



universität  
wien

# MASTERARBEIT / MASTER'S THESIS

Titel der Masterarbeit / Title of the Master's Thesis

PLGA-Mikropartikel: Freisetzungsprofil von Testosteron  
und Darstellung eines Tensidankers zur  
Oberflächenmodifikation

verfasst von / submitted by

Philip Hohl, BSc

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

Wien, 2022 / Vienna 2022

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

UA 066 605

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

Masterstudium Pharmazie

Betreut von / Supervisor:

ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Franz Gabor



## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich herzlichst bei ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Franz Gabor und ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Michael Wirth für die Aufnahme in ihre Forschungsgruppe bedanken. Das Mitarbeiten an ihren Themengebieten war überaus spannend und eine sehr große Bereicherung für mein Studium. Die wertschätzende Betreuung und der freundliche Umgang miteinander machten jeden Tag am Department zu einer tollen Erfahrung.

Ein besonderer Dank gilt an dieser Stelle Mag.pharm. Maria Anzenruber, welche mir zu jeder Zeit mit mehr als kompetenten Ratschlägen und großer Hilfsbereitschaft zur Seite stand.

Ebenso geht ein Dank an alle Kolleginnen und Kollegen, welche diese Zeit des Studiums unvergesslich gemacht haben.

Abschließend aber nicht zuletzt möchte ich mich bei all meinen Familienmitgliedern auf das Herzlichste bedanken. Jeder von euch hat mich auf seine eigene und besondere Art während meines gesamten Studiums unterstützt. Danke.

## Abstract

Diese Arbeit handelt von der Charakterisierung der Größe sowie Größenverteilung und freisetzungsspezifischer Eigenschaften von Testosteronbeladenen Mikropartikeln, welche mit PLGA unterschiedlicher Molekulargewichte mittels Solvent Evaporation Methode hergestellt wurden. Weiters wurde die Möglichkeit einer Oberflächenoptimierung von PLGA-Mikropartikel, durch den Einbau eines Tensidankers untersucht. Zu diesem Zweck wurde das nichtionische Tensid Brij35<sup>TM</sup> mit einem Carbamatlinker versehen. Dieser ermöglichte das Anbringen von Substanzen mit unterschiedlichen terminalen chemischen Gruppen. Aus diesen modifizierten Brij35-Konjugaten und PLGA wurden Mikropartikel hergestellt und deren Oberflächenmerkmale untersucht.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	7
1.1	Ziel der Arbeit .....	8
<b>2</b>	<b>Allgemeiner Teil</b> .....	9
2.1	Mikropartikelsysteme .....	9
2.2	PLGA, ein bioabbaubares Polymer .....	10
2.3	Oberflächenoptimierung von Partikeln .....	11
<b>3</b>	<b>Materialien und Methoden</b> .....	12
3.1	Herstellung von PLGA-Testosteron-Mikropartikeln.....	12
3.1.1	Freisetzungsversuch aus PLGA-Testosteron-Mikropartikeln .....	12
3.1.2	Quantifizierung von Testosteron durch Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) .....	13
3.1.3	Bestimmung der Wirkstoffeinbaurrate und der Verkapslungseffizienz .....	14
3.1.4	Partikelgrößenbestimmung .....	14
3.2	Funktionalisierung von Brij35™ .....	15
3.2.1	Reinigung der funktionalisierten Brij35-Derivate mittels Größenausschlusschromatographie.....	17
3.2.2	Abgeschwächte Totalreflektions-Fouriertransformations- Infrarotspektrometrie (ATR FT-IR) von funktionalisiertem Brij35 .....	17
3.3	Herstellung von PLGA-Mikropartikeln mit funktionalisiertem Brij35 .....	18
3.3.1	Nachweis der Aminogruppen an funktionalisierten Brij35-Konjugaten mittels Aminoassay .....	18
3.3.2	Nachweis von HSA und WGA an funktionalisierten Brij35-Derivaten mittels BCA-Assay .....	18
3.3.3	Nachweis von Fluorescein-Cadaverin und Folsäure durch Fluoreszenz- bzw. Absorptionsbestimmung.....	19
<b>4</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion</b> .....	20
4.1	Charakteristika der PLGA-Testosteron-Mikropartikel .....	20
4.1.1	Größenverteilung der Mikropartikel .....	20

4.1.2	Bestimmung der Testosteronbeladung und der Einbaurrate unter Berücksichtigung der unterschiedlichen PLGA-Typen.....	22
4.1.3	Vergleich der Freisetzungsprofile von PLGA-Mikropartikeln im offenen und geschlossenen System .....	23
4.2	Funktionalisierung von Brij35 mit CDI unter Verwendung von Fluorescein-Cadaverin, 1,8-Diamino-3,6-dioxaoctan und $\epsilon$ -Aminocaprinsäure .....	25
<b>5</b>	<b>Schlussfolgerungen</b> .....	<b>31</b>
	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>32</b>
	<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>33</b>

# 1 Einleitung

Die Mikro- und Nanotechnologie hat sich in der Pharmazeutischen Technologie zu einem schnell wachsenden Gebiet mit vielen potenziellen Anwendungsmöglichkeiten entwickelt. Der Einsatz herkömmlicher Arzneiformen führt oft zu starken Schwankungen des Arzneistoffspiegels zwischen dem Nebenwirkungsniveau und dem minimalen therapeutischen Niveau. Meist wird der größte Teil des Wirkstoffs schnell nach der Verabreichung freigesetzt, was zu einem raschen Anstieg der Wirkstoffkonzentration im Körper führt. Ein weiteres relevantes Problem vieler derzeit angewendeter Arzneimittel ist deren unselektive beziehungsweise gleichmäßige Verteilung im gesamten Körper. Dadurch müssen so verabreichte Wirkstoffe oft andere Organe oder Kompartimente passieren, in denen wiederum eine Inaktivierung oder ein unerwünschter Effekt ausgelöst werden kann. Um eine Wirkung im gewünschten Kompartiment zu erzielen beziehungsweise im gewünschten Steady State Niveau zu bleiben ist meist eine periodische oder hoch dosierte Verabreichung von Arzneiformen notwendig, welche wiederum zu Konzentrationsschwankungen des Arzneistoffes von Ineffektivität bis hin zu Toxizität führen kann. (Magdalena Stevanovi, 2009)

Eine kontrollierte Wirkstofffreisetzung, wie sie durch die Verwendung von bioabbaubaren Polymeren wie Poly(lactid-co-glycolid (PLGA) erreicht werden kann, in Kombination mit gezieltem Drug Targeting kann hier Fortschritte bringen. Der Einsatz dieses bioabbaubaren Polymers als Trägermaterial ermöglicht nicht nur eine gezielte und gut steuerbare Freisetzung, sondern ist zudem noch mit einer Vielzahl von Arzneistoffen wie zum Beispiel Testosteron oder anderen Hormonen kompatibel. In Kombination mit einer Oberflächenoptimierung durch Einbringen eines Tensidankers mit diversen chemisch zugänglichen funktionellen Gruppen kann diese Variabilität nochmals erhöht und somit verbessert werden. Die Vorteile von Arzneiformen, welche diese zwei Aspekte erfüllen, sind mannigfaltig und reichen von maximaler Wirkung bei minimalen Nebenwirkungen über reduzierte Verabreichungsfrequenzen bis hin zu stark reduzierten Therapiekosten. (Magdalena Stevanovi, 2009); (Wei Xiong, 2021)

## 1.1 Ziel der Arbeit

- Die Herstellung von testosteronbeladenen Mikropartikeln aus PLGA unterschiedlichen Molekulargewichts sowie die Charakterisierung der jeweiligen Freisetzungseigenschaften.
- Die Herstellung eines Tensidankers zum Einbringen verschiedener, chemisch zugänglicher funktioneller Gruppen an der PLGA-Partikeloberfläche zur Umgehung der sterischen Hinderung der Derivatisierbarkeit durch Polyvinylalkohol (PVA).

## 2 Allgemeiner Teil

### 2.1 Mikropartikelsysteme

Mikropartikuläre Systeme wie Mikrokapseln oder Mikrosphären können als Arzneistoffträgersysteme für verschiedenste Wirkstoffe - von Polypeptiden und Proteinen bis hin zu niedermolekularen Substanzen - dienen. Die Möglichkeit solche Systeme an die jeweiligen Bedingungen anzupassen, um das gewünschte Gewebe zu erreichen oder dort zu akkumulieren, machen sie vielen herkömmlichen Trägersystemen überlegen. Weiters ergibt sich durch die Verwendung unterschiedlichster Polymere wie Poly(lactid-co-glycolid) (PLGA) oder Polylactid (PLA), welche bei der Herstellung von Mikropartikel zum Einsatz kommen können, eine Vielzahl an steuerbaren Eigenschaften, wie etwa die Freisetzungsgeschwindigkeit oder die Freisetzungsdauer. Aber nicht nur über die richtige Wahl der Polymere, sondern auch über die breite Vielfalt an möglichen Herstellungsverfahren können Partikelcharakteristika wie Größe, Beladungskapazität und allgemeine strukturelle Eigenschaften modifiziert werden. Hierbei werden unter anderem Polymerisation, Elektrosprayverfahren, Solvent-Evaporation-Methoden oder Microfluidic-Techniken eingesetzt. Bedingt durch ihre Größe unterliegen Mikropartikel zwar in einigen Anwendungsbereichen einem nanopartikulären System, welche auch noch auf zellulärer oder subzellulärer Ebene eingesetzt werden können. Als Depotarzneiform hingegen liefern sie ein breites Spektrum an Einsatzmöglichkeiten aufgrund ihrer exzellent steuerbaren Eigenschaften wie Freisetzung, Beladung, Stabilität und Wirkstoffkompatibilität. (Antonios Vlachopoulos, 2022)

