

Anwendung von Quality by Design zur  
Optimierung von Herstellungsmethoden  
für Polymernanopartikel als  
Wirkstoffträger

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Vorgelegt von

Anna-Maria Struzek

Kiel, 2025



Erste Gutachterin: Prof. Dr. Regina Scherließ

Zweite Gutachterin: Prof. Dr. Karin Schwarz

Tag der mündlichen Prüfung: 28.11.2025



Für meine Familie

Das Fehlen einer besonderen Kennzeichnung oder eines entsprechenden Hinweises auf ein Warenzeichen, ein Gebrauchsmuster oder einen Patentschutz lässt nicht den Schluss zu, dass über die in dieser Arbeit angegebenen Dinge frei verfügt werden kann.

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht als:

#### Wissenschaftliche Artikel

Struzek, A.-M.; Scherließ, R. Quality by Design as a Tool in the Optimisation of Nanoparticle Preparation – A Case Study of PLGA Nanoparticles. *Pharmaceutics* 2023, 15, doi:10.3390/pharmaceutics15020617

#### Konferenzbeiträge – Posterpräsentationen

Struzek, A.-M.; Scherließ, R., Controlled preparation of  $\beta$ -glucan particles by spray drying, 3<sup>rd</sup> European Conference on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, Italien (2019)

Struzek, A.-M.; Ellefsen, C. F.; Samuelsen, A. B. C.; Scherließ, R., Immune activation of different micro- and nanoparticulate materials, Nordic POP Annual Meeting, Finnland (2022)

Struzek, A.-M.; Scherließ, R., Process Control and Performance of PLGA Nanoparticles, World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, Niederlande (2022)



# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Zielsetzung.....	1
1.1	Einleitung .....	1
1.2	Zielsetzung .....	3
2	Theoretischer Hintergrund .....	4
2.1	Nanopartikel .....	4
2.2	Grundlagen zur Herstellung von Polymernanopartikeln .....	6
2.3	Quality by Design.....	10
2.4	Grundlagen zur statistischen Versuchsplanung .....	13
2.4.1	Arten von statistischen Versuchsplänen.....	16
3	Materialien.....	19
3.1	Ovalbumin .....	19
3.2	Polylactid-co-Glycolid.....	19
3.3	Chitosan .....	20
3.4	Carboxymethylcurdlan.....	21
3.5	Carboxymethylcellulose Natrium .....	22
3.6	Beta-Glucane .....	22
3.7	Polyvinylalkohol .....	22
3.8	Mannitol .....	23
3.9	Ethylacetat .....	23
3.10	Wasser.....	23
3.11	Phosphatpuffer .....	23
4	Methoden .....	24
4.1	Präparative Methoden.....	24
4.1.1	Doppelemulsion-Lösungsmittelvevaporationsmethode .....	24

4.1.2	Ionische Gelierung.....	25
4.1.3	Aufreinigung .....	26
4.1.4	Gefriertrocknung.....	26
4.1.5	Sprühtrocknung .....	27
4.2	Analytische Methoden.....	29
4.2.1	Bestimmung der Partikelgröße und Partikelgrößenverteilung mittels dynamischer Lichtstreuung .....	29
4.2.2	Bestimmung der Partikelgröße mittels Laserlichtbeugung .....	31
4.2.3	Bestimmung des Zeta-Potentials.....	32
4.2.4	Bestimmung des isoelektrischen Punkts mittels Zeta-Potentialmessung .....	33
4.2.5	Bestimmung des Proteingehaltes und der Beladungseffizienz .....	34
4.2.6	Visualisierung der Partikel mittels Rasterelektronenmikroskop.....	35
4.2.7	Wirkstofffreisetzung .....	35
4.3	Mathematische und statistische Methoden .....	36
4.3.1	Deskriptive Statistik.....	36
4.3.2	Statistische Versuchsplanung.....	36
5	Ergebnisse und Diskussion.....	39
5.1	Entwicklung von PLGA-Nanopartikeln mittels Doppelemulsions-Lösungsmittelveaporationsmethode.....	39
5.1.1	Ziel der Entwicklung und Definition des Zielproduktes .....	39
5.1.2	Auswahl der kritischen Qualitätsmerkmale .....	41
5.1.3	Praktisches Vorgehen und Vorversuche .....	43
5.1.4	Herstellung mittels Rotor-Stator-Homogenisator .....	45
5.1.5	Herstellung mittels Ultraschallhomogenisator.....	61
5.1.6	Herstellung mittels Rotor-Stator-Homogenisator und Ultraschallhomogenisator.....	79

