2.3 Nanopartikel

Nanopartikel werden unterteilt in zwei morphologisch verschiedene Typen, Nanokapseln und Nanosphären. Nanokapseln bestehen aus einer Polymerhülle, die einen Kern aus einem anderen Material umschließt. Nanosphären bilden eine durchgehende Polymermatrix, über die der Wirkstoff verteilt vorliegt (Abb. 1).

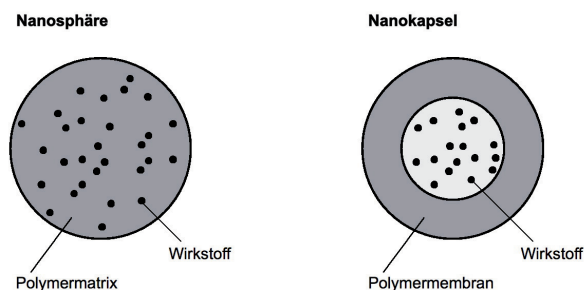


Abb. 1 Schematische Darstellung der Nanopartikeltypen

Nanopartikel haben als zukunftssträchtige Arzneiformen in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung gewonnen. Ihre pharmazeutische Anwendung finden Nanopartikel vor allem in Drug Delivery Systemen. Diese Systeme sollen den Wirkstoff während seinem Transport zum Zielgewebe schützen, sich im Zielgewebe anreichern und die Freigabe des Wirkstoffes mit einem kontrollierten Zeit-Dosis-Profil ermöglichen.

Die Teilchen im Nanometerbereich können bei der Herstellung gezielt mit neuen Eigenschaften und Funktionalitäten ausgestattet werden. Mit Hilfe von Nanopartikeln können auch wasserunlösliche, chemisch labile Wirkstoffe verarbeitet werden. Es können Zersetzungen vor Erreichen des Zielortes, aber auch unerwünschte Anreicherungen in Geweben vermieden und somit Nebenwirkungen reduziert werden.

Die gezielte Pharmakotherapie mit Nanopartikeln ist abhängig von der Partikelgröße, der Oberflächenladung und der Oberflächenmodifikationen. Nanopartikel sind potentielle Trägersysteme für bestimmte Arzneistoffe wie Hormone, Antihypertensiva, Immunmodulatoren und Tumortheraeutika [4]. Desweiteren spielen sie eine wichtige Rolle bei der Tumordiagnose [3]. Bei der Entwicklung von Nanopartikeln für therapeutische und diagnostische Zwecke hat Poly(D,L-lactid-co-glycolid) (PLGA) als biokompatible und biodegradierbare Matrix eine herausragende Position.

2.4 Poly(D,L-lactid-co-glycolid)

Poly(D,L-lactid-co-glycolid) ist ein von der Food and Drug Administration zugelassenes Copolymer, welches häufig in Form von Implantaten und resorbierbarem Nahtmaterial verwendet wird.

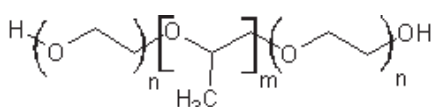
Als Trägermaterial für Nanopartikel ist PLGA reizvoll, da es biokompatibel und bioabbaubar ist. Akkumulationen und Immunantworten sind nicht zu erwarten, da es im Körper hydrolysiert wird und dann in Form seiner Monomerbausteine Milchsäure und Glykolsäure als endogene Stoffwechselprodukte vorliegt.

In vorliegender Arbeit wurde zur Partikelherstellung Resomer® RG 503 H verwendet. Es besitzt eine endständige Carboxylgruppe, die für die Koppelung mit verschiedenen Molekülen wie Markern, Wirkstoffen oder Targeten zur Verfügung steht.

9

2.5 Poloxamer

Bei der Herstellung der PLGA Nanopartikel wurde Pluronic® F68 als Stabilisator verwendet. Dabei handelt es sich um Poloxamer 188, ein Blockcopolymer der Poloxamer-Reihe. Poloxamere bestehen aus einem zentralen hydrophoben Polyoxypropylenblock (PPO) und zwei endständigen hydrophilen Polyoxyethylenblöcken (PEO) (Abb. 2).



m = 30
n = 75

Abb. 2
Struktur von
Pluronic® F68

Pluronic® F68 hat eine mittlere molare Masse von 8350 g/mol. Die hydrophilen Blöcke bestehen aus 75 hydrophilen Ethylenoxid Einheiten, der hydrophobe Block aus 30 Propylenoxid Einheiten (6).

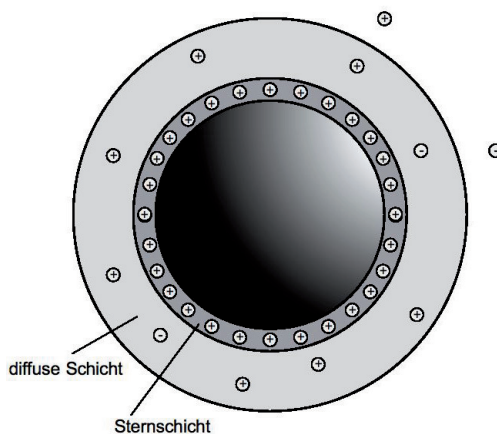
Durch die Adsorption des Polymers an die Partikeloberfläche können die Oberflächeneigenschaften verändert werden. Der zentrale Polyoxypropylenblock adsorbiert bevorzugt an der hydrophoben Partikeloberfläche, wohingegen die endständigen Polyoxyethylenblöcke ins wässrige Medium ragen. So verhindern sie mechanisch eine Annäherung von Partikeln, und es kommt zur sterischen Stabilisierung.

2.6 Zetapotential

Das Zetapotential ist das elektrische Potential an der Abscherschicht eines Partikels, der im elektrischen Feld wandert und dabei einen Teil seiner Ionenhülle abstreift. Liegt ein Partikel in Suspension vor, so erscheint er insgesamt neutral. Allerdings ist das geladene Partikel umgeben von einer Doppelschicht an Gegenionen, die die Ladung kompensiert und die scheinbar neutrale Ladung erklärt. Die Doppelschicht besteht aus einer inneren Schicht fest gebundener Ionen, der Stern Schicht. An dieser Schicht wiederum lagert sich eine diffuse Schicht weniger stark gebundener Ionen an (Abb. 3).

10

Abb. 3
Ladungsverteilung
an der Partikel-
oberfläche



Wird nun ein elektrisches Feld angelegt, bewegen sich die Partikel und die diffuse Ionenschicht wird zum Teil abgeschert. In Folge bewegen sich die Partikel mit konstanter Geschwindigkeit, was als elektrophoretische Mobilität bezeichnet wird.

Über die Henry Gleichung lässt sich das Zetapotential der Partikel errechnen (Abb. 4).

$$U_E = \frac{2\varepsilon z f(Ka)}{3\eta}$$

Abb. 4
Henry Gleichung

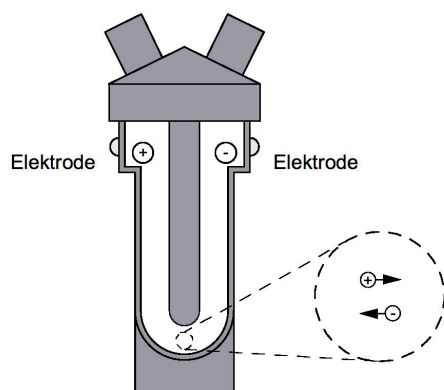
Die Henry Gleichung besagt, dass das Zetapotential z abhängt von der elektrophoretischen Mobilität U_E , der Dielektrizitätskonstanten ε , der Viskosität η und der Henry Funktion $f(Ka)$.

Die Bestimmung der elektrophoretischen Mobilität erfolgt in einer Kapillarküvette, die an jedem Ende eine Elektrode hat. Dort wird ein elektrisches Potential angelegt und die Partikel wandern zu der Elektrode mit der jeweils gegensinnigen Ladung (Abb. 5).

11

Die Geschwindigkeit wird mittels Laser Doppler Velocimetry (LDV) vermessen. Es werden durch die Bewegung verursachte Frequenzverschiebungen des eingestrahlten Laserlichtes bestimmt.

Das Zetapotential lässt eine Einschätzung der physikalischen Stabilität der Suspension zu. Haben die Partikel in der Suspension ein stark negatives oder stark positives Zetapotential, sorgt die Ladung für eine Abstoßung der Partikel untereinander und eine Aggregation wird verhindert. Bei einem Zetapotential positiver als +30 mV oder negativer als -30 mV spricht man von einem stabilen System.

Abb. 5
Kapillarküvette

3 METHODEN

3.1 Herstellung von PLGA Nanosphären

Die PLGA Nanosphären wurden mittels Solvent Evaporation Technik hergestellt. 400 mg Polymer Resomer® RG 503 H wurden in 2,0 g Ethylacetat, einem organischen und mit Wasser nicht mischbaren Lösungsmittel, gelöst. Diese organische Phase wurde 50 Sekunden mit Hilfe des Ultraschallstabes (Sonopuls HD 70, BANDELIN electronic, Berlin, Deutschland) in einer äußeren wässrigen Phase emulgiert, welche aus 6 g einer 10 % (w/w) Pluronic® F68 Lösung bestand.

Diese Emulsion wurde in 100,0 g einer 1 % (w/w) wässrigen Pluronic® F68 Lösung am Magnetrührer bei 600 rpm eine Stunde ständig gerührt. Durch das Rühren wurde die Diffusion des flüchtigen, organischen Lösungsmittels der Emulsionströpfchen in die äußere wässrige Phase unterstützt. Das Lösungsmittel verdunstet an der Grenzschicht zwischen Wasser und Luft. Aufgrund der Unlöslichkeit des Polymers in der wässrigen Phase wurde dieses ausgefällt und es entstanden PLGA Nanosphären.

Eventuell verbleibendes Ethylacetat wurde am Rotationsverdampfer eine Stunde unter vermindertem Druck bei Raumtemperatur entfernt. Schließlich wurde die Nanosphären Suspension zur Entfernung zu großer Aggregate filtriert (1,0 µm Glassfiber Prefilter, Millipore).

Um auch hydrophile Wirkstoffe in Nanosphären einzubauen, wurde die Doppalemulsionstechnik, eine modifizierte Solvent Evaporation Technik, angewandt. In einer lipophilen Lösung aus 400 mg PLGA in 2,0 g Ethylacetat wurden als innere wässrige Phase 400 µl Wirkstofflösung bzw. Aqua destillata 60 Sekunden mit Hilfe eines Ultraschallstabes emulgiert. Die entstandene w/o Emulsion wurde erneut in 6 ml einer 10 % (w/w) äußeren wässrigen Pluronic® F68 Lösung emulgiert, indem sie weitere 50 Sekunden beschallt wurde (Abb. 6). Die so entstandene w/o/w Doppalemulsion wurde mit 100,0 g einer wässrigen 1 % (w/w) Pluronic® F68 Lösung vereinigt. Die weiteren Schritte erfolgten wie oben beschrieben.

13

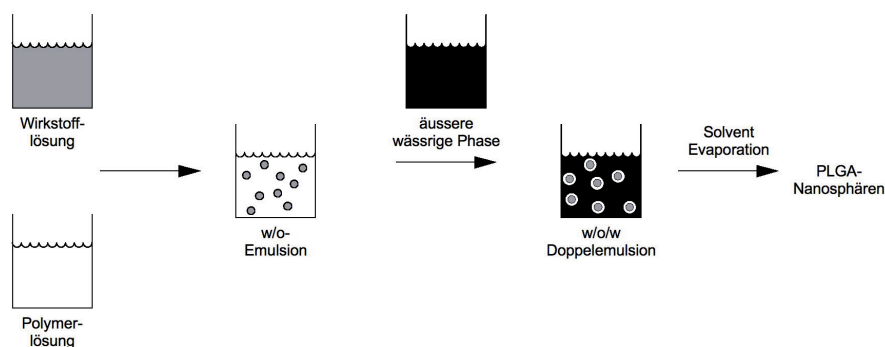


Abb. 6
Schematische Darstellung der Doppalemulsionstechnik

3.2 Reinigung der Partikelsuspension

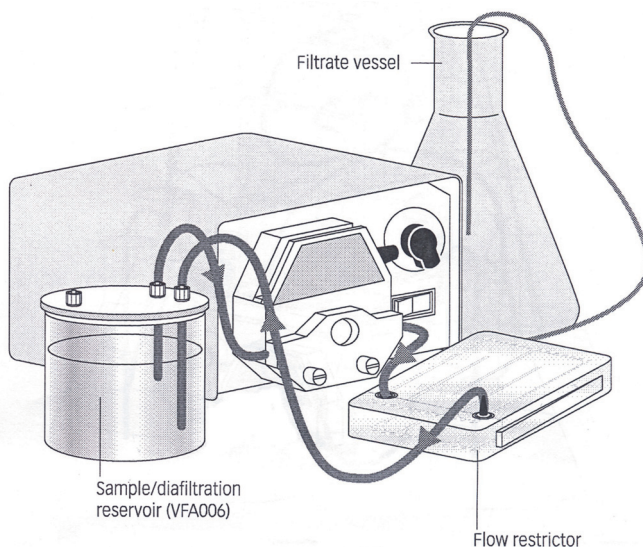
3.2.1 Diafiltration

Mit einem Diafiltrationssystem wurden überschüssige Tenside und Reagentien abgetrennt, die während der Partikelmodifikation zugesetzt wurden.

Dieses System bestand aus einer Vivaflow 50 Kassette (100000 MWCO PES, Sartorius Stedim Biotech S.A., Aubagne, Frankreich) gekoppelt mit einer Schlauchquetschpumpe (ISMATEC SA, Glattbrugg, Schweiz) (Abb. 7).

14

Abb. 7
Schematische Darstellung eines Diafiltrationssystems



Hierbei fand unter einem Systemdruck von 2,5 bar eine Tangentialfiltration an einer Membran aus Polyethersulfon mit einer Ausschlussgrenze von 100000 Dalton statt, die die Abtrennung niedermolekularer Stoffe und die Aufkonzentrierung der Nanosphären Suspension ermöglichte.

In einem Waschzyklus wurde die Nanosphären Suspension mit dem doppelten Volumen an 0,1 % Pluronic® F68 verdünnt und mittels Diafiltration auf ein Drittel eingeengt. Da über dieses System die Abtrennung von niedermolekularen Stoffen nur bedingt möglich war, waren mehrere Waschzyklen nötig. Die Dauer eines solchen Waschzyklus war abhängig vom abzutrennenden Volumen, der Viskosität des Mediums, der Konzentration der Partikel in der Suspension, dem Zustand der Membran und dem Systemdruck.

Die Reinigung der Partikelsuspension mittels Diafiltration ging einher mit oftmaligen Wiederholungen der Waschzyklen. Deswegen dauerte es lange, bis der gewünschte Wascheffekt vorhanden war. Obwohl verschiedene Schläuche getestet wurden, war es nicht zu verhindern, dass die verwendeten Schläuche zum Teil geplatzt sind. Tygon Standard R-3607 Schläuche (ID: 2,79mm; WALL: 0,86mm; purple/white) wiesen laut Herstellerinformation (ISMATEC SA, Glattbrugg, Schweiz) bei 0 bar eine Lebensdauer von 35 Stunden auf, hingegen bei 0,7 bar 30 Stunden. Tygon LFL Schläuche (ID: 2,06mm; WALL: 0,84mm; purple/purple) waren bei 0 bar mit 800 Stun-

den und bei 0,7 bar mit 700 Stunden Lebensdauer deklariert. Da es für die Schläuche bei einer Verwendung bei 2,5 bar keine Angaben des Herstellers über die Lebensdauer gab, wurden sowohl Tygon Standard R-3607 als auch Tygon LFL, mit der längsten Lebensdauer, verwendet. Unter den gegebenen Umständen war kein Zusammenhang feststellbar zwischen der vom Hersteller deklarierten Lebensdauer und der tatsächlichen Lebensdauer.

In der vorliegenden Arbeit wurde zur Reinigung der Partikelsuspension ausschließlich das Diafiltrationssystem verwendet, es sollten aber alternative Reinigungsmethoden in Betracht gezogen werden.

3.2.2 Gelfiltration

Die Gelfiltration ist ein säulenchromatographisches Verfahren, das Stoffgemische aufgrund ihrer Größe auftrennt. Kleine Moleküle verweilen länger in den Poren der stationären Phase als große Moleküle. Dies hat zur Folge, dass große Moleküle zuerst eluiert werden, gefolgt von kleinen Molekülen.