## 2.2 PLGA, ein bioabbaubares Polymer

Unter bioabbaubaren Polymeren versteht man natürliche oder synthetische biokompatible Materialien, welche toxikologisch unbedenklich sind und in-vivo abgebaut werden können. Der in-vivo Abbau erfolgt enzymatisch, nicht enzymatisch oder über eine Kombination der beiden Mechanismen. Eines dieser bioabbaubaren Copolymere ist das vielfach untersuchte PLGA, ein Poly-Milchsäure-Glycolsäureester, bei dem D- und L-Milchsäure im äquimolaren Verhältnis vorliegen. Bedingt durch die geringe Toxizität und die hohe Biokompatibilität sind zurzeit 20 PLGA-basierte Produkte verfügbar, welche die Zulassung durch die Food and Drug Administration (FDA) und die European Medicines Agency (EMA) erhalten haben. Aufgrund seiner Zusammensetzung kann PLGA nahezu jede Größe und Form annehmen und zusätzlich ein breites Spektrum von Molekülen inkorporieren. Ausschlaggebend für das Verständnis der kontrollierten Wirkstofffreisetzung dieses Polymeres sind seine physikalischen, chemischen und biologischen Eigenschaften. Abgebaut wird PLGA in Kontakt mit Wasser über Hydrolyse der Esterbindungen. Eine Steuerung der Abbaugeschwindigkeit ist hier über das Verhältnis von PLA zu Polyglycolid (PGA) möglich, da die Methylgruppen von PLA die Lipophilie erhöhen und somit die Adsorption von Wasser senken. Dieser Effekt wirkt sich direkt auf den hydrolytischen Abbau aus, indem es diesen verlangsamt. Genau dieser Abbau ist es auch, der im weiteren Verlauf die Eigenschaften von PLGA in Bezug auf die Wirkstofffreisetzung beeinflusst. Weiters hat sich gezeigt, dass die physikalischen Eigenschaften von Faktoren wie dem anfänglichen Molekulargewicht, der Größe und Form des Vehikels und der Lagerungstemperatur abhängen. Aus neueren Studien geht hervor, dass selbst die Wahl des inkorporierten Wirkstoffs einen wesentlichen Einfluss auf das Quellverhalten, die mechanische Festigkeit, die Hydrolysefähigkeit und somit auch auf die Bioabbaubarkeit und Freisetzung haben kann. (Siegel, 2011); (Antonios Vlachopoulos, 2022)

## 2.3 Oberflächenoptimierung von Partikeln

Die biologische Halbwertszeit zu verlängern, die Clearance aus dem Blutkreislauf zu verlangsamen, den gewünschten Wirkort zu erreichen und damit die Wirkung erst zu ermöglichen beziehungsweise zu verbessern sind nur einige wenige Ziele, welche durch die Oberflächenmodifikation von PLGA-Partikeln erreicht werden können. Eine Möglichkeit diese Verbesserungen zu erzielen ist die Verwendung von Poly(ethylenglykol) (PEG) oder Brij (Poly(alkylenglykoether)). Beide Moleküle sind nichtionische Tenside, welche biokompatibel sind und von der FDA als allgemein sicher angesehen werden. Die Anlagerung dieser Tenside an der Partikeloberfläche führt zu einem Ladungsausgleich, welcher vor Aggregation und Opsonierung schützt und dadurch die pharmakokinetischen Eigenschaften verbessert. Die Herstellung von PLGA-Partikeln erfolgt häufig in Gegenwart von Polyvinylalkohol (PVA). Er ermöglicht eine Stabilisierung der Partikelsuspension und eine gleichmäßige Verteilung der Partikelgröße, wodurch PVA zu einer praktischen Komponente in PLGA-Systemen wurde. Bei subkutaner beziehungsweise intravenöser Verabreichung im Tierversuch führte PVA jedoch zu unerwünschten Nebenwirkungen wie Bluthochdruck, Anämie und Störungen des zentralen Nervensystems. Nebenwirkungen wie diese wurden bis dato bei Tensiden wie PEG oder Brij nicht beobachtet. Abhängig von der Konzentration der PEG-Moleküle an der Oberfläche kann auch die Verweildauer im Plasma und damit die biologische Halbwertszeit verlängert werden. Weiters erhöht PEG die Hydrophilie an der Partikeloberfläche. Um diese PEGylierung an der Partikeloberfläche zu erreichen, gibt es zwei Möglichkeiten: physikalische Adsorption und elektrostatische Wechselwirkungen. Eine äußerst vielversprechende Alternative ist die Ausbildung von kovalenten Bindungen zwischen PEG- und PLGA-Einheiten zur Darstellung eines multifunktionellen Copolymers, welches dann zur Herstellung von Partikeln genutzt werden kann. Je nach Endgruppe des PEG-Derivates ist dann zusätzlich das Einbringen eines Targeting-Liganden möglich. Ein weiterer Ansatz der Oberflächenmodifikation ist, anstelle das PLGA direkt zu modifizieren, das nichtionische Tensid Brij an einen Targeter zu konjugieren und dies dann in Kombination mit PLGA zu Partikeln zu verarbeiten. (Mazen M. El-Hammadi, 2022)

## 3 Materialien und Methoden

### 3.1 Herstellung von PLGA-Testosteron-Mikropartikeln

Die Herstellung erfolgt durch die Solvent Evaporation-Methode. Es werden 50 mg Poly(lactid-co-glycolid) RG502H (PLGA; lactide:glycolide-50:50; MW 7000-17000) beziehungsweise PLGA RG503H (lactide:glycolide-50:50; MW 24000-38000) (Evonik Industries AG) sowie 12 mg Testosteron in 2 ml Dichlormethan (DCM) gelöst. Anschließend werden 30 ml einer 5 %igen Polyvinylalkohol-Lösung (PVA; MW 30000-70000; 87-90 % hydrolysiert) als Non-Solvent bereitet. Die PLGA-Testosteron-Lösung wird über eine 5 ml Spritze unter Verwendung einer 0,8 µm Kanüle in die 5 %ige PVA-Lösung eingespritzt und mit einem Hochleistungs-Dispergiergerät (Ultra-Turrax) zwei Minuten bei Stufe 1-2 homogenisiert. Anschließend wird die Suspension in 300 ml destilliertes Wasser eingebracht und die Partikel 20 Minuten unter Rühren gehärtet.

Der gesamte Ansatz wird zur Aufreinigung 15 Minuten bei 4 °C und 7000 UpM zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen. Die Mikropartikeln werden in destilliertem Wasser resuspendiert und der Waschschrift unter den gleichen Bedingungen einmal wiederholt. Die Mikropartikel werden im Anschluss bei -80 °C gefroren, um eine nachfolgende Lyophilisation zu ermöglichen.

#### 3.1.1 Freisetzungsversuch aus PLGA-Testosteron-Mikropartikeln

Die Freisetzungsversuche werden sowohl in einem geschlossenen System als auch in einem offenen System durchgeführt.

Für das offene System werden 6 mg Partikel in einem Freisetzungsmedium aus 4 ml PBS (Phosphate Buffered Saline) mit Calcium und Magnesium (pH 7,24; 0,003 M), welches 0,5 % Tween80 und 3 % Bovines Serumalbumin (BSA) enthält, homogen suspendiert. Die Suspension wird anschließend auf drei 5 ml Mikroreaktionsgefäße zu je 1,33 ml aufgeteilt und jeweils 2,66 ml Freisetzungsmedium zugesetzt.

Für das geschlossene System werden 21 mg Mikropartikel in 14 ml Freisetzungsmedium homogen suspendiert und auf 28 Stück 2 ml Mikroreaktionsgefäße in Aliquoten zu je 0,5 ml aufgeteilt und mit je 1,0 ml Freisetzungsmedium versetzt. Für die Dauer des Freisetzungsversuches werden die Proben im Brutschrank bei 37 °C inkubiert.

Vor der Probenentnahme aus dem offenen System werden die Mikroreaktionsgefäße bei 4000 UpM 10 Minuten zentrifugiert. Danach werden jeweils zweimal 0,5 ml klarer Überstand aus den Mikroreaktionsgefäßen entnommen und durch frisches FreisetzungsmEDIUM ersetzt. Die durch die Zentrifugation entstandenen Mikropartikel-Pellets werden im Anschluss wieder homogen resuspendiert. Die entnommene Probe wird bei -80 °C eingefroren und lyophilisiert.

Im geschlossenen System erfolgt die Probenentnahme durch 10 Minuten langes Zentrifugieren der Mikroreaktionsgefäße bei 10000 UpM. Danach wird der gesamte klare Überstand vom entstandenen Pellet getrennt, beide Phasen bei -80 °C gefroren und anschließend lyophilisiert.

### **3.1.2 Quantifizierung von Testosteron durch Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)**

Der Testosterongehalt der Mikropartikeln sowie im FreisetzungsmEDIUM wird unter Verwendung einer HPLC (Nexera XR, Shimadzu Corp., Kyoto, Japan) quantifiziert. Für die Auftrennung wird eine NUCLEODUR C18 Gravity-SB (5 µm C18; 4,6 x 150 mm; Macherey-Nagel; Deutschland) Säule mit Vorsäule verwendet. Die Detektion des Wirkstoffes erfolgt bei 270 nm unter Verwendung eines UV-Photodiodenarray-Detektors. Die mobile Phase besteht aus ddH<sub>2</sub>O und Methanol. Die Elution erfolgt über insgesamt 13 Minuten mit einem Gradienten. Während der ersten sieben Minuten wird der Methanol-Anteil von 60 % auf 100 % erhöht und eine Minute beibehalten. Anschließend wird innerhalb einer Minute zu dem Ausgangsverhältnis von 60 % Methanol und 40 % ddH<sub>2</sub>O zurückgekehrt und bis Minute 13 konstant gehalten. Die Flussrate beträgt dabei 1 ml/Minute bei einer Säulentemperatur von 30 °C.

Die Mikropartikeln sowie der lyophilisierte Überstand werden in je 1 ml Methanol suspendiert und 15 Minuten im Ultraschallbad beschallt, zentrifugiert und der klare Überstand in HPLC-Vials überführt. Die Säule wird mit 10 µl Probe beladen. Der Peak erscheint bei einer Retentionszeit von 6.76 Minuten. Der Testosterongehalt wurde unter Verwendung der Lab solutions - Software berechnet.