5.1.7	Weitere Untersuchungen der PLGA-Nanopartikel .....	88
5.1.8	Auswertung PLGA-Nanopartikel-Herstellung .....	94
5.1.9	Fazit der PLGA-Nanopartikel Entwicklung .....	98
5.2	Entwicklung von Chitosan-Carboxymethylcellulose-Nanopartikeln mittels ionischer Gelierung .....	99
5.2.1	Ziel der Entwicklung und Definition des Zielproduktes .....	99
5.2.2	Auswahl der Zielgrößen und der zu untersuchenden Prozessparameter .....	99
5.2.3	Ladung der Polymere in Abhängigkeit zum pH-Wert.....	100
5.2.4	Identifikation der signifikanten Parameter mittels Screening-Versuchsplan.....	101
5.2.5	Weitere Optimierung mittels Wirkungsflächenversuchsplan .....	107
5.2.6	Herstellung und Charakterisierung der finalen Partikel .....	113
5.2.7	Visualisierung von Chitosan-Carboxymethylcellulose Nanopartikeln .....	117
5.2.8	Fazit .....	118
5.3	Herstellung von Chitosan-Carboxymethylcudlan Partikeln mittels ionischer Gelierung	120
5.3.1	Ladungen der Ausgangssubstanzen bei verschiedenen pH-Werten.....	120
5.3.2	Variation des pH-Wertes der Ionischen Gelierung .....	121
5.3.3	Variation des Massenverhältnisses.....	122
5.3.4	Fazit .....	123
5.3.5	Ausblick .....	123
5.4	Herstellung von Chitosan Mikro- und Nanopartikeln mittels Sprühtrocknung.....	124
5.4.1	Herstellung von Chitosan-Partikeln mittels Mini-Sprühtrockner .....	125
5.4.2	Herstellung von Chitosan-Partikeln mittels Nano-Sprühtrockner .....	130
5.4.3	Fazit .....	132
5.5	Herstellung von Beta-Glucan Partikeln mittels Sprühtrocknung.....	134

5.5.1	Untersuchen des Herstellungsprozesses mittels vollfaktoriellen Versuchsplan .....	134
5.5.2	Fazit .....	138
5.6	Vergleich der verschiedenen Herstellungsmethoden .....	139
6	Gesamtfazit.....	147
7	Zusammenfassung.....	153
8	Abstract (english version) .....	154
9	Anhang .....	155
9.1	Verwendete Abkürzungen .....	155
10	Literatur .....	159

# 1 Einleitung und Zielsetzung

## 1.1 Einleitung

Die Nanotechnologie ist eine der Schlüsseltechnologien des 21. Jahrhunderts und findet Anwendung in vielen technischen, physikalischen und chemischen Bereichen [1]. Auch in der Medizin gewinnt die Nanotechnologie immer mehr an Bedeutung. Die sogenannte Nanomedizin bietet daher ein enormes Potential Innovationen zu schaffen und neue Anwendungsgebiete zu erschließen [2].

Eine wesentliche Unterkategorie der Nanomedizin bilden die Nanopharmazeutika, die zur Diagnose, Prävention und Therapie von Krankheiten eingesetzt werden können. Bei der Therapie von Krankheiten können Nanopartikel als Träger für Wirkstoffe fungieren, um diese zu ihrem Zielort zu bringen [3]. Aufgrund der geringen Größe können sie leicht in den Körper eindringen und gezielt zu bestimmten Geweben oder Zellen gelangen. Nanopharmazeutika können auch pharmakologisch aktive Substanzen sein, deren Partikelgröße im Nanometerbereich liegt. Durch Erhöhung des Oberfläche-zu-Volumen-Verhältnisses bei gleichzeitiger Verringerung des Partikeldurchmessers können bestimmte Eigenschaften der Substanzen verändert werden [4]. Dies ermöglicht einen präziseren und effizienteren Einsatz von Wirkstoffen, reduziert potenzielle Nebenwirkungen und verbessert die Wirksamkeit von Medikamenten. Das gleiche Prinzip kann man sich bei der Bildgebung *in vivo* zunutze machen, wenn sich Kontrastmittel in dem Gewebe, das untersucht werden soll, anreichert oder in der Prävention von Krankheiten, um Antigene einer Schutzimpfung gezielt in Immunzellen zu transportieren [5,6].