Die mit dem porösen, hochvernetzten Dextran Sephadex™ gepackten PD-10 Trennsäulen (GE Healthcare Europe GmbH, München, Deutschland) erlauben diese Auftrennung. Der Trennbereich von Sephadex™, einem modifiziertem Dextran, dessen Polysaccharidketten mit Epichlorhydrin vernetzt sind, ist durch die Porengröße festgelegt. Die Ausschlussgrenze gibt die Größe des kleinsten Moleküls an, das nicht in die Poren eindringen kann und liegt bei Sephadex G-25 bei 5 kDa. So kann man niedermolekulare Substanzen von Molekülen mit einer Molekülmasse über 5 kDa trennen.

3.3 Partikelgrößenbestimmung mittels DLS

Die dynamische Lichtstreuung (DLS), auch Photonen-Korrelations-Spektroskopie (PCS) genannt, wertet das an suspendierten Nanopartikeln gestreute Licht eines Lasers aus.

Es kommt aufgrund der Brown'schen Molekularbewegung zu Fluktuationen der Streulichtintensität. In sehr kurzen Zeitabständen wird diese Streulichtintensität einer Probe vermessen und die Messwerte werden miteinander korreliert. Charakteristisch für die Brown'sche Molekularbewegung ist, dass sich kleine Partikel schnell und große Partikel langsam bewegen. Dadurch entsteht eine definierte Korrelationsfunktion aus der der Diffusionskoeffizient D der gelösten Moleküle bestimmt werden kann.

Das Verhältnis zwischen der Größe eines Partikels und dessen Bewegungsgeschwindigkeit wird in der Stokes-Einstein Gleichung beschrieben (Abb. 8).

Abb. 8
Stokes-Einstein-
Gleichung

$$r = \frac{k T}{6 \pi \eta D}$$

Der Diffusionskoeffizient D charakterisiert die Geschwindigkeit der dispergierten Teilchen im Messmedium und ist die einzige variable Größe. k stellt die Boltzmann Konstante und T die absolute Temperatur dar. Über η fließt die dynamische Viskosität in die Gleichung ein. Somit lässt sich unter der Annahme kugelförmiger Teilchen der Radius r berechnen.

16

Die Größenverteilung, die auf der Korrelationsfunktion basiert, kann auf drei Arten dargestellt werden. Um die unterschiedlichen Darstellungen zu beschreiben, geht man von einer Suspension aus, in der sich gleich viele Partikel von jeder Größe befinden.

Betrachtet man nun die Verteilung der Anzahl der Partikel, so wird man Peaks erhalten, die alle gleich groß sind.

Die Darstellung der Verteilung des Volumens der Partikel hingegen ergibt, dass kleine Partikel kleine Peaks liefern, während große Partikel im Verhältnis sehr große Peaks ergeben. Dies resultiert aus der Volumensberechnung der Partikel (Abb. 9).

Abb. 9
Berechnung des
Volumens

$$V = \frac{4}{3} \pi r^3$$

Die dritte Darstellungsmöglichkeit basiert auf der Verteilung der Intensität. Auch hier liefern kleine Partikel kleine Peaks und somit eine geringe Intensität. Große Partikel ergeben sehr viel größere Peaks. Diesem Effekt liegt die Rayleigh-Streuung zugrunde, welche besagt, dass die Intensität der Streuung an einem Partikel proportional zur sechsten Potenz des Radius ist (Abb. 10).

$$I = I_0 \frac{1 + \cos^2 \theta}{2 R^2} \left(\frac{2\pi}{\lambda} \right)^4 \left(\frac{n^2 - 1}{n^2 + 1} \right)^2 \left(\frac{d}{2} \right)^6$$

Abb. 10
Intensität unpolarisierten Lichts

In der vorliegenden Arbeit wurde als Methode zur Darstellung der Partikelgröße die Verteilung des Volumens gewählt.

Die Größen und Größenverteilungen der Partikel wurde am Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., Malvern, Großbritannien) mit UV Küvetten aus Polymethylmethacrylat (Barloworld Scientific Ltd. Stone Staffordshire, Großbritannien) bestimmt.

Der Polydispersitätsindex gibt die Breite der Größenverteilung an und wurde bei der Vermessung der Partikelgröße mitbestimmt. Liegt der Polydispersitätsindex zwischen 0,03 und 0,06, so bezeichnet man die Dispersion monodispers. Wohingegen bei Werten zwischen 0,10 und 0,20 eine enge Verteilung und bei Werten zwischen 0,25 und 0,50 eine breite Verteilung zugrunde liegt. Als nicht auswertbare Ergebnisse werden Polydispersitätsindizes über 0,05 angesehen [7].

17

3.4 Bestimmung des Zetapotentials

Das Zetapotential eines bewegten Partikels in einer Suspension ist das elektrische Potential an der Abscherschicht. Die elektrophoretische Mobilität wurde bestimmt, und über die Henry Gleichung wurde schließlich das Zetapotential ermittelt.

Die Messung des Zetapotentials wurde zur Charakterisierung der Modifikation der Oberflächenstruktur der PLGA Nanosphären eingesetzt. Anhand des Zetapotentials kann die physikalische Stabilität der Suspension eingeschätzt werden. Hierfür wurde die Nanosphären Suspension zwischen den Modifikationsschritten bei 25°C in Kapillarküvetten am Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., Malvern, Großbritannien) bestimmt. Die Ionenkonzentration der Suspension, die sich in der Leitfähigkeitsbestimmung zeigt, beeinflusst das Zetapotential erheblich und wurde durch entsprechende Verdünnungsreihen minimiert.

3.5 Bestimmung der PartikelAusbeute

Zur Bestimmung der PartikelAusbeute nach der Oberflächenmodifikation wurden Aliquote der Partikelsuspension lyophilisiert und der Trockenrückstand ausgewogen. Dieser enthielt die Nanopartikel und die im Dispersionmedium gelösten Substanzen. Dabei war vor allem der Stabilisator Pluronic in relevanten Mengen vorhanden. Da den Waschlösungen je nach Protokoll 0,1 % bzw. 0,01 % Pluronic zugesetzt worden waren, wurde die entsprechende Masse von der Auswaage abgezogen.

500 bzw. 1000 µl Probe wurden in ein vorher abgewogenes 2 ml Eppendorf Gefäß pipettiert und das Gesamtgewicht von Gefäß und Probe bestimmt. Die Lyophilisation erfolgte in einer Gefriertrocknungsanlage Alpha 1-4 (Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode, Deutschland). Die Probe wurde eine halbe Stunde vor Beginn der Haupttrocknung bei -80°C eingefroren. Es folgte jeweils eine zwölfstündige Haupttrocknung bei -30 °C, um das gefrorene Wasser durch Sublimation zu entfernen, und eine Nachtrocknung bei -55°C zur Entfernung des kapillar und molekular gebundenen Wassers.

Nach 24 Stunden Lyophilisation wurde nach Erlangen der Raumtemperatur der trockene Rückstand abgewogen. Unter Berücksichtigung der Masse des leeren Gefäßes und des Pluronicanteils wurde die Ausbeute an Partikeln bestimmt.

3.6 Gadolinium Quantifizierung mittels ICP-OES

Die Gadolinium Konzentration wurde mittels ICP-OES (Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry) gemessen. Dieses emissionsspektroskopische Verfahren eignet sich zur quantitativen Bestimmung von Elementen. Das zu analysierende Gadolinium wird als flüssige Probe über einen Zerstäuber einem Argon Plasma zugeführt. Die Atome werden dadurch angeregt und bei der Rückkehr vom energetisch höheren Zustand zu einem energetisch niedrigeren Zustand wird elektromagnetische Strahlung emittiert, die zur Identifikation des Gadoliniums herangezogen wird. Die Intensitäten dienen als Maß für die Konzentration.

Zur Probenvorbereitung wurden 2 ml PLGA Nanosphärensuspension lyophilisiert, und nach Zusatz von 3 ml 65 % HNO_3 unter dem Abzug zur Trockene gebracht. Der Trockenrückstand wurde in 2,5 ml 6 M HNO_3 aufgenommen und mit Aqua bidestillata auf 25,0 ml aufgefüllt. Nach dieser sauren Hydrolyse des Polymers befanden sich die Gadolinium Ionen in salpetersaurer Lösung. Vermessen wurden die Proben in einem Optima 5300DV (Perkin Elmer Vertriebs GmbH, Wien, Österreich) auf mehreren Linien, zur Auswertung wurde 342.245 im radialen Blickwinkel herangezogen. Es wurden jeweils drei Messungen durchgeführt mit einer Dauer von 5-20 Sekunden, die vom Gerät je nach Konzentration automatisch festgelegt wurde.

3.7 FT-IR

Um die einzelnen Kopplungsschritte der PLGA Modifikation zu charakterisieren wurde die FT-IR eingesetzt. Die Fourier-Transformations-Infrarot-Spektroskopie als Variante der IR-Spektroskopie findet ihre Anwendung in der qualitativen und quantitativen Analytik organischer Verbindungen. Computergestützt wird hierbei die Fourier-Transformation durchgeführt, welche die gemessenen elektrischen Signale in ein IR-Spektrum umwandelt. Frequenzbereiche elektromagnetischer Wellen, die im Wellenlängenbereich zwischen 800 und 500 000 nm liegen werden von Molekülen absorbiert, wodurch Schwingungen und Rotationen der Moleküle angeregt werden. Die auftretenden Absorptionen von IR-Strahlung sind charakteristisch für die jeweilige Verbindung.

Die Messungen wurden auf dem Fourier-Transformations-Infrarot-Spektrometer Tensor 27 (Bruker Austria GmbH, Wien, Österreich) durchgeführt. Zur Messung wurde eine Bio-ATR II Einheit verwendet, die temperierbar ist und für Messungen in wässrigem Medium geeignet ist. Die ATR-Spektroskopie, die abgeschwächte Totalreflexion, ist eine Methode der IR-Spektroskopie, bei der die Intensität des reflektierten Lichtes gemessen wird und die Rückschlüsse über das absorbierende Medium zulässt. Die Messung basiert auf einer dualen Kristalltechnologie, der obere Kristall besteht aus Silizium wohingegen der untere, der nicht mit der Probe in Kontakt kommt aus Zinkselenid besteht. Die Spektren wurden mit einem Quecksilber-Cadmium-Tellurid (MTC) Detektor aufgenommen.

4 ERGEBNISSE

4.1 Markierung von PLGA Nanosphären mit Gadolinium

Zur Beladung von PLGA Nanopartikeln mit Gadolinium wurden drei verschiedene Ansätze verfolgt. Im ersten Ansatz wurde die Oberfläche der Nanosphären mit Gadolinium-Chelaten modifiziert, im zweiten wurden Gadolinium-Komplexe in Partikel aus unmodifiziertem PLGA eingebaut und im dritten Ansatz wurde Gadolinium in Partikel aus DTPA-modifiziertem PLGA eingebaut.

Zwischen den einzelnen Kopplungsschritten wurden Zetapotential, Partikelgröße und Polydispersitätsindex bestimmt, um Informationen über Veränderungen der Oberflächenladung und der Stabilität der Partikelsuspension zu erhalten. Im Anschluss wurde die Partikelausbeute bestimmt und die Gadolinium-Beladung wurde mittels ICP-OES quantifiziert.

21

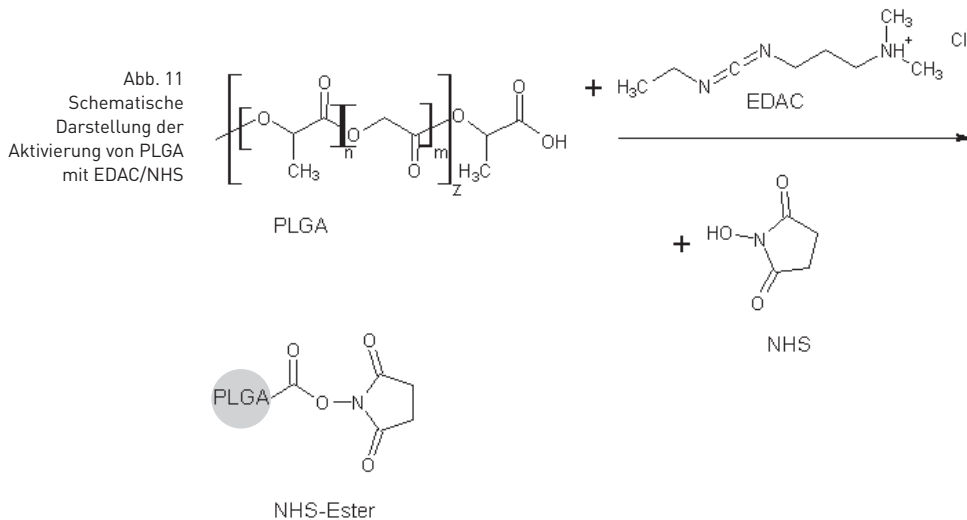
4.1.1 Modifikation der Partikeloberfläche mit Gadolinium-Chelaten

Die Modifikation der Partikeloberfläche mit Gadolinium erfolgte in drei Schritten. Zuerst wurde durch Carbodiimid-Kopplung von Ethylendiamin bzw. Lysin an die PLGA-Carboxylgruppen an der Partikeloberfläche eine primäre Aminogruppe eingeführt. Anschließend wurde diese mit DTPA gekoppelt. Zuletzt wurden die Partikel mit Gadolinium Ionen beladen.

4.1.1.1 Schritt 1 – Kopplung mit Ethylendiamin bzw. Lysin

Die einzelnen Polymerketten des für die Partikelherstellung verwendeten PLGA-Typs Resomer® RG503H besitzen eine endständige Carboxylgruppe. Das negative Zetapotential der Partikel zeigt, dass sich viele Carboxylgruppen an der Partikeloberfläche befinden.

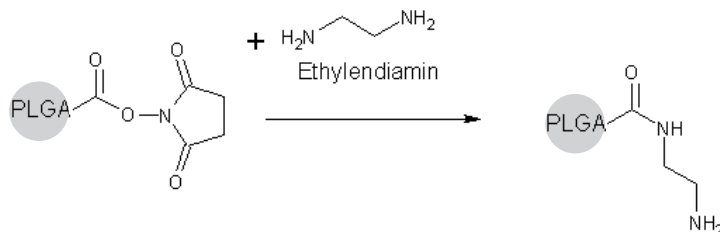
Carbodiimide werden zur Kopplung von Carboxylgruppen mit primären Aminen verwendet. Die Verknüpfung erfolgt dabei über Amidbindungen. Für die Reaktion im wässrigen Medium wird das wasserlösliche N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimid Hydrochlorid (EDAC) verwendet. EDAC reagiert mit einer Carboxylgruppe zu einem aminreaktiven O-Acylisoharnstoff-Zwischenprodukt. Trifft dieses nicht rasch genug auf eine Aminogruppe, kommt es zur Hydrolyse und die unveränderte Carboxylgruppe liegt wieder vor. In Gegenwart von N-Hydroxy-succinimid (NHS) entsteht jedoch ein aminreaktiver stabiler NHS-Ester wodurch die Koppellungseffizienz erhöht werden kann. (Abb. 11).



Zudem ist der NHS-Ester ausreichend stabil, um eine Zwei-Schritt-Reaktion zu erlauben. Dabei wird zuerst durch Inkubation der Carboxylgruppen mit EDAC und NHS der NHS-Ester gebildet. Das pH-Optimum dieser Reaktion liegt zwischen pH 4,7 und 6,0 (8). Nach Entfernen der überschüssigen Kopplungsreagentien und der ebenfalls wasserlöslichen Nebenprodukte wird in einem zweiten Schritt bei einem pH-Optimum im neutralen bis basischen Bereich der Aktivester mit den Aminogruppen des Kopplungspartners amidartig verknüpft. Dadurch kann beim Vorhandensein von Carboxylgruppen und primären Aminogruppen am selben Molekül Quervernetzung weitgehend vermieden werden.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden drei verschiedene Protokolle entwickelt, die sich bei der Carbodiimid-Kopplung hinsichtlich der Kopplungspartner und der verwendeten Reagentien unterscheiden. Bei Protokoll A und B wurde Ethylendiamin an die Partikel gekoppelt (Abb. 12). Hingegen bei Protokoll C wurde Lysin verwendet (Abb. 13).