### 3.1.3 Bestimmung der Wirkstoffeinbaurate und der Verkapselungseffizienz

Durch die ermittelten Testosteron-Konzentrationen werden die Loading Capacity (LC [%]; gibt den Anteil an Wirkstoff im Partikel an) sowie die Encapsulation Efficiency (EE [%]; entspricht dem Anteil des eingesetzten Wirkstoffes, welcher verkapselt ist) berechnet. Diese zwei Werte erlauben es, die verschiedenen Mikropartikelchargen miteinander zu vergleichen. Die Berechnung erfolgt mittels folgender Formeln:

$$LC [\%] = \frac{\frac{\text{Wirkstoffgehalt der Mikropartikel } [\mu\text{g/ml}]}{1000}}{\text{Gewicht Mikropartikel } [\text{mg}]}$$

$$EE [\%] = \frac{\frac{\text{Wirkstoffgehalt der Mikropartikel } [\mu\text{g/ml}]}{\text{Gewicht der Mikropartikel } [\text{mg}]}}{\frac{\text{eingesetzte Wirkstoffmenge } [\text{mg}] * 1000}{\text{eingesetzte PLGA Menge } [\text{mg}]}}$$

### 3.1.4 Partikelgrößenbestimmung

Zur Bestimmung der Größe der Mikropartikeln wird der Mastersizer 3000 (Malvern Instruments Ltd., UK) verwendet. Das Prinzip der Messung beruht auf der Laserdiffraktometrie. Die Messzelle wird zunächst mit destilliertem, partikelfreiem Wasser befüllt. Um die Suspension in Bewegung zu halten wird ein Magnetrührstab eingebracht. Anschließend erfolgt die Initialisierung des Gerätes sowie eine Hintergrundmessung. Es werden 100 µl der Partikelsuspension in die Messzelle pipettiert um eine Lichtabschattung von ≤ 20 % zu erreichen. Gemessen wird bei einer Rührgeschwindigkeit von 700 UpM. Es werden 5 Messungen durchgeführt, wobei die Software den Parameter D[4;3] – den volumengewichteten mittleren Durchmesser der Partikel – angibt.

### 3.2 Funktionalisierung von Brij35™

N, N'-Carbonyldiimidazol (CDI) ist eine hochreaktive Carbamatverbindung. Die Aktivierung einer Hydroxylgruppe mit CDI führt zu einem Imidazolid als Zwischenprodukt mit Imidazol als aktiver Abgangsgruppe. In Gegenwart von Verbindungen, welche primäre Amine enthalten, greifen Nucleophile das elektronenarme Carbonyl an, setzen Imidazol frei und bilden eine stabile Amidbindung. Bei Hydroxyl-enthaltenden Verbindungen reagiert CDI unter Bildung eines Imidazolylcarbamate-Zwischenproduktes, welches mit Nucleophilen reagieren kann und eine N-Alkylcarbamate-Bindung ergibt. Im letzten Syntheseschritt bildet sich ein ungeladenes urethanähnliches Derivat mit ausgezeichneter chemischer Stabilität. Es werden 300 mg Brij35 in 5 ml Dioxan (Konzentration 50 mM) gelöst und auf 37 °C erwärmt. Der bereiteten Lösung werden 400 mg CDI zugegeben (Endkonzentration 0,5 M) und zwei Stunden bei 37 °C gerührt. (Hermanson, 1996) Anschließend wird tropfenweise n-Hexan zugegeben bis das Reaktionsprodukt ausfällt. Danach wird auf ca. 200 ml mit n-Hexan aufgefüllt. Nach 24 Stunden bei Raumtemperatur ist das funktionalisierte Brij35 vollständig ausgefallen und der Überstand ist klar.

Der Überstand wird abdekantiert und verworfen. Der Rückstand wird im Rotationsverdampfer zur Trockenen eingedampft, in destilliertem Wasser aufgenommen und nach Einfrieren lyophilisiert.

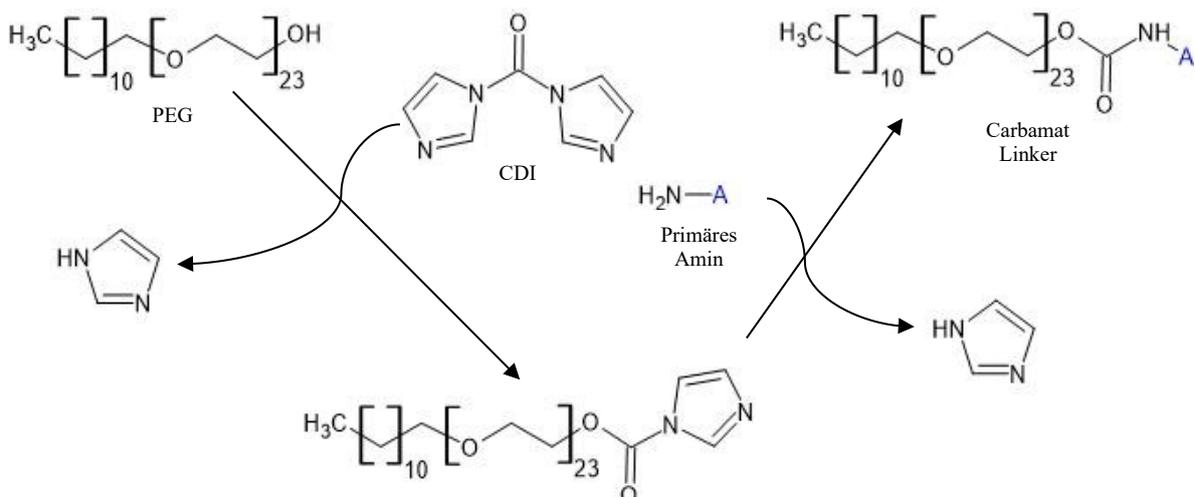


Abbildung 1: N, N'-Carbonyldiimidazol kann zur Aktivierung von terminalen Hydroxidgruppen von PEG zu Imidazol-carbamat verwendet werden. (Hermanson, 1996)

Für die weitere Funktionalisierung mit  $\epsilon$ -Aminocaprinsäure (131,173 g/mol) oder 1,8-Diamino-3,6-dioxaoctan (148,20 g/mol) oder Fluorescein-Cadaverin (719,61 g/mol) werden 200 mg Brij35-CDI-Konjugat in 0,010 M Borat-Puffer pH 9,41 gelöst und 437 mg (3,331 mmol)  $\epsilon$ -Aminocaprinsäure, 494 mg (3,333 mmol) 1,8-Diamoni-3,6-dioxaoctan oder 1 mg Fluorescein-Cadaverin (0,139 mmol) zugesetzt und bei Raumtemperatur 48 Stunden unter Rühren inkubiert.

Für den nächsten Funktionalisierungsschritt werden die Carboxylgruppen der  $\epsilon$ -Aminocaprinsäure oder der Folsäure mittels 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid (EDC) und N-Hydroxysulfosuccinimid (Sulfo-NHS) aktiviert.

EDC reagiert mit einer Carbonsäuregruppe und bildet eine hochreaktive O-Acylisoharnstoff-Zwischenstufe. Dieses Zwischenprodukt kann mit einem Amin reagieren, wodurch ein Konjugat der beiden Moleküle entsteht, welches durch eine stabile Amidbindung verbunden ist. Die Zugabe von Sulfo-NHS stabilisiert das aminreaktive Zwischenprodukt, indem es in einen Sulfo-NHS-Ester umgewandelt wird, wodurch die Effizienz von EDC-vermittelten Kopplungsreaktionen erhöht wird.

Es werden 60 mg Brij35-CDI- $\epsilon$ -Aminocaprinsäure-Konjugates in 2 ml 0,1 M MES/NaOH-Puffer pH 6 (aus 0,1 M 2-(N-morpholino)ethansulfonsäure und 0,5 M NaOH hergestellt) beziehungsweise 441,4 mg Folsäure in 1 ml 0,1 M MES/NaOH-Puffer pH 6 gelöst. Danach wird jeweils eine Lösung von 90 mg EDC und 220 mg Sulfo-NHS in 2 ml 0,1 M MES/NaOH-Puffer pH 6 zugesetzt. Unter Rühren wird die Carboxylgruppe bei Raumtemperatur 15 Minuten aktiviert.

Der aktivierten Folsäure hingegen werden bei Raumtemperatur und unter Rühren eine Lösung von 60 mg des Brij35-CDI-1,8-Diamino-3,6-dioxaoctan-Konjugates in 1 ml 0,1 M MES/NaOH-Puffer pH 7 zugegeben. Der pH-Wert wird anschließend wieder auf pH 7,4 eingestellt und nach 90 Minuten wird mit 1 mg Glycin abgesättigt.

Zur Darstellung einer fluoreszierenden Indikatorkomponente wird dem Brij35-CDI- $\epsilon$ -Aminocaprinsäure-Konjugat eine Lösung von 0,25 mg Fluorescein-Cadaverin in 0,1 M MES/NaOH-Puffer pH 8 zugesetzt und der pH-Wert der Lösung auf pH 7,4 gesenkt. Nach 2,5 Stunden bei Raumtemperatur und unter Lichtschutz wird die Lösung mit 1 mg Glycin (75 g/mol) abgesättigt.

Die Kopplung von Weizenkeimlektin (WGA) oder humanem Serumalbumin (HSA) an das Brij35-CDI- $\epsilon$ -Aminocaprinsäure-Konjugat erfolgte erst nach Herstellung der Mikropartikel mit dem Konjugat (siehe Kapitel 3.3). Hierfür werden 12 mg Mikropartikel in 2 ml 0,1 M MES/NaOH-Puffer pH 6 dispergiert und die an der Oberfläche vorhandenen Carboxyl-

Gruppen mittels EDC und Sulfo-NHS aktiviert. Anschließend werden der Partikelsuspension 2 mg WGA (36000 g/mol) oder 25 mg HSA (66400 g/mol) zugesetzt, der pH-Wert auf 7,4 gestellt und bei Raumtemperatur zwei Stunden gerührt. Die restlichen aktivierten Carboxylgruppen werden durch Zugabe von 1 mg Glycin und einstündige Inkubation abgesättigt.

Die Mikropartikeln werden durch drei Waschschrirte mit ddH<sub>2</sub>O und Zentrifugation bei 14000 UpM gereinigt.

### **3.2.1 Reinigung der funktionalisierten Brij35-Derivate mittels Größenausschlusschromatographie**

Die jeweiligen Stoffgemische werden nach jedem Funktionalisierungsschritt durch Größenausschlusschromatographie (ÄKTA pure system, GE Healthcare, Little Chalfort, United Kingdom) über eine HiTrap™ Desalting Säule (Sephadex G-25 Superfine; GE Healthcare) aufgetrennt. Die Proben werden mit destilliertem partikelfreiem Wasser bei einer Durchflussrate von 3 ml/Minute eluiert. Die Detektion erfolgt mittels UV-Detektor bei 280 nm und 460 nm. Die entsprechenden Fraktionen werden anschließend bei -80° C gelagert und lyophilisiert.