Während viele innovative Ansätze noch weiter erforscht werden und vermutlich erst in Jahren ihren Einsatz am Menschen finden, sind andere Nanopharmazeutika bereits fester Bestandteil bestimmter Therapien. Besonders in der Tumorthherapie werden seit Jahren nanopartikuläre Träger genutzt, um die Wirksamkeit zu erhöhen und Nebenwirkungen zu verringern. 1995 wurde Doxil® von der FDA zugelassen [7]. Bei Doxil® handelt es sich um das Zytostatikum Doxorubicin, das in 80-100 nm große Partikel aus einer Doppellipidschicht, sogenannten Liposomen, eingeschlossen ist. Für die Behandlung des Mammakarzinoms wurde 2008 Abraxane® zugelassen, ein Medikament, bei dem das Zytostatikum Paclitaxel an Albumin gebunden ist. Die ca. 130 nm großen Partikel reichern sich im Tumorgewebe an und führen so zu einer erhöhten Wirksamkeit [8].

Einen der größten Erfolge hatte die Nanotechnologie bei der Impfkampagne zur Bekämpfung der Covid-19 Pandemie. Nanopartikelartige Formulierungen zeigten bei der Entwicklung von Schutzimpfungen gegen den SARS-CoV-2 Erreger diverse Vorteile: Durch das Verpacken der mRNA in eine Lipidhülle wird sie vor dem Abbau geschützt [9]. Zudem erleichtert der nanopartikelartige Träger aufgrund seiner Größe die Aufnahme in die Zellen des Immunsystems. Dadurch wird die Immunogenität, also die Wirksamkeit, des Impfstoffes verbessert. Dieses Prinzip der Vakzinierung wird bei den Impfstoffen der Firmen Pfizer-BioNTech und Moderna eingesetzt, die beide eine hohe Schutzwirkung gegen Covid-19 aufweisen [10].

Auch wenn die Nanomedizin erste große Erfolge erzielen konnte, steht man bei der Entwicklung neuer Produkte vor diversen Herausforderungen. Bei der Herstellung von Nanopartikeln und nanopartikelartigen Trägern ist die Kontrolle über den Herstellungsprozess und die Eigenschaften des Endproduktes, vor allem der Partikelgröße, eine der wichtigsten Aufgaben [11]. Weitere Eigenschaften und Funktionen der Partikel, wie die Biodistribution und Sicherheit, hängen stark von ihrer Größe ab. Eine weitere Herausforderung ist es Methoden zu entwickeln, die hochskalierbar sind [12]. Viele Methoden sind nur mäßig geeignet, um eine ausreichende Menge an Partikeln mit konstanter Qualität zu liefern. Zudem neigen Nanopartikel aufgrund der großen Oberfläche zu physikalischer und chemischer Instabilität, besonders zur Agglomeration. Es müssen stabile Formulierungen entwickelt werden, um eine ausreichende Stabilität über die gesamte Laufzeit zu gewährleisten.

Auch die Charakterisierung des Produktes birgt besondere Herausforderungen. Da die Partikel zu klein sind, um sie mit herkömmlichen optischen Mikroskopen zu visualisieren, braucht man moderne Techniken, um ihre Größe, Form und Oberflächeneigenschaften zu bestimmen. Um die Eigenschaften der Partikel umfassend zu charakterisieren, ist eine Kombination vieler innovativer analytischer Verfahren notwendig [13].

Aufgrund möglicher Eigenschaftsänderungen von Materialien im Nanobereich, sollte der Sicherheit bei der Anwendung am Menschen große Aufmerksamkeit geschenkt werden. Gefahr und zugleich große Chance ist die veränderte Biodistribution kleiner Partikel im Körper. Partikel unter 1000 nm können je nach ihrer Größe unterschiedliche Gewebe und Organe erreichen. Während man sich diesen Effekt im Drug Targeting zunutze macht, kann es auch negative gesundheitliche Folgen haben, wenn bei klassischer Anwendung nicht toxische Substanzen an Orte im Körper

gelangen, an denen sie Schaden anrichten können. Wenn zusätzlich die Elimination der Partikel nicht erfolgt, können schädliche Stoffe über einen längeren Zeitraum im Körper akkumulieren.

Um die Qualität und Sicherheit von Nanopharmazeutika gewährleisten zu können, sind bei der Herstellung ein gutes Prozessverständnis und sorgfältige Prozesskontrolle erforderlich.

### 1.2 Zielsetzung

Das Ziel dieser Arbeit ist es, Strategien zu entwickeln, wie Polymernanopartikel als Wirkstoffträger hergestellt werden können, die genau definierte Eigenschaften besitzen. Die Partikeleigenschaften sollen dazu führen, dass der Wirkstoff an seinen Wirkort gelangt. Für die Herstellung dieser maßgeschneiderten Partikel ist ein umfangreiches Prozessverständnis erforderlich. Um reproduzierbar Partikel herzustellen, die konstant die erforderliche Qualität aufweisen, müssen die Herstellungsprozesse zusätzlich gut kontrollierbar sein.