Abb. 12
Schematische Darstellung der Synthese von Amino-PLGA mit Hilfe von Ethylendiamin (2-Schritt-Reaktion)



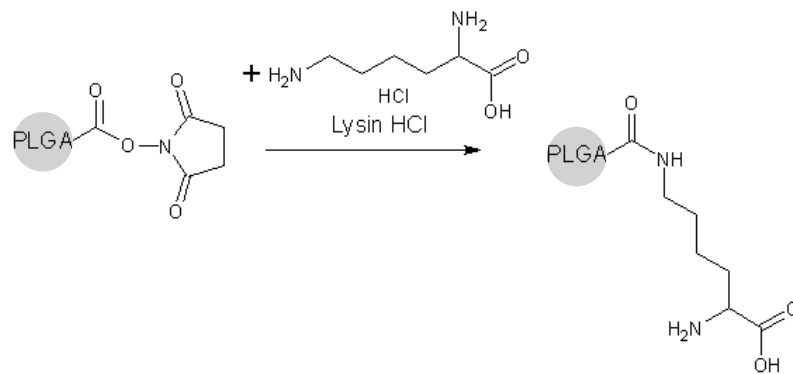


Abb. 13
Schematische Darstellung der Synthese von Amino-PLGA mit Hilfe von Lysin (2-Schritt-Reaktion)

23

Beide Liganden besitzen zwei primäre Aminogruppen, von denen jeweils eine an PLGA binden und die andere der Kopplung mit Diethylentriaminpentaessigsäure dianhydrid (DTPABA) zur Verfügung stehen soll. Zusätzlich sollte durch Inkubation mit einem Überschuss an Aminokomponente Quervernetzung vermieden werden.

Bei Protokoll A und C wurden die Partikel zuerst mit EDAC und NHS inkubiert und erst nach Entfernen der überschüssigen Kopplungsreagentien wurde mit Ethylendiamin bzw. Lysin inkubiert. Bei Protokoll B wurde in nur einem Schritt mit EDAC und Ethylendiamin inkubiert (Abb. 14).

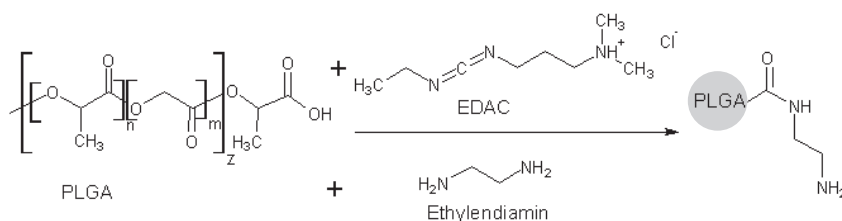


Abb. 14
Schematische Darstellung der Synthese von Amino-PLGA durch EDAC/NHS-Aktivierung und Kopplung von Ethylendiamin (1-Schritt-Reaktion)

Dies war möglich, da Ethylendiamin keine Carboxylgruppen besitzt.

Weiters unterscheiden sich die einzelnen Chargen hinsichtlich der bei den Waschlösungen eingesetzten Pluronic-Konzentrationen (Tab. 1).

Tab. 1
Bei der Herstellung
von Amino-PLGA
Nanosphären ein-
gesetzte Pluronic
Konzentrationen

Protokollnummer	Probennummer	Pluronic Konzentration (%)
A	1	0,1
A	14	0,01
B	2	0,1
B	16	0,01
C	3	0,1
C	15	0,01

4.1.1.1.1 Protokoll A-detaillierte Beschreibung

Pro Charge werden 60 g mittels Doppalemulsionstechnik hergestellter PLGA Nanosphären Suspension (siehe Kapitel 3.1) eingesetzt. Zur Darstellung der NHS-Aktivester werden die Nanosphären in einem Erlenmeyerkolben mit 720 mg EDAC und 30 mg NHS bei Raumtemperatur am Magnetrührer bei 600 rpm zwei Stunden lang inkubiert.

Die überschüssigen Kopplungsreagentien werden mittels Diafiltration entfernt. Dazu wird die Suspension zunächst auf 20 ml konzentriert, danach mit 80 ml 20 mM Hepes/NaOH Puffer pH 7,4 mit 0,1 % bzw. 0,01 % Pluronic verdünnt und wieder auf 20 ml eingengt.

Die gewaschenen Nanosphären werden in einem 50 ml Greiner Reaktionsgefäß mit einer Lösung aus 450 mg Ethylendiamin dihydrochlorid und 140 µl Ethylendiamin in 5,0 ml Aqua destillata versetzt. Es wird ein großer Überschuss an Ethylendiamin eingesetzt, um zu verhindern, dass ein Molekül Ethylendiamin mit zwei Aktivestern reagiert. Da Ethylendiamin basisch reagiert, würde das Reaktionsgemisch alkalisch und damit das Polymer hydrolysiert werden. Um dies zu verhindern, wird eine Mischung aus Ethylendiamin und dem entsprechenden Hydrochlorid eingesetzt. Die Kopplungsreaktion findet somit bei pH 7,4 statt und eine alkalische Hydrolyse von PLGA wird vermieden. Die Suspension wird end-over-end über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach dem Einengen der Suspension auf 20 ml wird sie in fünf Zyklen unter Zugabe von jeweils 40 ml 0,1 % bzw. 0,01 % Pluronic mittels Diafiltration gewaschen und zuletzt wieder auf 20 ml eingengt. Anschließend werden die Amino-Nanosphären mit DTPA konjugiert.

4.1.1.1.2 Protokoll B-detaillierte Beschreibung

Analog zu obigem Arbeitsprotokoll wird die Partikeloberfläche modifiziert, mit dem Unterschied, dass die Aktivierung mit EDAC und die Kopplung mit Ethylendiamin gleichzeitig stattfinden.

Zu 60 ml der mittels Doppel-emulsionstechnik hergestellten PLGA Nanosphären Suspension werden in einem Erlenmeyerkolben 720 mg EDAC zugegeben und fünf Minuten bei Raumtemperatur gerührt (600 rpm). Im Anschluss wird eine Lösung von 450 mg Ethylendiamin dihydrochlorid und 140 µl Ethylendiamin in 5 ml Aqua destillata zugesetzt und der pH-Wert kontrolliert. Er beträgt nach Zugabe der Reagentien etwa pH 7,4. Anschließend wird über Nacht bei Raumtemperatur gerührt (600 rpm).

Die Reinigung der Partikelsuspension erfolgt wie bei Protokoll A durch Einengen auf 20 ml und fünf Waschzyklen mit jeweils 40 ml 0,1 % bzw. 0,01 % Pluronic. Abschließend wird auf 20 ml eingengt.

25

4.1.1.1.3 Protokoll C-detaillierte Beschreibung

Die Nanosphären werden wie bei Protokoll A mit EDAC und NHS aktiviert und gewaschen. Statt Ethylendiamin wird eine Lösung aus 600 mg Lysin HCl in 5 ml Aqua destillata eingesetzt. Die weiteren Schritte erfolgen wie bei Protokoll A beschrieben.

4.1.1.2 Schritt 2 – Kopplung mit DTPA

Um den Komplexbildner DTPA an der Partikeloberfläche zu immobilisieren, wurden die freien primären Aminogruppen mit Diethylentriaminpentaessigsäure dianhydrid (DTPABA) entsprechend dem folgendem Schema derivatisiert (Abb. 15).

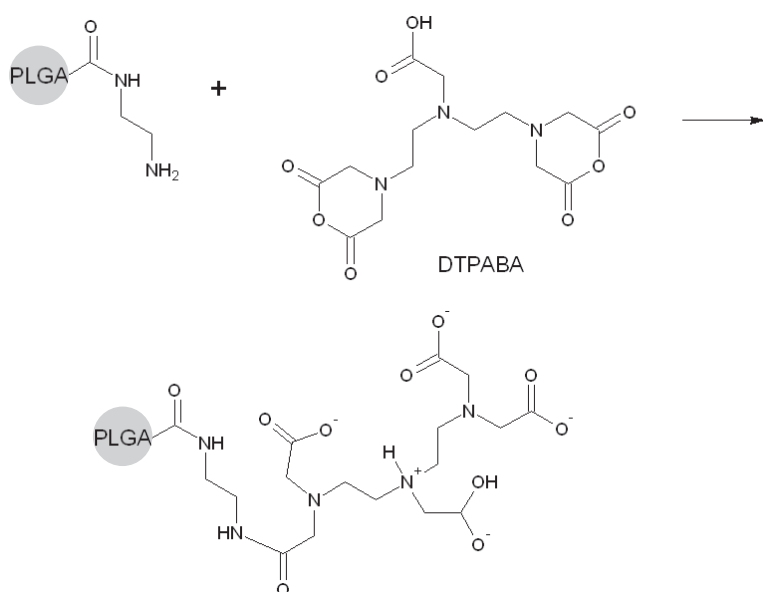
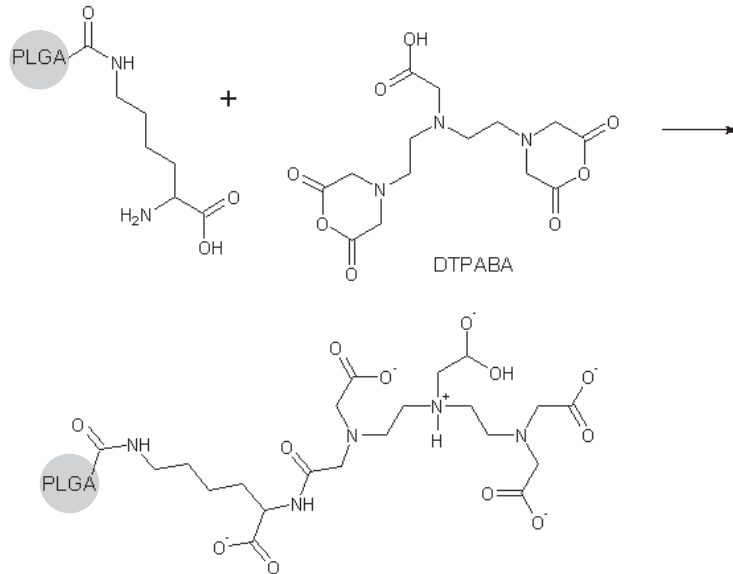


Abb. 15
Schematische Darstellung der Derivatisierung von Ethylendiamin PLGA Nanosphären mit DTPABA

Wurde bei der Carbodiimid-Kopplung Lysin als Reaktionspartner verwendet, so verläuft die Kopplung mit DTPA ab wie in Abb. 16 dargestellt.

Abb. 16
Schematische Darstellung der Derivatisierung von Lysin PLGA Nanosphären mit DTPABA



26

Säureanhydride reagieren mit primären Aminen unter Ausbildung einer kovalenten Bindung. Dafür müssen die Aminogruppen undissoziiert vorliegen, weshalb das pH-Optimum der Reaktion im alkalischen Bereich liegt. Durch geringste Spuren von Wasser werden Säureanhydride hydrolysiert und die Carboxylgruppen freigesetzt. Die freien Carboxylgruppen können nicht mehr mit den Aminogruppen zum Amid reagieren. Außerdem sinkt der pH in den sauren Bereich.

Angelehnt an die Methode von Paschkunova-Martic et al. wurde ein großer Überschuss an DTPABA eingesetzt (12). Dieses wurde in hoher Konzentration in wasserfreiem Dimethylsulfoxid (DMSO) suspendiert. Die Menge an DMSO wurde bewusst gering gehalten, da PLGA in DMSO löslich ist und ein Auflösen der Nanosphären vermieden werden sollte. Unter ständiger pH-Kontrolle und heftigem Rühren wurde die Nanopartikelsuspension abwechselnd mit NaOH auf etwa pH 9 gestellt und anschließend wurde in kleinen Portionen rasch DTPABA zugesetzt. Die Nanopartikel sollten dem hohen pH-Wert nur möglichst kurz ausgesetzt werden.

In der Praxis wurde folgendermaßen vorgegangen: Die durch Koppeln von Ethylendiamin bzw. Lysin erhaltenen gewaschenen Aminonanosphären (siehe Kapitel 4.1.1.1) werden in einem 50 ml Erlenmeyerkolben am Magnetrührer bei Raumtemperatur heftig gerührt. 90 mg DTPABA wurden in 120 µl wasserfreiem DMSO suspendiert. Der pH-Wert der Nanosphären Suspension wird mit NaOH auf etwa pH 9 eingestellt. Unter Rühren wird abwechselnd 10 µl DTPABA-Suspension zugegeben und der pH-Wert mit etwa 50 µl 1 M NaOH wieder auf pH 9 eingestellt. Nach Zugabe der gesamten DTPABA-Menge wird der pH-Wert der Partikelsuspension auf 7,4 eingestellt. Nach weiteren 15 Minuten Rühren bei Raumtemperatur wird die Suspension mittels Diafiltration zuerst auf 20 ml eingengt und dann in fünf Zyklen unter Zugabe von jeweils 40 ml 0,1 % bzw. 0,01 % Pluronic-Lösung diafiltriert. Nach dem letzten Waschschritt werden die DTPA Nanosphären wieder auf 20 ml eingengt.

4.1.1.3 Schritt 3 – Beladen der DTPA-Nanopartikel mit Gadolinium

Zum Beladen der DTPA- Nanosphären mit Gadolinium wurde eine Nitri- loessigsäuregadolinat-Lösung ($\text{Gd}(\text{NTA})_2\text{Na}_3$) verwendet. Da DTPA eine höhere Komplexaffinität zu Gadolinium besitzt als NTA, wird Gadolinium aus dem NTA Komplex freigesetzt und durch DTPA komplexiert.

Der Gadolinium Komplex kann bei Einsatz von Ethylendiamin-Nanopartikeln wie in Abb. 17, bei Verwendung von Lysin-Nanopartikeln wie in Abb. 18 schematisch dargestellt werden.

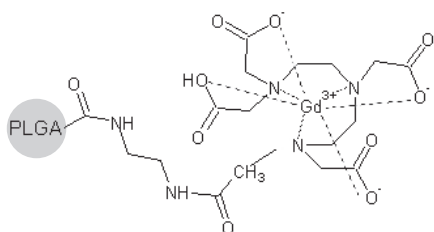


Abb. 17
Schematische Darstel-
lung des Gadolinium
Komplexes mit DTPA
Ethylendiamin Nano-
sphären

27

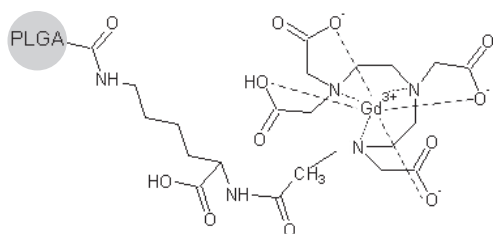


Abb. 18
Schematische Darstel-
lung des Gadolinium
Komplexes mit DTPA
Lysin Nanosphären

4.1.1.3.1 Herstellung der $\text{Gd}(\text{NTA})_2\text{Na}_3$ -Lösung

In Abwandlung der Methode von Paschkunova-Martic et al. 2005 wurde Gadoliniumoxid (Gd_2O_3) in siedender Salzsäure zum Gadoliniumchlorid (GdCl_3) umgesetzt [12]. Nach Zugabe von Nitrilotriessigsäure-Trinatriumsalz (Na_3NTA) und Einstellen des pH-Wertes auf 6,0 bildet sich ein Gadolinium-NTA-Komplex ($\text{Gd}(\text{NTA})_2\text{Na}_3$).

2,10 g Gadoliniumoxid (Gd_2O_3) wurden in einem 100 ml-Rundkolben in 12 ml HCl 37 % suspen- diert. Unter dem Abzug wurde das Reaktionsgemisch unter Rückflusskühlung und ständigem Rühren in einem Siliconölbad zum Sieden erhitzt. Im Zuge der Umsetzung zum wasserlöslichen Gadoliniumchlorid (GdCl_3) wurde die Lösung klar. Anschließend wurde das Heizbad entfernt, und über den Kühler wurden 50 ml Aqua bidestillata zugetropft. Die resultierende Lösung war handwarm und klar. Nach Entfernen des Kühlers wurde bei Raumtemperatur weitergerührt. Anschließend wurden 9,50 g (Na_3NTA) zugegeben, wodurch es zu einer Trübung kam. Durch Einstellen des pH-Wertes mit NaOH auf pH 6,0 wurde die Lösung klar. Zum Schluss wurde mit Aqua bidestillata auf 100,0 ml aufgefüllt.