### **3.2.2 Abgeschwächte Totalreflektions-Fouriertransformations-Infrarotspektrometrie (ATR FT-IR) von funktionalisiertem Brij35**

Die Spektren werden mit einem ATR FT-IR-Spektrometers (Tensor 27, Bio-ATR I Tool, Bruker Optik, Ettlingen, Deutschland) aufgezeichnet, welches mit einem flüssigstickstoffgekühltem Quecksilber-Cadmium-Tellurid-Detektor ausgestattet ist. Die Proben werden auf einen Zinkselenid-ATR-Kristall aufgebracht (zuvor wurde gegen Luft nullgestellt) und mit 32 Scans im doppelseitigen Modus bei einer Auflösung von 4 cm<sup>-1</sup> im Bereich von 4000 bis 850 cm<sup>-1</sup> analysiert. Die Auswertung der Absorptionsspektren sowie die Bestimmung der Peakpositionen erfolgt unter Verwendung der OPUS 5.5-Software (Bruker Optik, Deutschland).

### **3.3 Herstellung von PLGA-Mikropartikeln mit funktionalisiertem Brij35**

Es werden 50 mg PLGA RG503H sowie 150 mg funktionalisiertes Brij35 in 1 ml Aceton und 1 ml DCM gelöst. Die weitere Herstellung erfolgt wie in Punkt 3.1 beschrieben.

#### **3.3.1 Nachweis der Aminogruppen an funktionalisierten Brij35-Konjugaten mittels Aminoassay**

Für den Nachweis einer erfolgreichen Funktionalisierung wird ein Aminoassay durchgeführt. Dies erfolgt unter Verwendung einer Fluoraldehyd<sup>TM</sup> Aminoassay-Reagenzlösung und eines Mikrotiterplatten-Readers (TECAN; Männerdorf, Schweiz) bei einer Anregungswellenlänge von 360 nm und bei einer Emissionswellenlänge von 455 nm. Ein Aliquot von 50,0 µl der Reagenzlösung wird zu 200 µl Mikropartikelsuspension (2 mg/ml) in einer Mikrotiterplatte gegeben und die Fluoreszenzintensität nach 5 min bestimmt.

#### **3.3.2 Nachweis von HSA und WGA an funktionalisierten Brij35-Derivaten mittels BCA-Assay**

Um das Vorhandensein von Proteinen an der Oberfläche der Mikropartikeln nachzuweisen, wird der BCA-Assay durchgeführt. Der Micro BCA<sup>TM</sup> Protein Assay (Thermo Fisher Scientific, USA) basiert auf der Reduktion von zweiwertigem Kupfer zu einwertigem Kupfer bei Vorliegen von Protein. Durch Chelatbildung von 2 Molekülen Bicinchoninsäure (BCA) mit einwertigem Kupfer entsteht eine violette Färbung. Diese korreliert mit der Proteinmenge und kann bei 562 nm im Mikrotiterplattenleser photometrisch gemessen werden.

Zur Quantifizierung der Proteinkonzentration werden 1 mg Partikel in 1 ml PBS-Puffer suspendiert. Es werden jeweils 150 µl der Suspension pro Well einer Mikrotiterplatte vorgelegt. Es werden jeweils 150 µl Arbeitslösung zugesetzt, welche nach Herstellerangaben bereitet wird. Sie besteht aus 25 Teilen Reagenz A (basischer Tartrat-Carbonat-Puffer; (Thermo Fisher Scientific, 2015), 24 Teilen Reagenz B (Bicinchoninsäure-Lösung) sowie einem Teil Reagenz C (Kupfersulfat-Lösung). Anschließend wird die Mikrotiterplatte mit einer Folie abgedichtet und im Mikrotiterplattenphotometer 30 Sekunden geschüttelt und danach zwei Stunden bei 37 °C inkubiert. Danach wird die Folie abgezogen und die Absorption bei 562 nm bestimmt.

### **3.3.3 Nachweis von Fluorescein-Cadaverin und Folsäure durch Fluoreszenz- bzw. Absorptionsbestimmung**

Um eine Störung der Messung durch partikuläre Strukturen (des PLGAs) zu verhindern, werden 2 mg Mikropartikel vor der Fluoreszenz- sowie vor der Folsäure-Bestimmung mittels Absorption in 1 ml 0,1 M Kaliumdihydrogenphosphatpuffer bei einem pH-Wert von 11,5 hydrolysiert. Anschließend wird die Fluoreszenz bei einer Exzitationswellenlänge von 485 nm und einer Emissionswellenlänge von 525 nm bestimmt. Die Absorption der Folsäure wird bei 360 nm ermittelt.

## 4 Ergebnisse und Diskussion

### 4.1 Charakteristika der PLGA-Testosteron-Mikropartikel

#### 4.1.1 Größenverteilung der Mikropartikel

In Abbildung 2 und Abbildung 3 sind die Größenverteilungen testosteronbeladener Mikropartikel dargestellt. Die verschiedenen Partikelchargen wurden, wie in Punkt 3.1 beschrieben, aus den PLGA-Polymer Typen RG502H (Abb. 2) und RG503H (Abb. 3) hergestellt und anschließend mittels dynamischer Lichtstreuung am Mastersizer nach der in Punkt 3.1.4 erläuterten Methode charakterisiert.

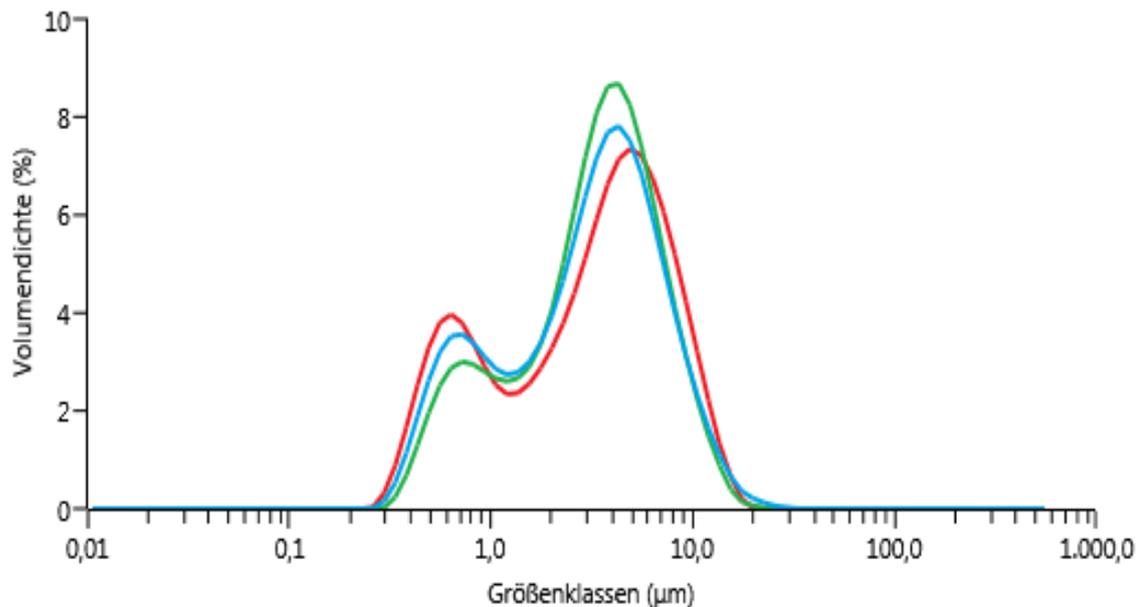


Abbildung 2: Größenverteilung von PLGA RG502H-Testosteron-Mikropartikelchargen.

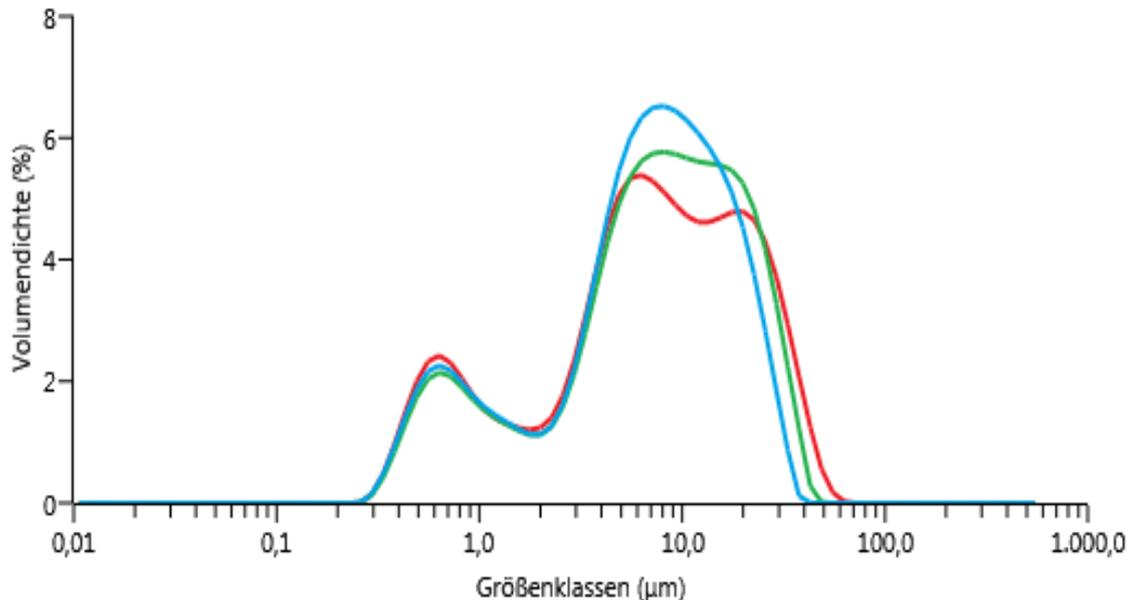


Abbildung 3: Größenverteilung von PLGA RG503H-Testosteron-Mikropartikelchargen.

In Abbildung 2 wird die Größenverteilung von testosteronbeladenen Mikropartikeln, welche aus PLGA RG502H bestehen, gezeigt. Zu sehen ist, dass sich 82,50 % der Mikropartikel in einem Größenbereich von 1,13 - 9,86  $\mu\text{m}$  befinden. Somit ergibt sich ein  $D_x(90)$  von 7,73  $\mu\text{m}$ , ein  $D_x(50)$  von 3,39  $\mu\text{m}$  und ein  $D_x(10)$  von 0,75  $\mu\text{m}$  bei einem  $D[4;3]$  von 3,92  $\mu\text{m}$ . Zum Vergleich zeigt Abbildung 3 die Größenverteilung von testosteronbeladenen Mikropartikeln, welche aus PLGA RG503H bestehen. Auch hier ist eine Verteilung im Größenbereich von 1,13 - 40,01  $\mu\text{m}$  zu sehen in dem sich 84,8 % der Mikropartikel befinden. Dadurch ergibt sich hier ein  $D_x(90)$  von 26,30  $\mu\text{m}$ , ein  $D_x(50)$  von 7,27  $\mu\text{m}$  und ein  $D_x(10)$  von 0,79  $\mu\text{m}$  bei einem  $D[4;3]$  von 10,90  $\mu\text{m}$ . Die angestrebte Partikelgröße von mindestens 1  $\mu\text{m}$  und eine akzeptable Streuung der Partikelgröße wurden daher bei beiden Polymertypen erreicht. Der direkte Vergleich der beiden Diagramme zeigt auch, dass sich die Partikelgrößenverteilung bei beiden PLGA-Typen im erwünschten Rahmen bewegt, Partikel aus PLGA RG502H jedoch eine geringere Streuung der Partikelgröße aufweisen.

#### 4.1.2 Bestimmung der Testosteronbeladung und der Einbaurrate unter Berücksichtigung der unterschiedlichen PLGA-Typen

Die Bestimmung des Testosterongehalts erfolgte mittels HPLC, wie in Punkt 3.1.2 und 3.1.3 beschrieben. In Abbildung 4 ist zu sehen, dass der verwendete PLGA-Typ keinen signifikanten Einfluss auf die Einbaueffizienz (EE) und die Wirkstoffbeladung (loading capacity, LC) der Partikel hat. Bei Partikeln, welche aus PLGA RG502H hergestellt wurden, konnten 42,87 % (s = 3,41 %; n = 8) des eingesetzten Testosterons verkapselt werden und bei Partikeln aus PLGA RG503H lag die EE bei 39,67 % (s = 3,91 %; n = 8) ( $p > 0,35$ ). Auch hinsichtlich des Wirkstoffanteils im Partikel war kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Matrixpolymeren zu beobachten ( $p > 0,4$ ). Partikel aus PLGA RG502H enthielten 10,32 % Testosteron (s = 0,82 %; n = 8), jene aus PLGA RG503H 9,61 % Steroid (s = 0,95 %; n = 8).

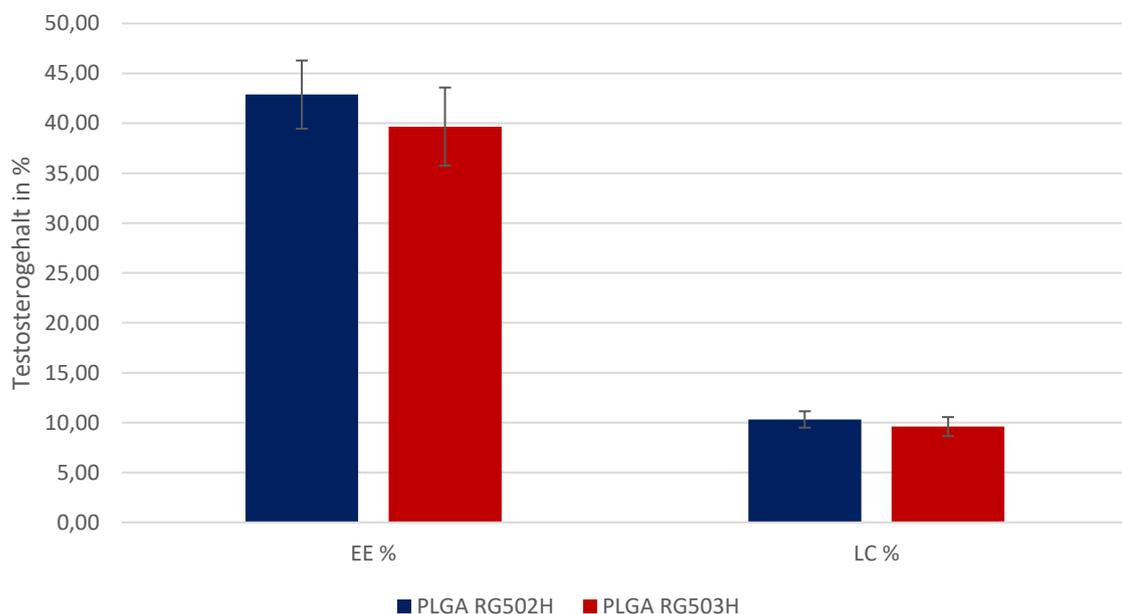


Abbildung 4: Vergleich der Einbaurrate (EE) und des Testosteron-Gehaltes von PLGA RG502H und PLGA RG503H Mikropartikeln.

### 4.1.3 Vergleich der Freisetzungprofile von PLGA-Mikropartikeln im offenen und geschlossenen System

Die Versuchsreihe wurde, wie in Punkt 3.1.1 beschrieben, in einem Freisetzungsmedium bestehend aus PBS, BSA und Tween80 durchgeführt. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C. Probenentnahmen und Wirkstoffgehaltsbestimmungen mittels HPLC wurden in vorher festgelegten regelmäßigen Intervallen durchgeführt.

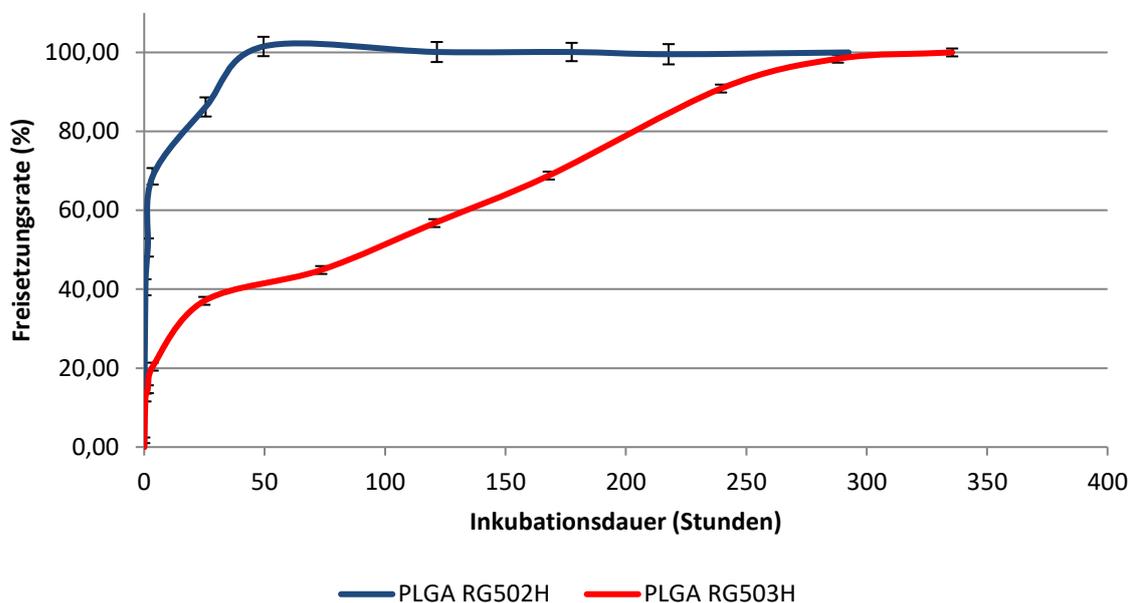


Abbildung 5: Freisetzungprofile von Testosteron aus PLGA-Mikropartikeln im offenen System.

In Abbildung 5 sind die Freisetzungskurven von Testosteron in einem offenen System zu sehen. Die Freisetzung erfolgte aus Mikropartikeln, welche mit PLGA RG502H oder PLGA RG503H hergestellt wurden. Ersichtlich ist, dass Mikropartikel, welche aus PLGA RG502H bestehen, bereits nach 3,5 h 70 % beziehungsweise nach 39 h 100 % des Testosterons freisetzen. Wohingegen jene Mikropartikel bestehend aus PLGA RG503H nach 3,5 h nur 20 % des Testosterons freisetzen und eine vollständige Freisetzung erst nach 320 h erreicht wird.

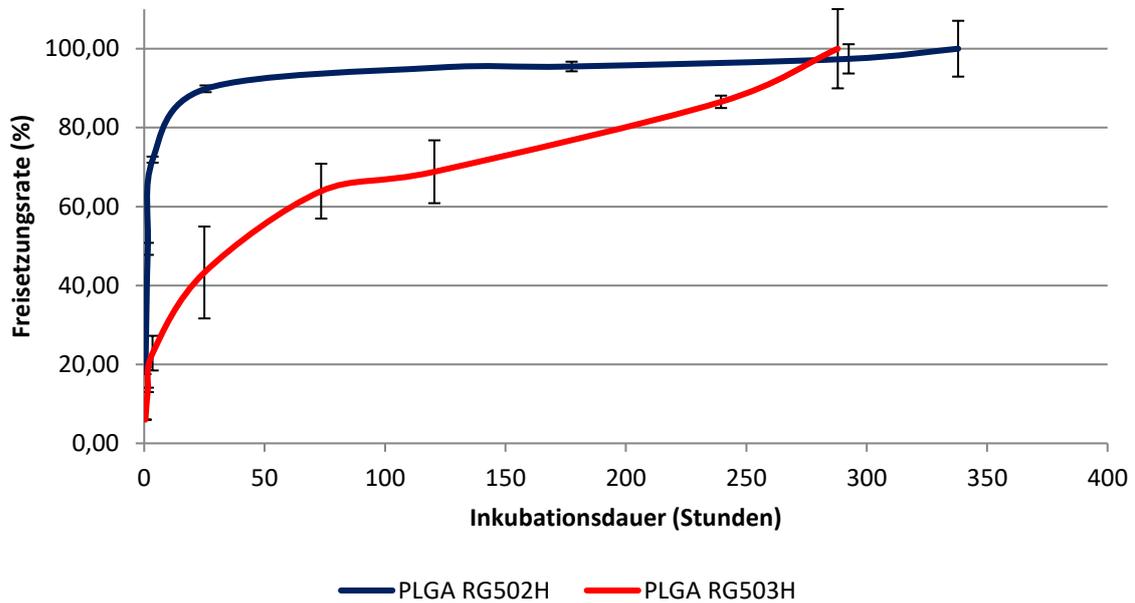


Abbildung 6: Freisetzungsprofile von Testosteron aus PLGA-Mikropartikeln im geschlossenen System.