Die resultierende Lösung enthält 115,9 mMol/l Gadolinium. Dies entspricht 18,219 mg Gadolini- um pro ml.

4.1.1.3.2 Beladen der Nanopartikel mit Gadolinium

Die Gadolinium Beladung erfolgt durch Zugabe von 720 μl $\text{Gd(NTA)}_2\text{Na}_3$ -Lösung zu den gewaschenen DTPA-Nanosphären (siehe Kapitel 4.1.1.2) und anschließender Inkubation (end-over-end) bei Raumtemperatur über Nacht.

Um die Gadolinium-Nanosphären Suspension von überschüssigen Reagentien zu reinigen, wird sie wieder mittels Diafiltration zuerst auf 20 ml eingeeengt, anschließend in sieben Zyklen unter Zugabe von je 40 ml 0,1 % bzw. 0,01 % Pluronic-Lösung gewaschen und zuletzt auf 20 ml aufkonzentriert.

4.1.2 Gadolinium Einbau in Partikel aus unmodifiziertem PLGA

Gadolinium-Chelate wurden bei der Partikelherstellung mittels Doppel-emulsionstechnik (siehe Kapitel 3.1) in der PLGA Matrix eingebaut. Dazu wurden als innere wässrige Phase 400 μl $\text{Gd(NTA)}_2\text{Na}_3$ -Lösung (7,29 mg Gadolinium), 400 μl Magnevist® Injektionslösung (31,45 mg Gadolinium), oder 92,7 μl Magnevist® in 307,3 μl Aqua destillata (7,29 mg Gadolinium) eingesetzt. Es wurden jeweils PLGA Partikel mit und ohne Zusatz von 10 % NaCl in der äußeren wässrigen Phase hergestellt, um zu überprüfen, ob die Einbaurate dadurch verändert wird. Die Reinigung der Gadolinium-Nanosphären Suspension erfolgte mittels Diafiltration. Zunächst wurden 90 ml Suspension auf 30 ml eingeeengt und dann in sieben Zyklen unter Zugabe von jeweils 60 ml 0,1 % Pluronic-Lösung diafiltriert. Nach dem letzten Waschschrift wurde die Nanosphären Suspension wieder auf 30 ml eingeeengt.

4.1.3 Gadolinium Einbau in Partikel aus DTPA-modifiziertem PLGA

Neben der Immobilisierung von Gadolinium-Chelaten an der Oberfläche und dem Einbau in unmodifizierte PLGA Nanosphären wurde ein weiterer Ansatz verfolgt, bei dem der Komplexbildner DTPA kovalent an die Carboxylgruppe des PLGA gebunden wurde. Anschließend wurden aus dem modifizierten Polymer mit Hilfe einer modifizierten Solvent Evaporation Technik (siehe Kapitel 3.1) Nanopartikel hergestellt. Die Komplexierung von Gadolinium erfolgte entweder durch Verwendung von $\text{Gd(NTA)}_2\text{Na}_3$ -Lösung als innere wässrige Phase bei der Partikelherstellung oder durch nachträgliche Inkubation der Nanosphären aus DTPA-PLGA mit $\text{Gd(NTA)}_2\text{Na}_3$ -Lösung.

4.1.3.1 Herstellung von DTPA-modifiziertem PLGA (DTPA-PLGA)

4.1.3.1.1 Vorversuche

Um die Herstellung von modifiziertem PLGA zu gewährleisten, muss ein Lösungsmittel für die verwendeten Reagentien gefunden werden, das einfach abtrennbar ist und somit keinen Einfluss auf die Herstellung der Nanosphären hat. Im vorliegenden Fall ist ein derartiges Lösungsmittel sowohl für PLGA als auch DTPABA notwendig.

Die Eignung von Aceton, Dioxan, Dimethylsulfoxid (DMSO) und Tetrahydrofuran (THF) wird anhand der Löslichkeit von 10 mg DTPABA bzw. 10 mg PLGA in 4 ml des jeweiligen Lösungsmittels untersucht.

Weiters wird untersucht, ob die beiden Substanzen durch Zugabe von Ether wieder ausfällbar sind, und somit ein einfacher Trennungsschritt durch Fällung möglich ist. Da das Polymer aus einer Lösung von 10 mg PLGA in 100 µl Lösungsmittel mit einem fünffachen Überschuss an Ether ausgefällt wurde, ist eine Abtrennung durch Fällung möglich (Tab. 2).

Lösungsmittel	PLGA	DTPABA	Siedepunkt [°C]
Aceton	+	-	56
Dioxan	+	-	101
DMSO	+	+	189
THF	+	-	65

Tab. 2
Löslichkeit von PLGA
und DTPABA in ver-
schiedenen Lösungs-
mitteln

+ löslich, Trennung mittels Fällungsreaktion möglich
- nicht löslich

29

Die Löslichkeit betreffenden Vorversuche zeigten, dass DTPABA nur in DMSO löslich ist. Frühere Versuche haben jedoch gezeigt, dass bei Anwesenheit, auch von Spuren an DMSO die Nanopartikelherstellung mittels Solvent Evaporation Technik nicht möglich ist. DMSO als Lösungsvermittler beeinflusst die Grenzflächen der Doppelemulsion bei der Partikelherstellung und es entstehen sehr kleine, instabile Partikel mit hohem Polydispersitätsindex.

Zusätzlich schließen die Glasübergangstemperatur von PLGA von ca. 40°C und der Siedepunkt von DMSO bei 189°C das Entfernen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer aus. Daher wurde versucht, DMSO durch Umkristallisieren zu entfernen.

Dazu wurden 400 mg PLGA in 4 ml DMSO gelöst und anschließend durch Zugabe von insgesamt 40 ml Ether unter Rühren ausgefällt. Die Lösungsmittel wurden dekantiert und der restliche Ether wurde im Rotationsverdampfer unter Vollvakuum bei Raumtemperatur entfernt (30 Min.). Der Rückstand wurde in 8 ml Dichlormethan aufgenommen und im Scheidetrichter zehnmal mit 8 ml Wasser ausgeschüttelt, da DMSO im Unterschied zu PLGA wasserlöslich ist. Schließlich wurde nach Entfernung von Dichlormethan über Nacht gefriergetrocknet, um Wasserspuren zu entfernen.

Anschließend wurde aus einem Teil modifiziertem PLGA und einem Teil unmodifiziertem PLGA mittels Doppelemulsionstechnik (siehe Kapitel 3.1) Nanopartikel hergestellt. Die anschließende Bestimmung von Größe (140 ± 8 nm, Pdl: 0,130) und Zetapotential ($-22,1 \pm 0,9$ mV) zeigte ähnliche Ergebnisse wie die Herstellung aus nicht vorbehandeltem PLGA.

Die Umkristallisation ist daher zur Abtrennung von DMSO geeignet. Aufgrund der Löslichkeit von PLGA und DTPABA sowie der Möglichkeit zur Reinigung des Produkts mittels Fällung mit Diethylether und Umkristallisation aus Dichlormethan wurden Dichlormethan und Dimethylsulfoxid als Lösungsmittel ausgewählt.

4.1.3.1.2 Darstellung von DTPA-PLGA

Zur Modifizierung des Polymers werden 1,0 g PLGA in 10 ml wasserfreiem Dichlormethan gelöst. Anschließend werden mit wasserfreiem Dichlormethan eine 2,5 mg/ml NHS-Stammlösung und eine 10 mg/ml Dicyclohexylcarbodiimid (DCC)-Stammlösung hergestellt.

2,65 ml der NHS-Stammlösung und 1,65 ml der DCC-Stammlösung werden dem gelösten PLGA zugesetzt und drei Stunden unter Verwendung eines Trockenrohres mit wasserfreiem Calciumsulfat bei Raumtemperatur unter dem Abzug gerührt. Das Reaktionsgemisch wird einer Lösung von 17,8 µl ED in 5 ml wasserfreiem Dichlormethan zugetropft und über Nacht unter Feuchtigkeitsausschluss bei Raumtemperatur gerührt. Das Reaktionsprodukt wird mit 70 ml kaltem Diethylether gefällt. Um die Ausfällung zu unterstützen, wird die Mischung drei Stunden bei 4°C gelagert. Das Lösungsmittelgemisch wird dekantiert, der Niederschlag mit wenig Diethylether gewaschen und schließlich unter Vollvakuum bei Raumtemperatur drei Stunden im Rotationsverdampfer getrocknet. 350 mg des so entstandenen weißen, schaumartigen ED-PLGA werden mit einer Lösung aus 35 mg DTPA in 7 ml DMSO unter Feuchtigkeitsausschluss bei Raumtemperatur über Nacht gerührt.

Nach langsamen zusetzen von 63 ml Diethylether unter Rühren wird das Reaktionsgemisch bei 4°C über Nacht gelagert und danach die flüssige Phase dekantiert. Der Rückstand wird mit 7 ml Diethylether gewaschen, dekantiert und 30 Minuten bei Raumtemperatur unter Vollvakuum eingedampft. Der Rückstand wird in 14 ml Dichlormethan aufgenommen und zehnmal mit je 14 ml Aqua destillata im Scheidetrichter ausgeschüttelt. Volumensverluste an organischer Phase werden jeweils durch erneuten Zusatz von Dichlormethan kompensiert. Um das Produkt zu trocknen wird zunächst am Rotationsverdampfer Dichlormethan entfernt (zwei Stunden, Raumtemperatur, Vollvakuum) und dann über Nacht lyophilisiert, um das restliche Wasser zu entfernen.

4.1.3.1.3 Charakterisierung von DTPA-PLGA mittels FT-IR

Von den Ausgangsprodukten PLGA, Ethylendiamin und DTPABA sowie vom Zwischenprodukt ED-PLGA und dem Endprodukt DTPA-ED-PLGA wurden mittels FT-IR Spektren aufgenommen. Zum Vergleich wurden physikalische Mischungen der jeweiligen Reagentien analysiert. Auf diese Weise sollte nachgewiesen werden, ob die Synthese erfolgreich war und kovalente Bindungen entstanden sind.

Zur Probenvorbereitung wurden jeweils 1 mg bzw. 1 µl Substanz in 100 µl Aceton gelöst. Zuerst wurden Spektren von PLGA aufgenommen. Die Kopplung sollte an der endständigen Carboxylgruppe der verwendeten PLGA Resomer® RG 503 H erfolgen. Um die durch diese funktionelle Gruppe verursachte Bande im Spektrum zu lokalisieren, wurde zum Vergleich ein Spektrum von Resomer® RG 503 aufgenommen. Die beiden PLGA Modifikationen unterscheiden sich hinlänglich ihrer endständigen Carboxylgruppe, die nur das Resomer® RG 503 H aufweist. Weiters wird das Zwischenprodukt ED-PLGA sowie eine physikalische Mischung äquimolarer Mengen an Resomer® RG 503 H und Ethylendiamin in Aceton gemessen. Schlussendlich wurde DTPA-PLGA vermessen.

In Abb. 19 (siehe Anhang) ist ein Vergleich zwischen Resomer® RG 503 H, mit endständiger Carboxylgruppe und Resomer® RG 503, ohne endständiger Carboxylgruppe zu sehen. Es ist deutlich eine starke Carbonylbande $\nu = 1766 \text{ cm}^{-1}$ (s, C=O) erkennbar. Bei $\nu = 1561 \text{ cm}^{-1}$ ist eine

schwache Bande sichtbar, die nur beim Polymer mit endständigen Carboxylgruppe auftritt (RG 503 H). Aufgrund der Komplexität des Polymers lässt sich aber nicht eindeutig zuordnen. Die strukturellen Unterschiede der Polymere sind im FT-IR nicht deutlich darstellbar. Die freie Carboxylgruppe als Angriffspunkt für die Derivatisierung ist somit im Spektrum nicht eindeutig zu erkennen.

Abb. 20 (siehe Anhang) zeigt ein Spektrum einer äquimolaren, physikalischen Mischung aus Resomer® RG 503 H und Ethylendiamin (PLGA+ED) und Ethylendiamin, das kovalent an Resomer® RG 503 H gebunden ist (PLGA-ED). Es soll untersucht werden, ob die Bindung zwischen Resomer® RG 503 H und Ethylendiamin kovalenter Natur ist. Im Spektrum von ED-PLGA sind die N-H Valenzschwingung $\nu = 3415 \text{ cm}^{-1}$ (w, N-H) und die C-H Valenzschwingung $\nu = 3003 \text{ cm}^{-1}$ (w, C-H) sichtbar. Im Spektrum der physikalischen Mischung aus Resomer® RG 503 H und Ethylendiamin hingegen sind die Schwingungen der freien O-H Gruppen $\nu = 1714 \text{ cm}^{-1}$ und der endständigen Aminogruppen $\nu = 1769 \text{ cm}^{-1}$ erkennbar.

31

Abb. 21 (siehe Anhang) stellt DTPABA, Ethylendiamin kovalent gebunden an Resomer® RG 503 H (PLGA-ED) und das Kopplungsprodukt aus beiden dar (PLGA-ED-DTPA). Es sollten die ausgebildeten kovalenten Bindungen zwischen Ethylendiamin und DTPABA nachgewiesen werden [9].

Aufgrund der Komplexität der derivatisierten Moleküle ist es jedoch nicht gelungen, die einzelnen Kopplungsschritte der Polymermodifikation mittels FT-IR zu dokumentieren. Dies soll Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

4.1.3.2 Herstellung von Nanosphären aus DTPA-ED-PLGA

Unter Einsatz von 200 mg DTPA-ED-modifiziertem PLGA und 200 mg unmodifiziertem PLGA werden Nanosphären nach Doppelmulsionstechnik (siehe Kapitel 3.1) hergestellt.

Die Gadolinium Beladung erfolgte auf zwei Wegen: einerseits wurden die PLGA Nanosphären mit $720 \mu\text{l Gd(NTA)}_2\text{Na}_3$ inkubiert (Probe 10). Hierzu wurden 20 ml der Nanosphären Suspension bei Raumtemperatur über Nacht end-over-end in Bewegung gehalten.

Andererseits wurden bei der Herstellung der PLGA Nanosphären $400 \mu\text{l Gd(NTA)}_2\text{Na}_3$ als innere wässrige Phase eingesetzt (Probe 11).

Zur Reinigung der Gadolinium-Nanosphären wurde die Suspension mittels Diafiltration auf 20 ml eingeeengt und in sechs Zyklen unter Zugabe von jeweils 40 ml 0,1 % Pluronic-Lösung diafiltriert. Nach dem letzten Waschschrift wurde die Suspension wieder auf 20 ml eingeeengt.

4.1.4 Inkubation von unmodifizierten PLGA Nanosphären mit $\text{Gd(NTA)}_2\text{Na}_3$

Zur Einschätzung der zumindest theoretischen Möglichkeit, dieses Kontrastmittel auch durch freie Carboxylgruppen an der Oberfläche zu komplexieren, sollte der folgende Versuch dienen. Um dies aufzuklären, wurde die PLGA Nanosphären Suspension mit $\text{Gd(NTA)}_2\text{Na}_3$ bei zwei unterschiedlichen Inkubationszeiten durchgeführt. Bei Probe 12 ist ein Tag inkubiert worden, drei Tage hingegen bei Probe 13.

Es wurden PLGA Nanosphären mittels Solvent Evaporation Technik hergestellt (siehe Kapitel 3.1) und 60 ml dieser Suspension durch Diafiltration in vier Zyklen gewaschen und auf 20 ml eingengt. Die verbleibende PLGA Nanosphären Suspension wird mit 720 μl $\text{Gd}(\text{NTA})_2\text{Na}_3$ end-over-end bei Raumtemperatur inkubiert. Nach den entsprechenden Inkubationszeiten von 24 Stunden oder 72 Stunden wird die Nanosphären Suspension durch Diafiltration von überschüssigen Reagentien gereinigt. In sieben Zyklen wird unter Zugabe von je 40 ml 0,1 % Pluronic-Lösung gewaschen, und zuletzt auf 20 ml aufkonzentriert.

4.2 Zetapotential und Größe

Die Messung des Zetapotentials wird zur Charakterisierung der Oberflächenmodifikation der PLGA Nanosphären eingesetzt. Hierfür wird nach dem jeweiligen Kopplungsschritt das Zetapotential als Mittelwert aus drei Messergebnissen bestimmt, wobei jedes Messergebnis einen Mittelwert aus 15 Einzelbestimmungen darstellt. Werte, die aufgrund zu geringer Konzentration oder Agglomeration den Qualitätskriterien nicht entsprechen, werden außer Acht gelassen.

Die Größenmessung basiert auf der dynamischen Lichtstreuung. Der Polydispersitätsindex, der die Breite der Größenverteilung angibt, wird aus den Messwerten automatisch errechnet. Analog zum Zetapotential wird zwischen den einzelnen Kopplungsschritten die Größe der PLGA Nanosphären als Mittelwert aus drei Messergebnissen bestimmt, wobei jedes Messergebnis wieder aus 15 Einzelbestimmungen resultiert.

4.2.1 PLGA-Nanopartikel mit Gadolinium-Chelat modifizierter Oberfläche

4.2.1.1 Zetapotential

Die Oberflächenladung der Partikel wird durch die Präsenz von Ionen in der Probe stark beeinflusst, da Gegenionen die Oberflächenladung der Partikel umgeben. Ein Maß für die Ionenkonzentration der Probe ist die Leitfähigkeit, die gleichzeitig bestimmt wird.

Die Oberflächenladungsdichte hat einen starken Einfluss auf das Zetapotential. Um die tatsächlichen Zetapotentiale zu erfassen, sollte die Probe grundsätzlich in einem ionenarmen Medium vorliegen. Um dies zu erreichen, kann die Suspension entweder vielfachen Waschzyklen unterworfen werden oder die Partikelsuspension entsprechend verdünnt werden. Da die zeitintensiven Waschzyklen die einzelnen Kopplungsschritte qualitativ und quantitativ beeinflussen, wurden in der vorliegenden Arbeit Messreihen mit verdünnten Partikelsuspensionen erstellt. Bei Verdünnungen mit Aqua destillata können jedoch Instabilitäten auftreten, sobald die sterische Stabilisierung zu gering ist. Um derartige Effekte zu umgehen wurde mit einer 0,1 % Pluronic® F68 Lösung verdünnt. Bei zu starker

Verdünnung ist die Partikelkonzentration für eine Messung jedoch nicht mehr ausreichend.

Somit muss ein Kompromiss gefunden werden, der einerseits eine möglichst genaue Aussage über die Oberflächenladung liefert, andererseits aber die Stabilität der PLGA Nanosphären Suspension nicht gefährdet.

Die Modifikation der Partikeloberfläche wird anhand drei unterschiedlicher Herstellungsvorschriften (siehe Kapitel 4.1.1) vollzogen. Es wird für jedes Protokoll eine Messreihe unmittelbar nach jedem Kopplungsschritt erstellt (Probe 1, 2, 3), wobei durch Verdünnen mit Aqua destillata bzw. 0,1 % Pluronic® F68 die Leitfähigkeit unter 0,05 mS/cm (Probe 1a, 2a, 3a) gesenkt wird. Die Messergebnisse ändern sich stark in Abhängigkeit der Leitfähigkeit (Tab. 3). Bei höherer Leitfähigkeit liegen mehr Ionen vor, die die Oberflächenladung neutralisieren und dadurch zu niedrigeren Zetapotentialen führen.

Vor Beginn der Oberflächenmodifikation liegt das Zetapotential der Nanosphären Suspension aufgrund der negativ geladenen Carboxylgruppen bei $-26,5 \pm 0,4$ mV.

Nach der Kopplung mit Ethylendiamin an den Aktivester wäre theoretisch ein stark positives Zetapotential zu erwarten. Eine Aminogruppe von ED bildet unter Abspaltung von NHS eine kovalente Bindung zu PLGA aus, wohingegen die zweite Aminogruppe frei vorliegt. Die gemessenen Werte zeigen jedoch nur eine Tendenz zu weniger negativen Werten auf. Das Zetapotential sinkt von $-26,5 \pm 0,4$ mV auf $-20,9 \pm 1,8$ mV.

Wird anstelle von Ethylendiamin mit Lysin als Aminokomponente eingesetzt, ist eine Tendenz zu neutralen Werten zu erwarten, da die Ladungen der freien Aminogruppe und der freien Carboxylgruppe des Lysins sich gegenseitig aufheben sollten. Das Zetapotential sinkt von $-26,5 \pm 0,4$ mV auf $-23,0 \pm 0,3$ mV. Wie erwartet bewirkt im Vergleich zu ED-PLGA-Nanosphären die zusätzliche Präsenz der freien Carboxylgruppen in Lysin-PLGA eine geringere Abnahme des Zetapotentials.

Nach Kopplung mit DTPA wäre ein stark negatives Zetapotential zu erwarten, da eine Carboxylgruppe von DTPA an die Ethylendiamin-PLGA modifizierte Oberfläche des Partikels bindet und zusätzlich noch vier freie Carboxylgruppen vorliegen. Tatsächlich konnte ein stärker negatives Zetapotential zwischen $-30,3 \pm 0,9$ mV und $-41,1 \pm 0,1$ mV beobachtet werden.

Nach der Inkubation mit Gadolinium lag das Zetapotential zwischen $-41,3 \pm 1,9$ mV und $-28,4 \pm 0,8$ mV.

Aufgrund der Verdünnung konnten aussagekräftige Zetapotentiale ermittelt werden. Insgesamt sind die Änderungen des Zetapotentials allerdings nicht so stark ausgeprägt wie erwartet. Zusätzlich wurde die Leitfähigkeit bei allen Messungen relativ konstant (unter 0,05 mS/cm) gehalten, es ist aber unmöglich, die Messungen bei exakt der gleichen Leitfähigkeit durchzuführen. Anhand der Verdünnungsreihen wird jedoch deutlich, welchen Einfluss geringste Änderungen der Leitfähigkeit bewirken. Bei 0,149 mS/cm beträgt das Zetapotential $-28,9 \pm 1,1$ mV, hingegen bei 0,017 mS/cm wird ein Zetapotential von $-41,3 \pm 1,9$ mV beobachtet.

Tab. 3
Zetapotential und
Leitfähigkeit von
PLGA-Partikeln mit
Gadolinium-Chelat
modifizierter Ober-
fläche

Probe	Protokoll	vor Modifikation		nach Aminokomponente		nach DTPA		nach Gd	
		Zeta Potential	Leitfähigkeit	Zeta Potential	Leitfähigkeit	Zeta Potential	Leitfähigkeit	Zeta Potential	Leitfähigkeit
		(mV)	(mS/cm)	(mV)	(mS/cm)	(mV)	(mS/cm)	(mV)	(mS/cm)
1	A	-24,3±0,4	0,042±0,004	-8,0±0,5	0,532±0,010	-23,2±0,6	0,460±0,009	-28,9±1,1	0,149±0,001
1a	Verdünnungsreihe A	-26,5±0,4	0,018±0,002	-23,9±0,6	0,027±0,007	-30,3±0,9	0,025±0,006	-41,3±1,9	0,017±0,004
2	B	-24,3±0,4	0,042±0,004	-4,5±0,7	0,648±0,008	-17,7±0,2	0,377±0,008	-18,8±0,2	0,164±0,002
2a	Verdünnungsreihe B	-26,5±0,4	0,018±0,002	-20,9±1,8	0,048±0,005	-41,1±0,1	0,024±0,005	-36,0±1,4	0,026±0,005
3	C	-24,3±0,4	0,042±0,004	-17,8±0,2	0,195±0,001	-21,7±0,5	0,440±0,008	-25,9±0,5	0,141±0,001
3a	Verdünnungsreihe C	-26,5±0,4	0,018±0,002	-23,0±0,3	0,028±0,003	-32,8±0,1	0,032±0,006	-28,4±0,8	0,026±0,008

Da die Charakterisierung der Kopplungsschritte bei der Oberflächenmodifikation von PLGA Nanosphären zwar tendenziell durch das Zetapotential bestätigt werden, aber die Messergebnisse nicht sehr ausgeprägt sind, ist die Erfassung zusätzlicher Parameter für eine erfolgreiche Charakterisierung nötig.

4.2.1.2 Größe

Durch die Derivatisierung der Oberfläche können sich Größe und Pdl der Nanopartikel verändern. Durch Bindung niedermolekularer Liganden wie ED und DTPA ist eine messbare Größenänderung zwar nicht zu erwarten, aber es kann zu Beeinträchtigungen der Stabilität kommen, die sich in einer Größenzunahme und Erhöhung des Pdl manifestiert. Bei der Größenmessung mittels DLS muss der Gehalt an Pluronic® F68 berücksichtigt werden (10). Der hydrophobe Molekülteil von Pluronic® F68 lagert sich an der Partikeloberfläche an, während die hydrophilen Polyethylenoxidketten in das Dispersionsmedium hineinragen. Die mechanische Barriere, die so entsteht besitzt eine Schichtdicke von bis zu 7 nm (6). Zusätzlich zur direkten Anlagerung beeinflusst Pluronic® F68 die Viskosität des Dispersionsmediums. Die Viskosität spielt bei der Größenmessung, die auf der dynamischen Lichtstreuung basiert eine entscheidende Rolle, und bereits geringe Änderungen der Viskosität des Dispersionsmediums bewirken nennenswerte Änderungen bei den Messergebnissen (10). Mit steigender Pluronic® F68 Konzentration nimmt die Viskosität des Mediums zu und das Partikel scheint größer zu sein, als es tatsächlich ist, da die Brown'sche Beweglichkeit behindert wird.

Falls die Viskosität des Dispersionsmediums bekannt ist, kann diese als Faktor bei der Auswertung berücksichtigt werden. Da eine genaue Viskositätsbestimmung während der Messung nicht möglich war, wurde stattdessen durch Verdünnen mit Wasser versucht, den Einfluss von Pluronic® F68 zu reduzieren. Allerdings muss auch hier auf die

Stabilität Rücksicht genommen werden, die unmittelbar von der Pluronic® F68 Konzentration abhängig ist.

Aufgrund der eingesetzten Mengen bei der Herstellung mittels Doppelemulsionstechnik liegt die Pluronic® F68 Konzentration direkt nach der Herstellung bei ca. 1,6 %. Im Verlauf des Derivatisierungsprozesses nimmt die Pluronic® F68 Konzentration durch die Reinigung im Diafiltrationssystem ab.

Bei der Größenbestimmung wird der Einfluss der Modifikation der Partikeloberfläche auf die Volumensverteilung untersucht, wobei die Derivatisierung anhand von drei unterschiedlichen Herstellungsvorschriften erfolgt. Für jede Herstellungsvorschrift wird eine Messreihe, die unmittelbar nach einem Kopplungsschritt erstellt wird, mit einer Messreihe verglichen, wo die Proben 1:100 mit Aqua destillata verdünnt werden (Tab. 4).

35

Probe	Protokoll	vor Modifikation		nach Aminokomponente		nach DTPA		nach Gd	
		Grösse (nm)	PDI	Grösse (nm)	PDI	Grösse (nm)	PDI	Grösse (nm)	PDI
1	A	177±2	0,127±0,006	162±1	0,120±0,024	168±6	0,113±0,013	163±3	0,136±0,019
1a	Verdünnungsreihe A	118±1	0,111±0,008	113±4	0,130±0,011	117±3	0,131±0,159	122±3	0,123±0,020
2	B	177±2	0,127±0,006	232±4	0,144±0,022	222±3	0,124±0,024	222±1	0,133±0,006
2a	Verdünnungsreihe B	118±1	0,111±0,008	114±1	0,130±0,131	132±4	0,128±0,021	130±0	0,118±0,007
3	C	177±2	0,127±0,006	181±7	0,138±0,005	168±2	0,144±0,008	123±69	0,136±0,002
3a	Verdünnungsreihe C	118±1	0,111±0,008	113±1	0,123±0,008	114±2	0,118±0,006	114±5	0,132±0,026

An dieser Stelle sollen nun stellvertretend die Messergebnisse nach Protokoll A erläutert werden. Die Messreihe der unverdünnten Proben zeigt, dass die PLGA Nanosphären vor Beginn der Modifikation eine Grösse von 177 ± 2 nm bei einem Polydispersitätsindex von $0,127 \pm 0,006$ besitzen, bereits nach der Kopplung mit Ethylendiamin sinkt der Wert auf 162 ± 1 nm (PDI: $0,120 \pm 0,024$) und bleibt in diesem Bereich.

Im Gegensatz dazu ergaben die Messungen der mit Aqua destillata verdünnten Partikelsuspensionen und damit bei geringerer Viskosität vor Beginn der Derivatisierung eine Grösse von 118 ± 1 nm (PDI: $0,111 \pm 0,008$). Die Einführung von Aminoethylresten an der Oberfläche durch Kopplung mit ED führt wie erwartet zu keiner Änderung der Partikelgrösse, wie der Messwert von 113 ± 4 nm (PDI: $0,130 \pm 0,011$) zeigt.

Vergleicht man die Ergebnisse der Gröszenmessung der unverdünnten Proben mit den verdünnten, so ist bei allen Messungen deutlich zu erkennen, welchen Einfluss die Pluronic® F68 Konzentration auf das Messergebnis hat. Die Abnahme der Grösse bei den unverdünnten Proben dürfte allein auf die Reduktion des Pluronic-Gehaltes durch Wasser zurückzuführen sein. Der Polydispersitätsindex als Maß für die Verteilung der Partikelgrösse liegt zwischen 0,111 und 0,132. Somit ist die Stabilität während der Kopplung gewährleistet und es treten keine Agglomerationen auf.

Die Messergebnisse belegen weiters, dass niedermolekulare Liganden an der Oberfläche der PLGA Nanopartikel, die durch die Kopplungsschritte immobilisiert werden, wie erwartet keine Gröszenänderung bewirken. Wäre dies der Fall, würde sich die Grösse der PLGA Nanopartikel an der Grösse der Kopplungsreagentien orientieren. Die Kopplungsreagentien spielen eine vernachlässigbare Rolle bei der Bestimmung der Grösse der PLGA Nanopartikel.

Es ist somit gelungen, die Pluronic® F68 Konzentration für die Gröszenmessung durch Verdün-

Tab. 4
Volumensdurchmesser und PDI von PLGA-Partikeln mit Gadolinium-Chelat modifizierter Oberfläche

nung soweit zu reduzieren, dass einerseits die Stabilität gewahrt wurde, andererseits aber die Größenmessung der tatsächlichen Größe der Partikel so nah wie möglich kommt. Umgekehrt zeigen die Größenbestimmungen innerhalb einer Reihe auch, dass die Pluronic® F68 Konzentration durch zwischengeschaltete Reinigungsschritte abnimmt und sich schließlich einpendelt.

4.2.2 Gadolinium beladene Nanopartikel aus unmodifiziertem PLGA

4.2.2.1 Zetapotential

Die Zetapotential Werte von Probe 4-9 liegen im Bereich von $-18,3 \pm 10,1$ mV bei einer Leitfähigkeit von $0,0568 \pm 0,0067$ mS/cm und bei $-37,4 \pm 1,7$ mV bei einer Leitfähigkeit von $0,0838 \pm 0,0026$ mS/cm (Tab. 5).

Tab. 5
Zetapotential und
Volumendurch-
messer von
Gadolinium beladenen
Nanopartikeln aus
nicht modifiziertem
PLGA

Probe	PLGA Nanosphären	Gd eingesetzt (mg)	Gd-Beladung ($\mu\text{g Gd/mg}$ Partikel)	nach Herstellung und Waschen			
				Zeta Potential (mV)	Leitfähigkeit (mS/cm)	Grösse (nm)	PdI
4	+ Magnevist	31,4	1,25	$-26,4 \pm 0,5$	$0,0458 \pm 0,0006$	127 ± 5	$0,159 \pm 0,004$
5	+ Magnevist + NaCl	31,4	1,44	$-37,1 \pm 0,6$	$0,0708 \pm 0,0013$	149 ± 11	$0,127 \pm 0,011$
6	+ Gd-NTA	7,29	0,11	$-30,1 \pm 1,8$	$0,0537 \pm 0,0065$	142 ± 2	$0,190 \pm 0,008$
7	+ Gd-NTA + NaCl	7,29	0,26	$-37,7 \pm 1,3$	$0,0805 \pm 0,0033$	132 ± 0	$0,123 \pm 0,012$
8	+ Magnevist äquimolar	7,29	1,05	$-18,3 \pm 10,1$	$0,0568 \pm 0,0067$	107 ± 3	$0,175 \pm 0,001$
9	+ Magnevist äquimolar + NaCl	7,29	0,62	$-37,4 \pm 1,7$	$0,0838 \pm 0,0026$	126 ± 4	$0,152 \pm 0,005$

Die in Tabelle 5 angeführten Messergebnisse zeigen auch, dass der Zusatz von NaCl zu einem deutlich negativeren Zetapotential trotz vergleichbarer Leitfähigkeit führt.