Abbildung 6 zeigt die Freisetzung im geschlossenen System. PLGA RG502H-Mikropartikel zeigten auch in diesem Versuchsaufbau eine deutlich raschere Freisetzung als PLGA RG503H-Mikropartikel. Die Ergebnisse der Testosteronfreisetzung im geschlossenen System bestätigten die Ergebnisse aus dem offenen System. In beiden Systemen trat ein hoher burst-release von 70 % bei PLGA RG502H Mikropartikeln auf. Wahrscheinlich aufgrund des höheren Molekulargewichts von PLGA RG503H war diese starke Freisetzungsrate zu Beginn deutlich vermindert. Dem burst-release von nur 20 % folgte eine kontinuierliche, beinahe lineare Testosteron-Freisetzung aus PLGA RG503H-Mikropartikeln über die nächsten 300 Stunden.

## 4.2 Funktionalisierung von Brij35 mit CDI unter Verwendung von Fluorescein-Cadaverin, 1,8-Diamino-3,6-dioxaoctan und $\epsilon$ -Aminocapronsäure

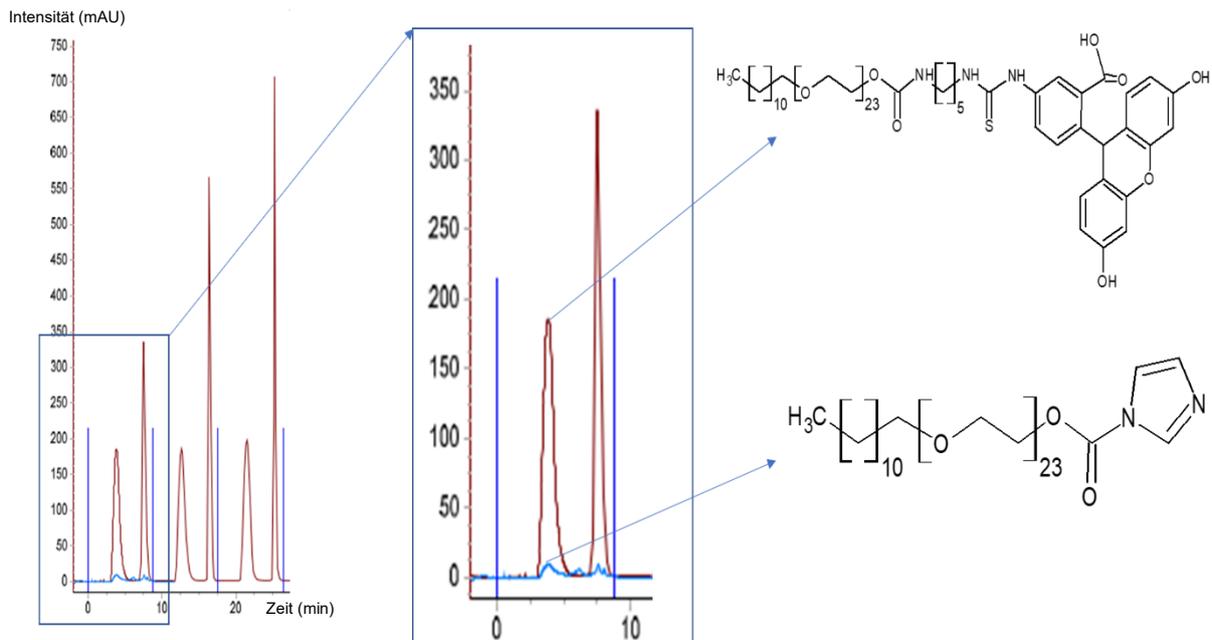


Abbildung 7: Chromatogramm des Brij-CDI und Brij-CDI-Fluorescein-Cadaverin-Konjugats nach Auftrennung durch Größenausschlusschromatographie.

Die Herstellung eines Brij35-Imidazolcarbamate-Derivates erfolgte durch Einsatz von CDI-vermittelter Aktivierung in Dioxan. Die weitere Funktionalisierung mit Fluorescein-Cadaverin, 1,8-Diamino-3,6-dioxaoctan und  $\epsilon$ -Aminocapronsäure wurde in einem Natriumtetraborat-Puffer, wie in Punkt 3.2 beschrieben, durchgeführt. Gereinigt wurden die Produkte, wie in Punkt 3.2.1 angeführt, mittels Größenausschlusschromatographie über eine HiTrap™ Desalting Säule. Als flüssige Phase wurde destilliertes partikelfreies Wasser verwendet und die UV-Detektion erfolgte bei einer Wellenlänge von 280 nm. Das in Abbildung 7 dargestellte Chromatogramm zeigt die Retentionszeit in Minuten und die Absorption bei einer Wellenlänge von 280 nm. In hellblau, bei einer Retentionszeit von 4 Minuten wird das vermeintliche Brij35-Imidazolcarbamate-Derivat in einer bis zu 10 mAU verursachenden Menge eluiert.

Zur Überprüfung der erfolgreichen Derivatisierung wurde ein starkes Chromophor, nämlich Fluorescein-Cadaverin, über die Aminogruppe an das aktivierte Brij gebunden. Durch Einführung dieses Chromophors konnte gezeigt werden, dass eine Bindung an das aktivierte

Brij-Derivat möglich ist und somit ein Carbamatlinker vorhanden sein muss. In Abbildung 7 stammt der erste rote Peak vom Fluorescein-Brij-Konjugat, das bei derselben Retentionszeit wie der erste blaue Peak des Brij-Imidazolcarbammat-Derivates erscheint. Jedoch weist dieser aufgrund des chromophoren Systems eine sehr viel höhere Absorption von nahezu 180 mAU auf.

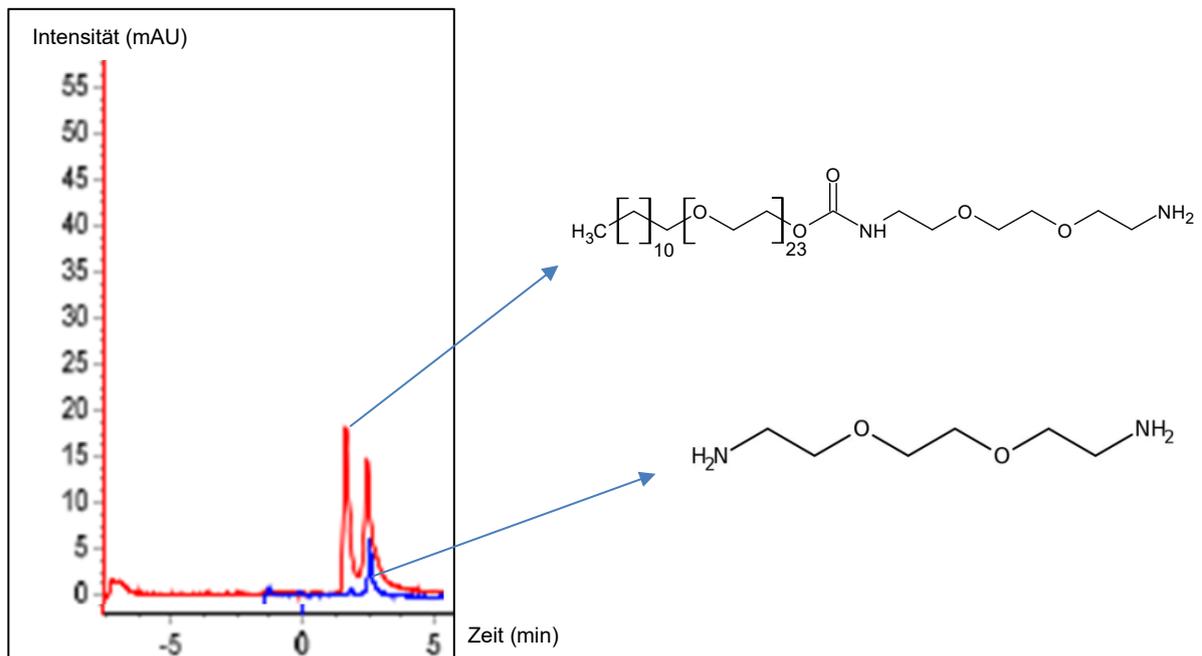


Abbildung 8: Chromatogramm zur Überprüfung des CDI-Funktionalisierungsschrittes unter Verwendung von 1,8-Diamino-3,6-dioxaoctan.

Auch Abbildung 8 zeigt ein Chromatogramm, welches zur Bestätigung der erfolgreichen Funktionalisierung von Brij mit 1,8-Diamino-3,6-dioxaoctan mit Hilfe von CDI herangezogen wurde. Im Chromatogramm entspricht die blaue Linie dem Elutionsverlauf von 1,8-Diamino-3,6-dioxaoctan, welches eine Retentionszeit von 2,5 Minuten aufweist. In rot ist das Brij-1,8-Diamino-3,6-dioxaoctan-Derivat dargestellt, welches einen Peak bei 2 Minuten zeigt, wobei sich diese Retentionszeitverschiebung auf die Zunahme des Molekulargewichts zurückführen lässt. Der überproportionale Anstieg der Absorption dieses Peaks aufgrund der Bindung des Brij-Imidazolcarbammat-Derivates an 1,8-Diamino-3,6-dioxaoctan lässt darauf schließen, dass auch hier der Carbamatlinker durch den Einsatz von CDI erfolgreich eingeführt wurde und zusätzlich eine Bindung an 1,8-Diamino-3,6-dioxaoctan möglich ist.