Werden 31,4 mg Gadolinium bei der Herstellung der PLGA Nanosphären eingesetzt, so beträgt das Zetapotential $-26,4 \pm 0,5$ mV bis $-37,1 \pm 1,3$ mV. Setzt man 7,29 mg Gadolinium ein, so liegen die Zetapotential Werte zwischen $-18,3 \pm 10,1$ mV und $-37,4 \pm 1,7$ mV. Somit kann eine direkte Beeinflussung des Zetapotentials durch die eingesetzten Gadolinium Menge ausgeschlossen werden.

Außerdem scheint es keinen Einfluss zu haben, ob man Magnevist® 0,5 mmol/ml Injektionslösung oder $\text{Gd(NTA)}_2\text{Na}_3$ Lösung zur Herstellung verwendet, da die ZP Werte vergleichbar sind. Bei den Versuchen zum Einbau von Gadolinium in die PLGA Partikel sind unterschiedliche Mengen an Gadolinium verwendet worden und betrugen entweder 7,29 mg oder 31,4 mg. Die mittels ICP-OES ermittelten Gadolinium Konzentrationen nach der Herstellung der Partikel liegen zwischen $0,11 \mu\text{g Gd/mg Partikel}$ und $1,44 \mu\text{g Gd/mg Partikel}$.

Weder die eingesetzten Gadolinium Mengen noch der Gadolinium Gehalt scheinen das Zetapotential zu beeinflussen, da die Werte in der gleichen Größenordnung liegen. Bei der Herstellung wurde Gadolinium einerseits in Form von Gadopentetat-Dimeglumin (Magnevist® 0,5 mmol/ml) andererseits in Form einer $\text{Gd(NTA)}_2\text{Na}_3$ Lösung in die innere wässrige Phase der PLGA Nanopartikel eingebaut. Es ist kein Zusammenhang zwischen der Form, in der Gadolinium vorliegt, und des Zetapotentials erkennbar. Somit übt der Gadolinium Gehalt keinen Einfluss auf das Zetapotential der Partikel aus.

4.2.2.2 Größe

Nach der Herstellung der Gadolinium markierten PLGA Nanosphären und der darauffolgenden Reinigung mittels Diafiltration in sieben Zyklen mit jeweils 60 ml 0,1 % Pluronic® F68 Lösung wird die Partikelgröße bestimmt. Die Größe der Partikel liegt zwischen 107 ± 3 nm und 149 ± 11 nm.

Weder NaCl, noch die eingesetzte Gadolinium Menge, noch die chemische Struktur des Gadolinium-Komplexes (Magnevist® 0,5 mmol/ml oder $\text{Gd(NTA)}_2\text{Na}_3$ Lösung) scheinen die Partikelgröße zu beeinflussen.

4.2.3 Gadolinium Nanopartikel aus DTPA-modifiziertem PLGA

37

Zur Herstellung der Partikel wird eine Mischung gleicher Gewichtsteile aus unmodifiziertem PLGA und einem mit DTPA und ED modifiziertem PLGA eingesetzt, und nach der Doppemulsionstechnik zu Nanopartikeln geformt. Gadolinium wird auf zwei unterschiedliche Weisen immobilisiert.

Einerseits werden die Partikel nach der Herstellung mit 720 μl $\text{Gd(NTA)}_2\text{Na}_3$ Lösung end-over-end über Nacht inkubiert (Probe 10). Das Ergebnis sind 59 ± 2 nm große Partikel (Pdl: $0,1293 \pm 0,0070$), die ein Zetapotential von $-32,4 \pm 1,6$ mV bei einer Leitfähigkeit von $0,0272 \pm 0,0090$ mS/cm aufweisen (Tab. 6).

Probe	Herstellung	nach Herstellung und Waschen			
		Zeta Potential (mV)	Leitfähigkeit (mS/cm)	Grösse (nm)	Pdl
10	1:1 DTPA-ED-PLGA:PLGA, nachträglich GD-NTA	$-32,4 \pm 1,6$	$0,0272 \pm 0,0090$	59 ± 2	$0,1293 \pm 0,0070$
11	1:1 DTPA-ED-PLGA:PLGA, GD-NTA eingebaut	$-33,3 \pm 3,4$	$0,0250 \pm 0,0080$	68 ± 2	$0,1410 \pm 0,0120$

Tab. 6
Zetapotential und Volumendurchmesser von Gadolinium beladenen Nanopartikeln aus DTPA-modifiziertem PLGA

Andererseits werden während der Partikelherstellung 400 μl $\text{Gd(NTA)}_2\text{Na}_3$ Lösung als innere wässrige Phase in die Partikel inkorporiert. Diese Partikel weisen einen Volumendurchmesser von 68 ± 2 nm (Pdl: $0,1410 \pm 0,0120$) und ein Zetapotential von $-33,3 \pm 3,4$ mV auf. Die Leitfähigkeit beträgt hier $0,0250 \pm 0,0080$ mS/cm (Probe 11).

Anhand der Polydispersitätsindizes ist zu erkennen, dass die Partikel aus modifiziertem PLGA nach der Herstellung eine enge Größenverteilung aufweisen. Auffallend ist jedoch, dass sie mit durchschnittlich 64 nm nur halb so groß sind als Partikel, die ausschließlich mit unmodifiziertem PLGA hergestellt wurden.

4.2.4 Absättigung von unmodifizierten PLGA Nanosphären mit $\text{Gd(NTA)}_2\text{Na}_3$

4.2.4.1 Zetapotential

Um zu untersuchen, wie viel Gadolinium unspezifisch an PLGA Nanosphären bindet, wurden unmodifizierte PLGA Nanosphären direkt mit $\text{Gd(NTA)}_2\text{Na}_3$ Lösung 24 Stunden (Probe 12) oder 72 Stunden (Probe 13) inkubiert.

Tab. 7
Zetapotential von unmodifizierten PLGA-Nanopartikeln nach Absättigung mit $\text{Gd(NTA)}_2\text{Na}_3$

Probe	Inkubation (h)	vor Modifikation		nach Gd	
		Zeta Potential (mV)	Leitfähigkeit (mS/cm)	Zeta Potential (mV)	Leitfähigkeit (mS/cm)
12	24	-26,5±0,4	0,018±0,002	-42,1±0,8	0,0262±0,0064
13	72	-26,5±0,4	0,018±0,002	-34,5±1,0	0,0229±0,0102

Das Zetapotential der unmodifizierten Partikel beträgt nach Verdünnung (1:100 mit Aqua destillata) $-26,5 \pm 0,4$ mV, hingegen nach Inkubation mit Gadolinium und den entsprechenden Waschzyklen $-42,1 \pm 0,8$ mV (24 Stunden) bzw. $-34,5 \pm 1,0$ mV (72 Stunden) (Tab. 7). Somit sinkt das Zetapotential mit steigender Inkubationsdauer auf geringer negative Werte, was möglicherweise auf eine instabile Bindung von Gadolinium an die freien Carboxylgruppen der Nanopartikeloberfläche zurückzuführen ist.

Die Möglichkeit, dass sich auch Nitrilotriessigsäure, die bei der Gadolinium Beladung eingesetzt wird, an die Partikeloberfläche anlagert und zum stark negativen Zetapotential beiträgt muss weiter untersucht werden.

4.2.4.2 Größe

Jene Partikel, die drei Tage (Probe 13) mit $\text{Gd(NTA)}_2\text{Na}_3$ Lösung inkubiert wurden sind größer ($126,3 \pm 2$ nm) als vor der Beladung ($118,0 \pm 1$ nm), wohingegen bei einer Inkubationszeit von einem Tag (Probe 12) die Größe von $118,0 \pm 1$ nm auf 103 ± 2 nm abnimmt (Tab. 8).

Tab. 8
Volumensdurchmesser von unmodifizierten PLGA Nanopartikeln nach Absättigung mit $\text{Gd(NTA)}_2\text{Na}_3$

Probe	Inkubation (h)	vor Modifikation		nach Gd	
		Grösse (nm)	PDI	Grösse (nm)	PDI
12	24	118±1	0,1113±0,0080	103±2	0,1263±0,0124
13	72	118±1	0,1113±0,0080	126±2	0,1013±0,0124

4.2.5 Zusammenfassung

Die chemische Oberflächenstruktur der PLGA Nanosphären ist theoretisch über die Messung des Zetapotentials charakterisierbar, allerdings ist dies wegen nicht berücksichtigter oder nicht zu berücksichtigender Parameter, die die Messung beeinflussen können, nicht ausreichend.

4.3 Stabilität

Eine Nanopartikel Suspension ist dann stabil, wenn sich innerhalb eines bestimmten Zeitraumes die Partikelgrößenverteilung nicht oder nur in geringem Ausmaß ändert. Die Stabilität beruht zum Teil auf der elektrostatischen Abstoßung zweier gleichsinnig geladener Partikel, d.h. je höher die elektrostatische Abstoßung ist, desto stabiler ist die Suspension.

Somit kann das Zetapotential als Indikator für die elektrostatische Stabilität dienen. Zwischen -21 mV und -30 mV kommt es zu geringen Agglomerationen, während im Bereich von -31 mV und -40 mV keine Agglomeration auftritt.

Um ein niedriges Zetapotential zu kompensieren und somit die Stabilität zu erhöhen, werden sterische Stabilisatoren eingesetzt. Polymere wie Pluronic® F68 lagern sich an der Partikeloberfläche an und es entsteht somit eine mechanische Barriere, die die Annäherung und somit die Agglomeration von zwei Partikeln verhindert.

4.3.1 Elektrostatische Stabilisierung

Direkt nach der Herstellung der Nanosphären Suspension lag ein stabiles, monodisperses System vor. Das Zetapotential liegt hier zwischen $-18,3 \pm 10,1$ mV und $-42,1 \pm 0,8$ mV und somit ist die Suspension elektrostatisch weitgehend stabilisiert (Tab. 9).

Ob diese elektrostatische Stabilisierung für eine Lagerung in gefrorenem Zustand ausreichend ist, sollte durch Frier-Tau-Versuche näher charakterisiert werden.

Die Proben werden zur Lagerung auf -80°C eingefroren und bei Bedarf aufgetaut. Nach dem Auftauen kam es vereinzelt dazu, dass die Stabilität nicht mehr gegeben war, Agglomerationen waren bereits makroskopisch sichtbar. Das makroskopische Urteil wurde durch die Bestimmung der Grösse und des Polydispersitätsindex bestätigt.

40

Tab. 9
Elektrostatische
Stabilisierung der
Partikelchargen

Probe	vor Einfrieren auf -80°C		makroskopische Bewertung	nach Auftauen aus -80°C	
	Zeta Potential (mV)	Leitfähigkeit (mS/cm)		Grösse (nm)	PdI
1	$-41,3 \pm 1,9$	0,0170	keine Agglomeration	176,5	0,1588
2	$-36,0 \pm 1,4$	0,0262	keine Agglomeration	270,7	0,1637
3	$-26,0 \pm 0,5$	0,0222	keine Agglomeration	107,3	0,1550
4	$-26,4 \pm 0,5$	0,0458	keine Agglomeration	89,2	0,1870
5	$-37,1 \pm 0,6$	0,0708	keine Agglomeration	166,3	0,1493
6	$-30,1 \pm 1,8$	0,0583	Agglomeration	172,7	0,7757
7	$-37,7 \pm 1,3$	0,0783	keine Agglomeration	161,0	0,1437
8	$-18,3 \pm 10,1$	0,0600	Agglomeration	130,7	0,4290
9	$-37,4 \pm 1,7$	0,0838	Agglomeration	162,3	0,3390
10	$-32,4 \pm 1,6$	0,0272	keine Agglomeration	69,2	0,1950
11	$-33,3 \pm 3,4$	0,0151	Agglomeration	1185,5	0,4893
12	$-42,1 \pm 0,8$	0,0262	Agglomeration	135,0	0,3500
13	$-34,5 \pm 1,0$	0,0229	keine Agglomeration	238,7	0,1610

4.3.2 Sterische Stabilisierung

Ein weiterer wichtiger Faktor zur Stabilisierung von PLGA Nanosphären Suspensionen ist die sterische Stabilisierung durch Pluronic® F68.

Auffallend ist, dass sowohl bei allen drei Proben (Probe 14-16), die unter Verwendung von 0,01 % Pluronic® F68 hergestellt wurden, als auch bei Referenz-Partikeln, die mit 0,01 % Pluronic® F68 behandelt wurden nach Einfrieren und Auftauen Agglomerationen auftreten (Tab. 10). Alle drei Proben wurden durch Modifikation der Partikeloberfläche hergestellt, Probe 14 nach Herstellungsprotokoll A, Probe 15 nach Herstellungsprotokoll C und Probe 16 nach Herstellungsprotokoll B.

Eine Konzentration von 0,01 % Pluronic® F68 ist demnach zu gering, um die Suspensionen ausreichend zu stabilisieren. Hingegen bewirkt eine Konzentration des sterischen Stabilisators Pluronic® F68, die größer als 0,1 % ist, eine ausreichende Stabilität der Suspension. Da dies aber nicht der einzige Faktor ist, der die Stabilität der PLGA Nanosphären Suspension beeinflusst, sind weitere Charakterisierungen unerlässlich.

41

Probe	Pluronic [%]	makroskopische Bewertung
1	0,1	keine Agglomeration
2	0,1	keine Agglomeration
3	0,1	keine Agglomeration
4	0,1	keine Agglomeration
5	0,1	keine Agglomeration
6	0,1	Agglomeration
7	0,1	keine Agglomeration
8	0,1	Agglomeration
9	0,1	Agglomeration
10	0,1	keine Agglomeration
11	0,1	Agglomeration
12	0,1	keine Agglomeration
13	0,1	Agglomeration
14	0,01	Agglomeration
15	0,01	Agglomeration
16	0,01	Agglomeration
0,1% Pluronic	0,1	keine Agglomeration
0,01% Pluronic	0,01	Agglomeration

Tab. 10
Elektrostatische
Stabilisierung der
Partikelchargen

4.4 Partikelausbeute

Die Partikelausbeute wurde durch Lyophilisation einer definierten Menge und anschließendem Auswiegen des Trockenrückstandes bestimmt (siehe Kapitel 3.5).

Pluronic® F68 lagert sich an die PLGA Nanosphären an und hat so einen Einfluss auf die Partikelausbeute, die durch Lyophilisation bestimmt wurde. Um diesen Einfluss auszuschließen, werden die eingesetzten Pluronic® F68 Mengen von jeweiligen Herstellungsvorschriften subtrahiert.

4.4.1 Partikelausbeute, Gadolinium Gehalt

Der Konzentration an immobilisiertem Gadolinium in der PLGA Nanosphären Suspension muss auf die Partikelausbeute bezogen werden, da es während des Herstellungsprozesses, vor allem während der Diafiltration, zu Verlusten an PLGA Nanosphären kommt.

Die Gadolinium Menge, die sich auf die Partikelausbeute bezieht, liegt zwischen 0,11 µg Gd/mg Partikel und 6,77 µg Gd/mg Partikel (Tab. 11). Ein Vergleich der unterschiedlichen Herstellungsarten zeigt, dass durch die Modifikationen der Partikeloberfläche mit durchschnittlich 3,80 µg Gd/mg Partikel am effizientesten Gadolinium am Partikel immobilisiert werden kann. Die geringste Menge an Gadolinium wird durch den Einbau in Partikel aus unmodifiziertem PLGA immobilisiert, durchschnittlich 0,79 µg Gd/mg Partikel.

Die unterschiedliche Modifikation der Partikeloberfläche (Probe 1-3, Probe 14-16) bewirkt keine Änderung des Gadolinium Gehaltes, da die Partikel zwischen 1,43 µg Gd/mg Partikel und 6,77 µg Gd/mg Partikel enthielten.

Beim Einbau von Gadolinium in Partikel aus unmodifiziertem PLGA zeigen sich verschiedene Faktoren, die die Gadolinium Immobilisierung beeinflussen:

Die Menge an immobilisiertem Gadolinium ist abhängig von der Gadolinium Konzentration der Lösung, die zur Beladung eingesetzt wird. Werden wie in Probe 4 und Probe 5 31,4 mg Gadolinium eingesetzt, werden durchschnittlich 1,35 µg Gd/mg Partikel inkorporiert, wohingegen bei 7,29 mg eingesetztem Gadolinium (Probe 6-9) der Gehalt nach der Herstellung bei 0,51 µg Gd/mg Partikel liegt.

Es wird sowohl $\text{Gd(NTA)}_2\text{Na}_3$ (Probe 6-7) als auch Magnevist® 0,5 mmol/ml (Probe 8-9) als innere wässrige Phase bei der Herstellung der Nanosphären eingesetzt. In beiden Fällen wurde 7,29 mg Gadolinium eingesetzt. Bei Verwendung von Magnevist® wird mit 1,05 µg Gd/mg Partikel etwa die zehnfache Menge an Gadolinium eingebaut als bei Einsatz einer Gd-NTA Lösung, die nur eine Inkorporation von 0,11 µg Gd/mg Partikel ergibt.

Der Gadolinium Gehalt von Partikeln, die aus DTPA-modifiziertem PLGA hergestellt wurden, zeigt eine wesentlich höhere Einbaurrate als Nanopartikel aus unmodifiziertem PLGA. Die nachträgliche Beladung von DTPA-Nanopartikeln mit 13,12 mg Gadolinium (Probe 10) bewirkt eine Immobilisierung von 1,77 µg Gd/mg Partikel, während der Einbau von Gadolinium während der Herstellung (Probe 11) einen Gehalt von 2,33 µg Gd/mg Partikel ergibt. Trotz Einsatz der halben Gadolinium Menge wird beim direkten Einbau etwa ein Drittel mehr Gadolinium inkorporiert. Die Absättigung von PLGA Nanosphären mit $\text{Gd(NTA)}_2\text{Na}_3$ ergibt bei einer Inkubationszeit von drei Tagen (Probe 13) 1,50 µg Gd/mg Partikel wohingegen bei einer Inkubationszeit von einem Tag (Probe 12) bereits 2,85 µg Gd/mg Partikel enthalten sind. Demnach dürfte eine kürze Inkubationsdauer zu einer hohen Gadolinium Beladung führen, die jedoch instabil ist und bei längerer Inkubationsdauer wieder abgegeben wird.

43

Während des Herstellungsprozesses ist mit einem Verlust an PLGA Nanosphären zu rechnen. Berücksichtigt man diesen unvermeidlichen Verlust, so gelingt es dennoch, die Immobilisierungsrate von Gadolinium an PLGA Nanosphären zu bestimmen. Die Partikel, wo Gadolinium an eine modifizierte Partikeloberfläche gebunden wurde, weisen sowohl die höchste Partikelausbeute als auch den höchsten Gehalt an Gadolinium auf.

4.4.2 Zusammenhang zwischen Partikelausbeute und Waschzyklen

Trotz ähnlicher Herstellungsprotokolle sind die Partikelausbeuten bei der Herstellung von Gadolinium markierter PLGA Nanosphären durch Oberflächenmodifikation mit Werten zwischen 0,74 mg/g Suspension und 26,15 mg/g Suspension sehr breit gestreut (Tab. 11).

Ähnliches spiegelt sich auch bei der direkten Beladung der Partikel mit $\text{Gd(NTA)}_2\text{Na}_3$ Lösung wieder. Trotz gleicher Anzahl an Waschzyklen ist die Partikelausbeute zum Teil doppelt so hoch. Darüberhinaus zeigt sich, dass die Instabilität der Partikelsuspensionen nicht von der Anzahl der Waschzyklen abhängig ist. Sowohl vier Proben, die sieben Waschzyklen erfahren haben (Probe 6, 8, 9, 11), als auch vier Proben, die mehr als zwölf Waschzyklen erfahren haben (Probe 12, 14, 15, 16), bildeten Agglomerate.

Tab. 11
Partikel ausbeute,
Gadolinium Gehalt
der einzelnen Parti-
kelchargen

Modifikation der Partikeloberfläche

Probe	Protokoll	Gd eingesetzt (mg)	Partikel (mg/g Suspension)	Gd Gehalt (mg/L)	Gd Gehalt (µg/mg Partikel)
1	A	13,12	15,19	48,65	3,20
2	B	13,12	26,15	37,4	1,43
3	C	13,12	14,36	35,55	2,48
14	A	13,12	4,78	26,82	5,61
15	C	13,12	5,01	32,97	6,58
16	B	13,12	0,74	5,01	6,77

Einbau in Partikel aus unmodifiziertem PLGA

Probe	Herstellung				
4	+ Magnevist	31,4	18,08	22,6	1,25
5	+ Magnevist +NaCl	31,4	13,73	19,82	1,44
6	+ Gd-NTA	7,29	12,92	1,42	0,11
7	+ Gd-NTA + NaCl	7,29	15,50	4,05	0,26
8	+ Magnevist äquimolar	7,29	13,72	14,4	1,05
9	+ Magnevist äquimolar +NaCl	7,29	9,01	5,59	0,62

Einbau in Partikel aus modifiziertem PLGA

Probe	Herstellung				
10	1:1 DTPA-ED-PLGA:PLGA nachträglich GD-NTA	13,12	11,49	20,38	1,77
11	1:1 DTPA-ED-PLGA:PLGA GD-NTA eingebaut	7,29	5,61	13,06	2,33

PLGA-Nanospären direkt mit Gd[NTA]₂Na₃

Probe	Herstellung				
12	1 Tag Inkubation	13,12	11,13	31,76	2,85
13	3 Tage Inkubation	13,12	22,75	34,08	1,50

4.5 Gelfiltration

Die Gelfiltration als säulenchromatographisches Verfahren trennt Stoffgemische aufgrund ihrer Größe auf. Es sollte untersucht werden, ob die Gelfiltration zur Reinigung von PLGA-Nanosphären geeignet ist.

Für diesen Modellversuch werden fluoreszenzmarkierte Nanosphären eingesetzt die 1 mg BODIPY® als Fluoreszenzfarbstoff enthalten. BODIPY® ist ein apolarer Farbstoff, der die fluorimetrische Detektion der Fraktionen, die Nanopartikel enthalten, ermöglichen sollte.

Als Modell für eine niedermolekulare Verunreinigung wurde Sulforhodamin 101 (10 µl/ml) zugesetzt. Als Gelmatrix wurde Sephadex G-25 in Form von PD-10 Fertigsäulen verwendet.

Nach Äquilibrieren der Säule mit PBS Puffer pH 7,4, wird 1,0 ml Probe auf die an der Geloberfläche fixierten Membran aufgetragen.

Nach dem Einsickern der Probe wird kontinuierlich mit PBS Puffer pH 7,4 eluiert und 1 ml Fraktionen aufgefangen. Die gepackten PD-10 Trennsäulen sind nach Verwendung ein zweites Mal verwendbar, danach verstopft die Säule zusehends.

Während der Auftrennung der Proben mittels Gelfiltration wurde bereits makroskopisch sichtbar, dass die fluoreszierenden, BODIPY® 493/503 markierten Nanopartikel rasch eluiert werden, wohingegen die violette Sulforhodamin 101 Bande sehr langsam eluiert wird.

Dies wird durch die Messung der Fluoreszenzintensitäten mit Tecan Infinite™ 200 (Tecan Trading AG, Männedorf, Schweiz) bestätigt. Die Bestimmung von BODIPY® 493/503 bei 485/525 nm und Sulforhodamin 101 bei 550/595 nm ergab, dass die markierten Nanosphären hauptsächlich in der vierten und fünften Fraktion eluiert werden, während diese Fraktionen noch kein Sulforhodamin 101 enthalten, das die niedermolekularen Verunreinigungen simuliert.

Eine Reinigung der PLGA Nanosphären Suspension mittels Gelfiltration ist mit einer Wiederfindungsrate von durchschnittlich 71 % möglich.

Ab einem Probenvolumen von 2,5 ml scheint die Säule bereits überladen. Somit ist die Gelfiltration zur Reinigung von gereinigten Volumina an PLGA Nanosphären bestens geeignet.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Der Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit lag darin, die Herstellung von Gadolinium markierten Nanosphären aus Poly(D,L-lactid-co-glycolid) (PLGA) als mögliches Kontrastmittel für die Magnetresonanztomographie zu entwickeln und zu charakterisieren. Zunächst wurden PLGA Nanosphären mittels Solvent Evaporation Technik hergestellt und mittels Dia- und Gelfiltration aufgereinigt. Es wurden die PLGA Nanosphären auf vier unterschiedlichen Wegen mit Gadolinium markiert: die Partikeloberfläche wurde mit Gadolinium-Chelaten modifiziert, Gadolinium wurde in Partikel aus unmodifiziertem PLGA und Diethylentriaminpentaessigsäure dianhydrid (DTPABA) -modifiziertem PLGA eingebaut und schließlich wurden unmodifizierte PLGA Nanosphären mit Nitriloessigsäuregadolinat ($\text{Gd(NTA)}_2\text{Na}_3$) beladen.

Zur Charakterisierung der Produkte und der Prozessschritte dienen das Zetapotential und der Volumendurchmesser der Partikel. Als weiterer wichtiger Aspekt für die Lagerstabilität der Partikel wurde die elektrostatische und sterische Stabilisierung der PLGA Nanosphären untersucht. Die Partikelausbeute wurde nach Lyophilisation bestimmt und der Gadolinium Gehalt der PLGA Nanosphären mittels Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry (ICP-OES) bestimmt.

Mit diesen unterschiedlichen Herstellungsverfahren ist es gelungen, Gadolinium mit bis zu 48,65 mg/L Nanosphären Suspension zu binden, bzw. 6,77 $\mu\text{g Gd/mg Partikel}$. Es konnten auf diesem Weg Gadolinium markierte, $114 \pm 5 \text{ nm}$ große, stabile Nanopartikel mit einem Zetapotential von $-28,4 \pm 0,8 \text{ mV}$ hergestellt werden.

Durch die Kopplung von Gadolinium an die Partikeloberfläche wurde eine effizientere Gadolinium Beladung erreicht als durch Einbau in die Partikelmatrix. Zwischen den drei verschiedenen Protokollen der Oberflächenmodifikation war kein signifikanter Unterschied erkennbar. Ob daher als Aminokomponente Ethylendiamin oder Lysin zu bevorzugen ist, und ob deren Kopplung an die Partikel besser in einem oder in zwei Schritten erfolgen sollte, ist Gegenstand weiterer Untersuchungen.

Jedoch ist die Gadolinium Konzentration der PLGA Nanosphären nicht einziger Parameter, der über einen möglichen Einsatz als Kontrastmittel entscheidet. Um die Eignung der unterschiedlich hergestellten Gadolinium markierten PLGA Nanosphären als Kontrastmittel abschätzen zu können, ist die Bestimmung der Relaxivität unumgänglich. Nur so kann mit Bestimmtheit eine Aussage über die Eignung als Kontrastmittel für die Magnetresonanztomographie getroffen werden. Auch die Effizienz der Herstellungsmethoden bezüglich Magnetresonanztomographie, lässt sich nur über die Messung der Relaxivität bestimmen. Besonderes Augenmerk liegt hierbei auf der Lokalisation des Gadoliniums im Partikel oder an

seiner Oberfläche, und somit der Wasserzugänglichkeit des Gadoliniums. Ausgehend von dieser Arbeit sollen in der Folge Stabilitäts- und Toxizitätsstudien durchgeführt werden, die das Potential als Kontrastmittel für die Magnetresonanztomographie letztendlich zeigen können.

Vielversprechend ist weiters, die Gadolinium markierten Partikel mit Targetern zu koppeln. Somit wäre es möglich, die Verteilung des Kontrastmittels nicht allein von der Größe der Nanosphären abhängig zu machen, sondern es wird eine gezielte Darstellung spezifischer Gewebe ermöglicht. Auch der Einbau von hydrophilen oder lipophilen Arzneistoffen in die Partikelmatrix eröffnet eine Vielzahl an Möglichkeiten. Insbesondere im Hinblick auf die Kombination von Diagnostikum und Therapeutikum in nur einem Arzneimittel.

Die Magnetresonanztomographie unter Einsatz von Kontrastmitteln ist ein routinemäßig eingesetztes, unverzichtbares diagnostisches Verfahren. Ausgehend von dieser Arbeit ist das Ziel die Herstellung eines neuartigen Kontrastmittels auf Basis bioabbaubarer Nanopartikel, das dazu beiträgt, höhere Kontraste zu erreichen. Die kontrastverstärkende Wirkung lässt Bilder höherer Qualität entstehen. Die daraus entstehenden Zusatzinformationen können wesentlich zum Therapieerfolg beitragen.

6 ANHANG

6.1 FT-IR Spektren

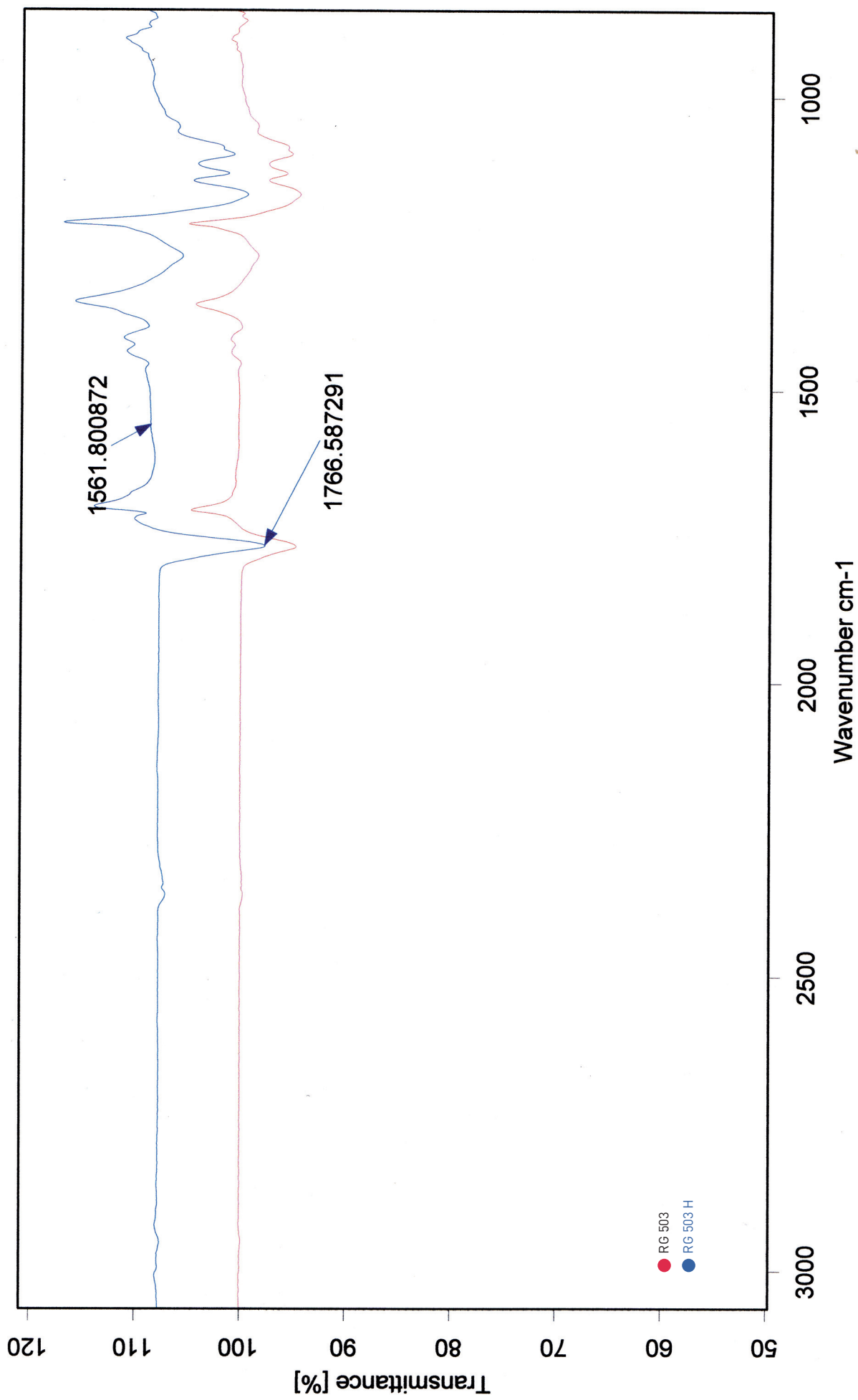


Abb. 19 FTIR-Spektren von Resomer® RG 503 (rot) und Resomer® RG 503 H (blau)