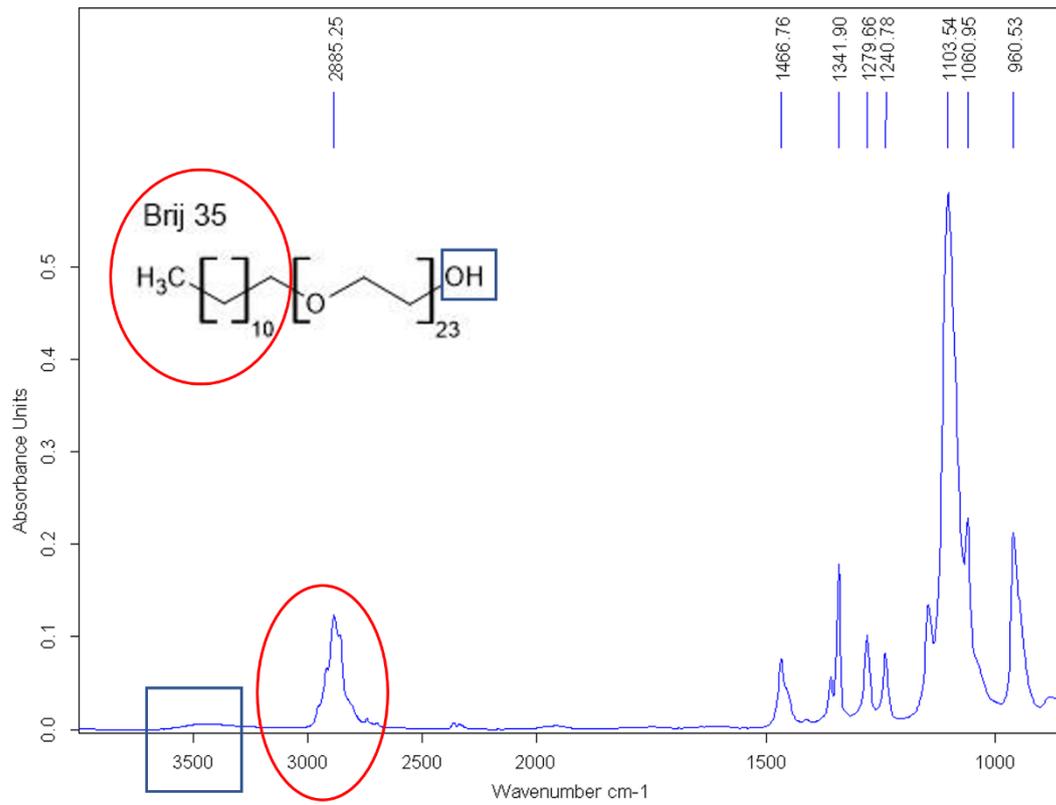


Abbildung 9: IR-Spektrum von Brij35.

Die erfolgreiche Funktionalisierung wurde auch mittels ATR FT-IR Spektroskopie nachgewiesen, die wie in Punkt 3.2 und 3.2.2 beschrieben ausgeführt wurde. Das IR-Spektrum von reinem Brij35 zeigt ein charakteristisches Absorptionsmuster von Kohlenwasserstoffen (rot) mit Peak bei einer Wellenlänge von 2885 cm<sup>-1</sup> sowie die breiten Schwingungen der OH-Gruppen (dunkelblau) bei einer Wellenlänge um 3500 cm<sup>-1</sup>.

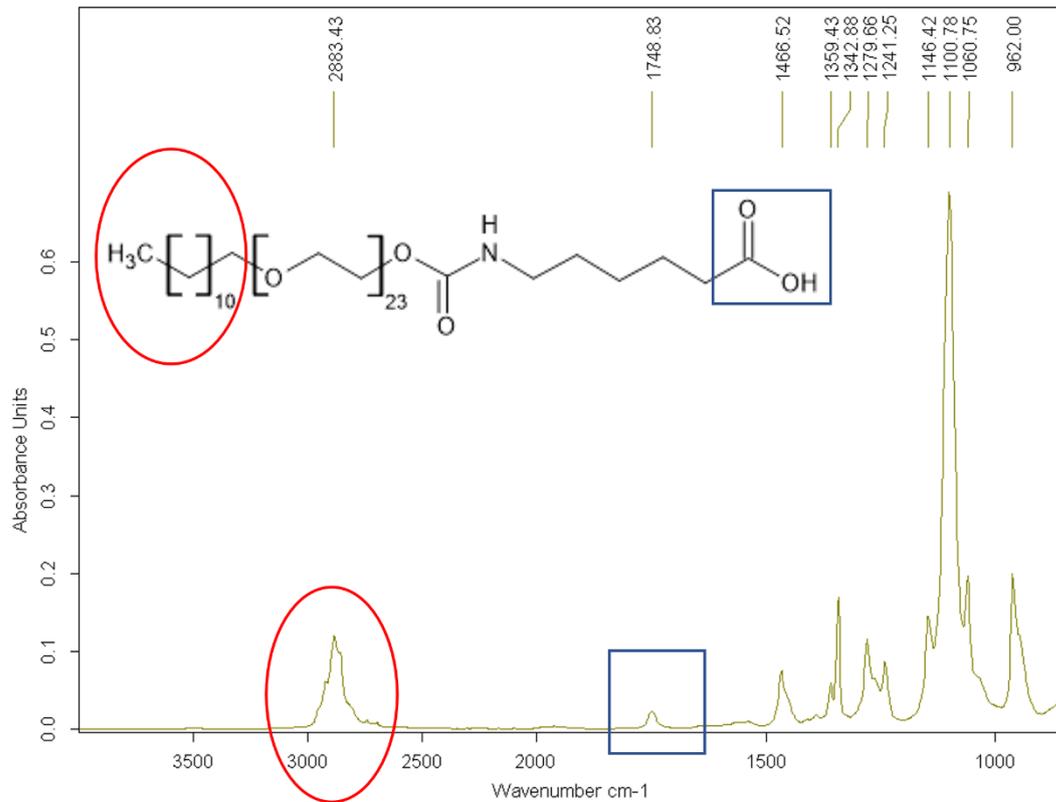


Abbildung 10: IR-Spektrum eines Brij 35-ε-Aminocapronsäurederivats.

Im Vergleich dazu zeigt das Spektrum des Brij 35-ε-Aminocapronsäurederivats in Abbildung 10 einerseits das gleiche Bandenmuster wie Brij35 bei einer Wellenlänge von  $2883\text{ cm}^{-1}$ , welches ebenfalls auf die Kohlenwasserstoffe zurückzuführen ist. Andererseits ist die breite OH-Bande im Bereich um  $3500\text{ cm}^{-1}$  wie zu erwarten nicht mehr zu sehen, da durch die Derivatisierung diese auch nicht mehr vorhanden sein sollte. Zusätzlich erscheint eine Bande bei  $1748\text{ cm}^{-1}$ , welche auf eine Carboxylgruppe hinweist. Somit konnte auch durch ein IR-Spektrum gezeigt werden, dass erfolgreich ein Carbamatlinker eingebracht wurde und eine weitere Derivatisierung mit ε-Aminocapronsäure zu einem reaktiven Carboxyl-derivat möglich ist.

### 4.3 Spektroskopische Charakterisierung von PLGA-Partikeln, welche mit verschiedenen Brij35-Derivaten hergestellt wurden

Die Herstellung der Partikel erfolgte wie in Punkt 3.3 angeführt durch eine Solvent Evaporation Methode. PLGA RG503H sowie funktionalisiertes Brij35 wurden in Aceton und Dichlormethan gelöst. Im Anschluss wurde eine 5 %ige Polyvinylalkohol-Lösung als Non-Solvent zugesetzt und die Reaktionsmischung homogenisiert.

Die Bestimmung des HSA-Gehalts erfolgte wie in Punkt 3.3.2 beschrieben durch einen BCA-Assay. Als Negativkontrolle dienten Mikropartikel mit Brij35 ohne Carbamatlinker, wobei das Tensid im Falle der Fluorescein-Cadaverin-Derivate zuvor die gleichen Aktivierungs- und Kopplungsschritte durchlaufen hat wie auch jenes mit Carbamatlinker. Bei den Partikeln zur Kontrolle der HSA-Derivate erfolgten die Aktivierungs- und Kopplungsschritte nach der Partikelherstellung.

Vor der fluorimetrischen Bestimmung von Fluorescein-Cadaverin wurden die Partikel in einem Kaliumhydrogenphosphatpuffer pH 11,5 hydrolysiert und bei einer Exzitationswellenlänge von 485 nm und einer Emissionswellenlänge von 525 nm die Fluoreszenzintensität bestimmt. (Punkt 3.3.3)

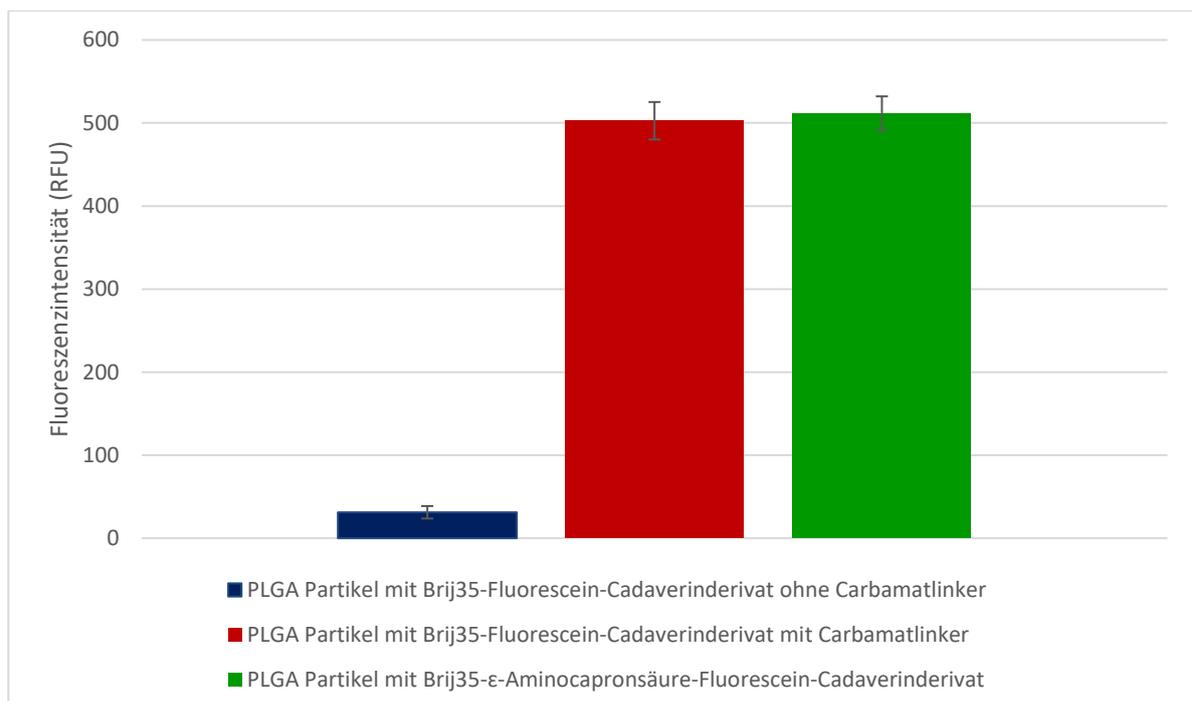


Abbildung 11: Fluoreszenzintensität von PLGA-Partikeln, die Brij35-Fluorescein-Cadaverinderivate enthalten.

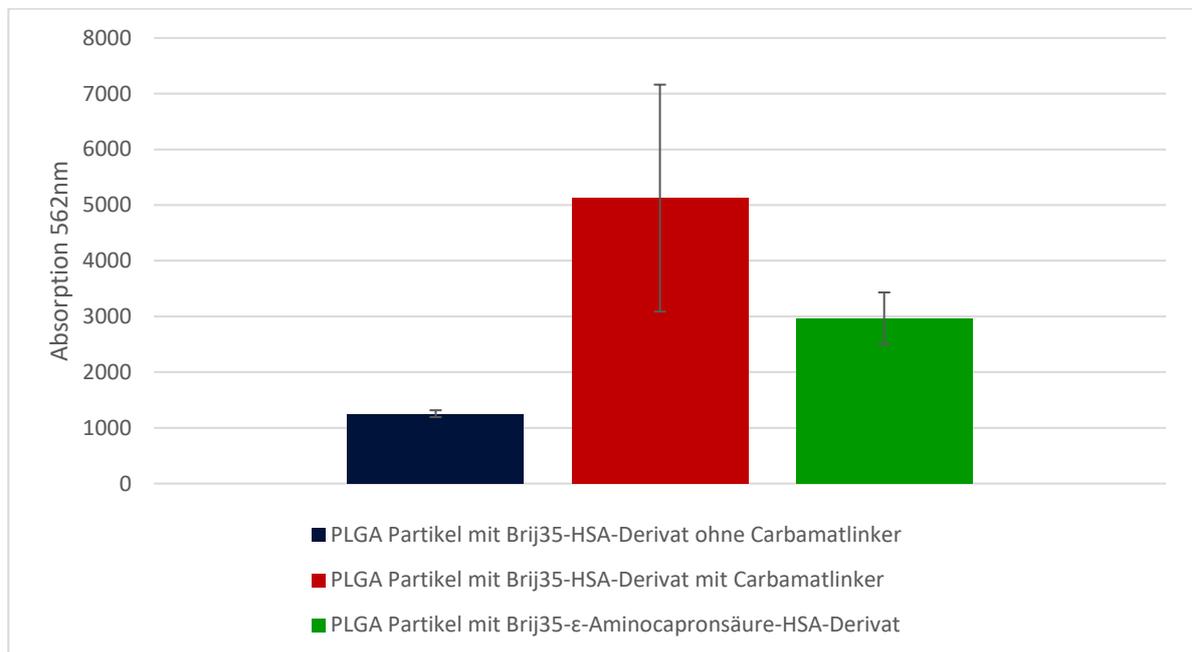


Abbildung 12: Absorption von PLGA-Partikeln, die Brij35-HSA Konjugate enthalten, im BCA-Assay.

Abbildung 11 und Abbildung 12 zeigen die Fluoreszenzintensitäten bzw. Absorption von unterschiedlichen Brij35-Fluorescein-Cadaverin- beziehungsweise HSA-Derivaten, welche für die Herstellung der Partikel verwendet wurden. Die blauen Balken zeigen jeweils Partikel, die mit Brij35-Fluorescein- oder HSA-Derivaten ohne Carbamatlinker hergestellt wurden. Sie dienen hier als Referenz und stellen die Negativkontrolle dar. Die roten und grünen Balken entsprechen Partikeln, bei deren Herstellung Brij35-Derivate mit Carbamatlinker eingesetzt wurden. Sowohl bei den Partikeln mit Fluorescein-Cadaverin, welches vor der Partikelherstellung konjugiert wurde als auch bei den Partikeln mit HSA-Kopplung, welche nach der Partikelherstellung erfolgte, war die Intensität der Fluoreszenz bzw. Absorption wesentlich höher. Dies lässt auf einen erfolgreichen Einbau der Derivate in die Partikel schließen.

Die Herstellung von Partikeln mit Brij35-WGA-Derivaten sowie mit Brij35-Folsäurederivaten lieferte bisher keine aussagekräftigen Ergebnisse und ist derzeit noch im Stadium der Optimierung.

## 5 Schlussfolgerungen

Aufgrund ihrer hohen Biokompatibilität und biologischen Abbaubarkeit haben sich PLGA-Polymere als hervorragende Trägerstoffe für die kontrollierte Freigabe und Verabreichung von Arzneimitteln erwiesen. Wie eindrucksvoll gezeigt wurde, kann der PLGA-Abbau und damit die Arzneimittelfreisetzungsraten durch das unterschiedliche Molekulargewicht der PLGA-Polymere gesteuert werden. Somit ist dies ein wichtiger und sogleich einfach zu kontrollierender Faktor, um den Abbau und damit die Wirkstofffreisetzung für die gewünschte Anwendung zu steuern. Daher wird für eine raschere Freisetzung ein Polymer mit niedrigem Molekulargewicht empfohlen. Für eine verzögerte und langanhaltende Freisetzung wäre die Wahl eines Polymers mit hohem Molekulargewicht angemessen. Darüber hinaus konnte in dieser Arbeit an Hand von Testosteron-Mikropartikeln gezeigt werden, dass sich PLGA ausgezeichnet zur Formulierung von homogenen Mikropartikeln eignet. Somit ermöglicht die Verwendung von PLGA-Polymeren nicht nur den Einsatz einer breiten Palette von Arzneimitteln, welche eingekapselt werden können, sondern darüber hinaus stellt es ein relativ einfaches System mit gut zu steuernden Freisetzungsraten und Freisetzungsraten dar.

Um die Effizienz solcher PLGA-Mikropartikelsysteme noch weiter zu erhöhen, gibt es die Möglichkeit der Oberflächenoptimierung, die anhand des nichtionogenen Tensids Brij35™ im zweiten Teil dieser Arbeit thematisiert wird. Hierzu wurde an der terminalen OH-Gruppe des Lauryl-polyethylenglykoles mittels Carbonyldiimidazol ein Carbamatlinker geschaffen. Das Gelingen und die Effizienz dieses ersten Konjugationsschrittes wurde durch Größenausschlusschromatographie und UV-Spektrometrie untersucht und nachgewiesen. Um die vielfältige Anwendbarkeit des Brij-Carbamat-Konjugates zu untersuchen, kamen unterschiedlichste Substanzen mit Indikator- oder Ankerfunktion wie Fluorescein-Cadaverin, 1,8-Diamino-3,6-dioxaoctan,  $\epsilon$ -Aminocaprinsäure oder HSA zum Einsatz. In all diesen Fällen konnte nicht nur bewiesen werden, dass eine erfolgreiche Konjugation an Brij möglich ist, sondern zusätzlich, dass eine Modifikation des Brij-Konjugates mit den oben genannten Molekülen sowohl vor dem Einbau dieser Konjugate in die PLGA-Partikel als auch nach dem Einbau in die Partikel möglich ist. Durch diese Flexibilität ergibt sich ein enorm breites Einsatzgebiet, wobei die Grenzen dieser Plattformtechnologie noch nicht abzusehen sind.

## Literaturverzeichnis

- Antonios Vlachopoulos, G. K. (2022). Poly(Lactic Acid)-Based Microparticles for Drug Delivery. pharmaceutics. doi:<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14020359>*
- Hermanson, G. T. (1996). Bioconjugate Techniques. Academic Press.*
- Magdalena Stevanovi, D. U. (2009). Poly(lactide-co-glycolide)-based Micro and Nanoparticles for the Controlled Drug Delivery of Vitamins. Current Nanoscience. doi:10.2174/157341309787314566*
- Mazen M. El-Hammadi, J. L. (2022). Recent Advances in the Surface Functionalization of PLGA-Based Nanomedicines. nanomaterials. doi:<https://doi.org/10.3390/nano12030354>*
- Siegel, H. K. (2011). Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier. (Basel). doi:<https://doi.org/10.3390/polym3031377>*
- Thermo Fisher Scientific. (2015). Micro BCA™ Reagent A (MA). Abgerufen am 18.. 05. 2021 von <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/23231#/23231>*
- Wei Xiong, S. H. (15. August 2021). Brij-functionalized chitosan nanocarrier system enhances the intestinal permeability of P-glycoprotein substrate-like drugs. Carbohydrate Polymers. doi:<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118112>*

## Abbildungsverzeichnis

<i>Abbildung 1: N, N'-Carbonyldiimidazol kann zur Aktivierung von terminalen Hydroxidgruppen von PEG zu Imidazol-carbamaten verwendet werden. (Hermanson, 1996) .....</i>	<i>15</i>
<i>Abbildung 2: Größenverteilung von PLGA RG502H-Testosteron-Mikropartikelchargen.....</i>	<i>20</i>
<i>Abbildung 3: Größenverteilung von PLGA RG503H-Testosteron-Mikropartikelchargen.....</i>	<i>21</i>
<i>Abbildung 4: Vergleich der Einbaurrate (EE) und des Testosteron-Gehaltes von PLGA RG502H und PLGA RG503H Mikropartikeln. ....</i>	<i>22</i>
<i>Abbildung 5: Freisetzungsprofile von Testosteron aus PLGA-Mikropartikeln im offenen System. ....</i>	<i>23</i>
<i>Abbildung 6: Freisetzungsprofile von Testosteron aus PLGA-Mikropartikeln im geschlossenen System. ....</i>	<i>24</i>
<i>Abbildung 7: Chromatogramm des Brij-CDI und Brij-CDI-Fluorescein-Cadaverin-Konjugats nach Auftrennung durch Größenausschlusschromatographie. ....</i>	<i>25</i>
<i>Abbildung 8: Chromatogramm zur Überprüfung des CDI-Funktionalisierungsschrittes unter Verwendung von 1,8-Diamino-3,6-dioxaoctan. ....</i>	<i>26</i>
<i>Abbildung 9: IR-Spektrum von Brij35.....</i>	<i>27</i>
<i>Abbildung 10: IR-Spektrum eines Brij 35-ε-Aminocapronsäurederivats. ....</i>	<i>28</i>
<i>Abbildung 11: Fluoreszenzintensität von PLGA-Partikeln, die Brij35-Fluorescein-Cadaverinderivate enthalten.....</i>	<i>29</i>
<i>Abbildung 12: Absorption von PLGA-Partikeln, die Brij35-HSA Konjugate enthalten, im BCA-Assay. ....</i>	<i>30</i>