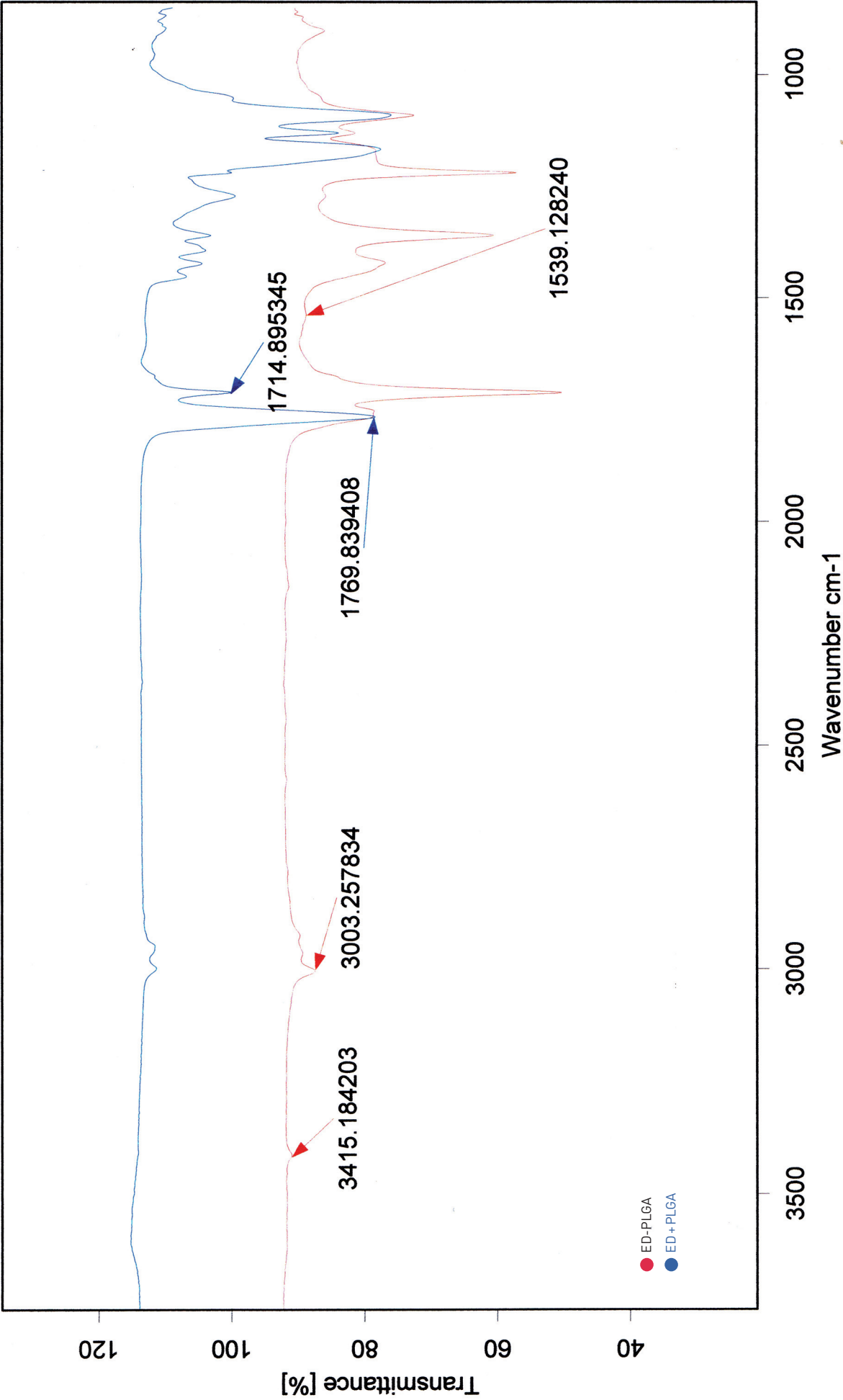


Abb. 20 FTIR-Spektren von einer äquimolaren, physikalischen Mischung aus Resomer® RG 503 H und Ethylendiamin (blau) und Ethylendiamin, das kovalent an Resomer® RG 503 H gebunden ist (rot)

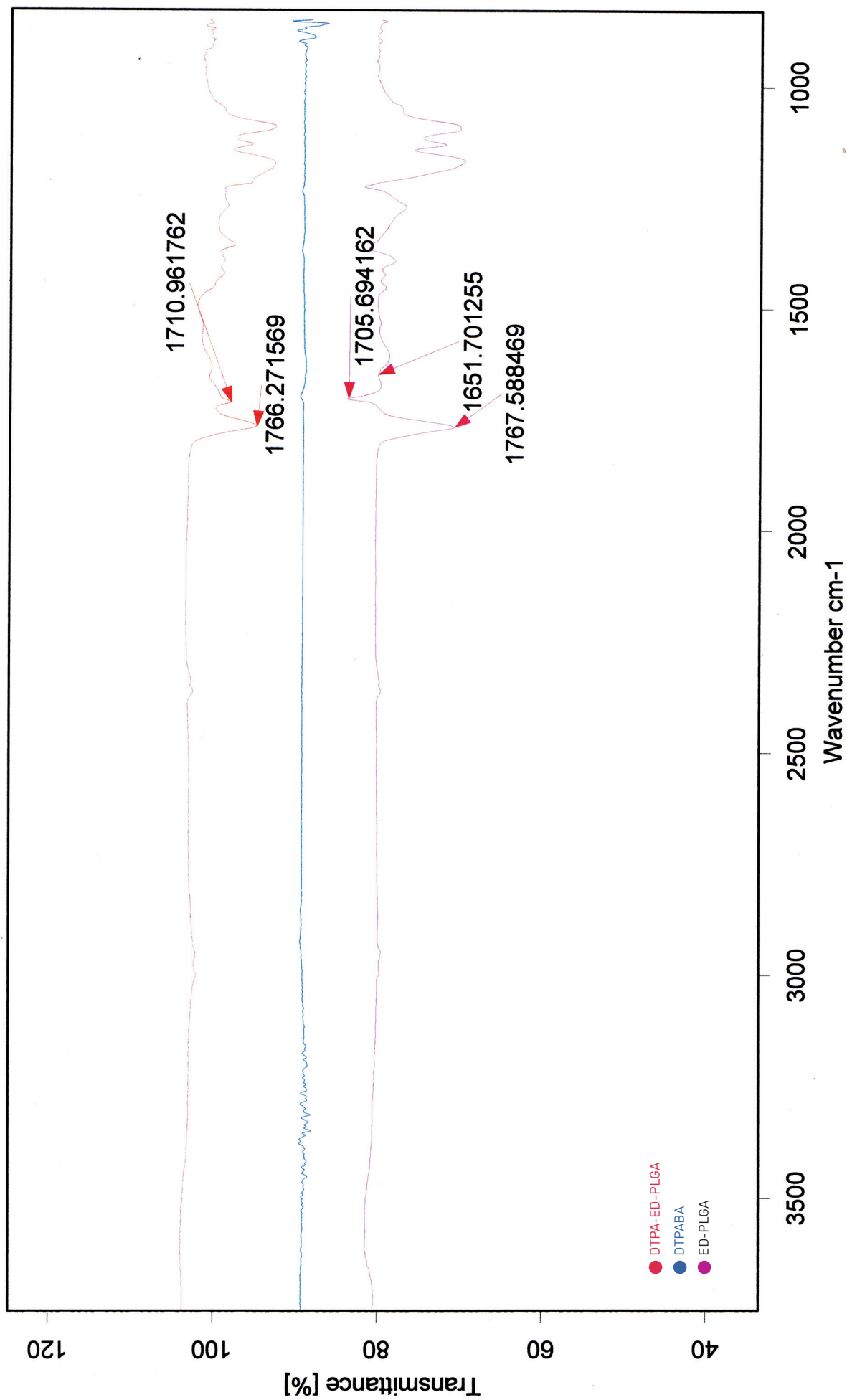


Abb. 21 FTIR-Spektren von DTPABA (blau), Ethylendiamin, das kovalent an Resomer® RG 503 H gebunden ist (violett) und das Kopplungsprodukt aus beiden (rot)

6.2 Danksagung

Herrn Prof. Mag. Dr. Franz Gabor danke ich für die Bereitstellung des Themas, seine fortwährende Diskussionsbereitschaft und seine tatkräftige Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Frau Mag. Gerda Ratzinger danke ich für ihre engagierte Betreuung, Hilfsbereitschaft und Geduld.

55

Die Erhebung der Endergebnisse verdanke ich Prof. Dr. Wilfried Körner vom Department für Umwelt-geowissenschaften der Universität Wien.

Bei Dipl.-Designerin Isolde Fitzel bedanke ich mich für die überaus kompetente graphische Unterstützung.

An dieser Stelle möchte ich mich auch bei allen der Arbeitsgruppe bedanken. Nicht nur die ausgesprochen gute Zusammenarbeit, sondern auch ein überaus angenehmes Arbeitsklima haben diese Arbeit bereichert.

Zuletzt möchte ich auch meinen Eltern Irmgard und Max Geiger sowie meiner Schwester für ihre Unterstützung und Hilfe danken.

6.3 Literaturverzeichnis

1

D. Weisshaupt, V.D. Köchli, B. Marincek, Wie funktioniert MRI?, Springer, Heidelberg, 2006

2

P. Caravan, J.J. Ellison, T.J. McMurry, R.B. Lauffer, Gadolinium(III) Chelates as MRI Contrast Agents: Structure, Dynamics and Applications, Chemical Reviews 99, 1999, 2293–2352

3

I. Brigger, C. Dubernet, P. Couvreur, Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis, Advanced Drug Delivery Reviews 54, 2002, 631–651

4

I. Bala, S. Hariharan, R. Kumar, PLGA Nanoparticles in Drug Delivery: The State of the Art, Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems 21, 2004, 387–422

5

J. A. Reddy, V. M. Allagadda, C. P. Leamon, Targeting therapeutic and imaging agents to folate receptor positive tumors, Current Pharmaceutical Biotechnology, 2005, 131–150

6

H.R. Müller, Zetapotential und Partikelladung in der Laborpraxis, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 1996, Bd. 37

7

H.R. Müller, R. Schuhmann, Teilchengrößenmessung in der Laborpraxis, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 1996. Bd. 38

8

G.T. Hermanson, Bioconjugate Techniques, Academic Press, San Diego, 1996

9

M. Hesse, H. Maier, B. Zeeh, Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2005

10

C. Fillafer, M. Wirth, F. Gabor, Stabilizer-Induced Viscosity Alteration Biases Nanoparticle Sizing via Dynamic Light Scattering, Langmuir 23, 2007, 8699–8702

11

J. M. Anderson, M. S. Shive, Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres, Advanced Drug Delivery Reviews 28, 1997, 5–24

12

I. Paschkunova-Martic, C. Kremser, K. Mistlberger, N. Shcherbakova, H. Dietrich, H. Talasz, Y. Zou, B. Hugl, M. Galanski, E. Sölder, K. Pfaller, I. Höliner, W. Buchberger, B. Keppler, P. Debbage, Design, synthesis, physical and chemical characterisation, and biological interactions of lectin-targeted nanoparticle bearing Gd-DTPA -chelates: an exploration of magnetic resonance molecular imaging (MRMI), Histochemistry and Cell Biology 123, 2005, 283–301

6.4 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Geiger, Andrea Yvonne
Geburtsdaten	29.08.1981 in Krumbach
Staatsangehörigkeit	deutsch
Eltern	Irmgard und Max Geiger
Geschwister	Margit Geiger

Schulischer Werdegang

19.06.2001	Erwerb der allgemeinen Hochschulreife
1998–2001	Humboldt-Gymnasium, Ulm
1992–1998	Claretiner Kolleg, Weißenhorn (neusprachliches Gymnasium)
1988–1992	Grundschule, Weißenhorn

57

Universitärer Werdegang

07.2007–02.2008	Department für pharm. Technologie und Biopharmazie Praktische Arbeit zur vorliegenden Diplomarbeit
ab SS 07	Universität Wien Tutorium, Industrielle Arzneimittelherstellung
WS 04–WS 08	Universität Wien Pharmazie-Studium
10.03.2005	Freie Universität Berlin Erster Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
SS 02–SS 04	Freie Universität Berlin Pharmazie-Studium

Studienbegleitende Tätigkeiten

03.07.06–15.09.06	Abbott GmbH & Co.KG, Ludwigshafen (D) Ferialarbeiterin
23.03.06–30.06.06	Internationale Apotheke, Wien (A) Praktikantin
01.07.05–30.08.05	Stadt Apotheke, Weissenhorn (D) Ferienarbeiterin
01.08.03–30.09.03	Herbamed AG, Sankt Gallen (CH) Laborantin
10.03.03–04.04.03	Harlekin Apotheke, Berlin (D) Famulatur
05.08.02–30.08.02	Ratiopharm, Ulm (D) Famulatur
19.09.01–31.03.02	Herbamed AG, Sankt Gallen (CH) Pharmazie-Praktikantin

6.5 Abkürzungen

Rpm	rotations per minute
ED	Ethylendiamin
M	Molekulargewicht
PdI	Polydispersitätsindex
THF	Tetrahydrofuran

6.6 Materialien

Absolutes Dichlormethan	Sigma-Aldrich (Wien, Österreich)
Aceton	Gatt Koller (Absam, Österreich)
Aqua bidestillata	
Aqua destillata	
BODIPY® 493/503	Methyl bromide [8-bromomethyl-4,4-difluoro-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene], Invitrogen Corporation (Carlsbad, California, USA)
1,4 Dioxan	Merck Gesellschaft mbH (Wien, Österreich)
DMSO	Dimethylsulfoxid, Merck Gesellschaft mbH (Wien, Österreich)
DTPABA	Diethylentriaminpentaessigsäure dianhydrid, Sigma-Aldrich (Wien, Österreich)
ED	Ethylendiamin, Sigma-Aldrich (Wien, Österreich)
EDAC	N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimid Hydrochlorid, Sigma-Aldrich (Wien, Österreich)
ED 2HCL	Ethylendiamindihydrochlorid, Sigma-Aldrich (Wien, Österreich)
Ethylacetat	Sigma-Aldrich (Wien, Österreich)
Gd(NTA) ₂ Na ₃	Nitriloessigsäuregadolinat, Trinatriumsalz
Gd ₂ O ₃	Sigma-Aldrich (Wien, Österreich)
HCL 37 %	Salzsäure
20 mM HEPES/NaOH Puffer	4,77 g HEPES mit Aqua destillata auf 1000 ml aufgefüllt, pH 7,4 Einstellung mit 1 M NaOH
L-Lysin HCl	L-Lysinhydrochlorid
Magnevist® 0,5 mmol/ml Injektionslösung	Schering AG (Berlin, Deutschland) [78,63 mg Gd/ml]
NaOH	Natriumhydroxid
NHS	N-Hydroxysuccinimid, Sigma-Aldrich (Wien, Österreich)
PBS Puffer pH 7,4	Bei der Herstellung von PBS Puffer pH 7,4 werden 80g NaCl, 2g KCl, 11,5g Na ₂ HPO ₄ *7 H ₂ O und 2g KH ₂ PO ₄ mit Aqua destillata auf 1000ml aufgefüllt, diese Stammlösung wird vor Gebrauch 1:10 mit Aqua destillata verdünnt
Pluronic® F68	Sigma-Aldrich (Wien, Österreich)
Resomer® RG 503	Poly(lactic-co-glycolic acid) Boehringer Ingelheim (Ingelheim, Deutschland)
Resomer® RG 503 H	Poly(lactic-co-glycolic acid) Boehringer Ingelheim (Ingelheim, Deutschland)
Sulforhodamin 101	Sigma-Aldrich (Wien, Österreich)
THF	Tetrahydrofuran >99 % Sigma-Aldrich (Wien, Österreich)