Für die Umsetzung dieses Ziels soll ein systematischer Ansatz gewählt werden, der sich auf die verfahrenstechnischen Aspekte der Nanopartikelherstellung konzentriert und als Vorlage für zukünftige Herstellprozesse dienen kann. Nach den Prinzipien von Quality by Design und unter Anwendung der statistischen Versuchsplanung soll eine Herstellungsmethode detailliert untersucht und optimiert werden, Partikel mit definierten Eigenschaften hergestellt und in eine stabile Form überführt werden. Dabei sollen sowohl die Eigenschaften, die der Wirkstoff mitbringt, als auch die Eigenschaften der Polymere mit einbezogen werden.

Zusätzlich sollen verschiedene Herstellungsmethoden untereinander verglichen werden. Dabei liegt der Fokus auf den partikelgenerierenden Herstellungsschritten, für die Gemeinsamkeiten und Unterschiede herausgearbeitet werden sollen. Dadurch soll das Verständnis verbessert werden, wie aus unterschiedlichen Polymeren schnell, einfach und zielsicher nanopartikuläre Wirkstoffträger hergestellt werden können.

Die hergestellten Partikel sollen während des Optimierungsprozesses regelmäßig auf ihre definierten Zieleigenschaften analysiert werden. Die optimierten Partikel sollen am Ende des Herstellungsprozesses ausführlich charakterisiert werden.

## 2 Theoretischer Hintergrund

### 2.1 Nanopartikel

Nanopartikel ist ein Überbegriff, der Teilchen beschreibt, deren Dimensionen im Nanometerbereich liegen. Dieser Bereich wird im Allgemeinen von 1 nm bis 100 nm definiert, je nach Anwendungsgebiet aber auch bis zu 1000 nm [14]. Bei der Definition dieses Bereiches kommt es weniger auf die genaue Größe der Partikel an, sondern viel mehr auf die Eigenschaften, die ein Material durch die Nanoskalierung erhält. Für die pharmazeutische Anwendung bietet das Skalieren eines Materials auf Größen unter 1000 nm die Möglichkeit, natürliche Barrieren zu überwinden und so Bereiche für Wirkstoffe zugänglich oder besser zugänglich zu machen, als es größere Partikel können [15]. Je nachdem wie groß diese Partikel sind, überwinden sie unterschiedliche Barrieren und können dementsprechend in unterschiedliche Gewebe gelangen. Sind Partikel kleiner als 10 nm können sie abhängig von ihrer Form und Ladung die Blut-Harn-Schranke passieren und werden über die Niere ausgeschieden [16]. Sind Partikel also zu klein, verbleiben sie nicht lange im Körper und der pharmazeutische Effekt ist dementsprechend gering. Sind Partikel kleiner als bis zu 400 nm, reichern sie sich aufgrund der unregelmäßigen Gefäßstruktur in Tumorgeweben an [17]. Bei der Zirkulation der Partikel durchs Blut können sie den Blutkreislauf aufgrund von größeren Lücken im Endothel im Bereich des Tumorgewebes verlassen [7]. Dies wird im allgemeinen als EPR-Effekt (Enhanced Permeability and Retention Effect) beschrieben. Als optimal wird eine Größe von 100-200 nm beschrieben, da Partikel dieser Größe gut in Tumorgewebe akkumulieren, lange im Blut zirkulieren und sie gleichzeitig die Filtration durch Leber und Milz umgehen [18,19]. Partikel, die größer als 500 nm sind, werden vermehrt durch Phagozytose oder Mikropinozytose von z.B. Makrophagen oder dendritischen Zellen aufgenommen [20]. Etwas kleiner Partikel werden durch die Clathrin-vermittelte Endozytose ins Lysosom transportiert [20].

Neben der Partikelgröße spielt auch die Art des Nanopartikels eine entscheidende Rolle bei seiner Funktion. Es gibt verschiedene Arten von Nanopartikel und nanopartikelären Systemen, die in der Pharmazie Anwendung finden. Diese lassen sich anhand ihrer Bestandteile, ihres Aufbaus oder ihrer Funktion einteilen (Abbildung 2-1, A-C). Zum einen gibt es Nanopartikel, die aus reinem Wirkstoff bestehen und meist eine Partikelgröße von 1 nm bis 100 nm aufweisen [21]. Diese winzigen Wirkstoffpartikel werden Nanocrystals bzw. Nanokristalle genannt. Meist handelt es sich

dabei um schlecht lösliche Substanzen, deren Lösungseigenschaften durch Erhöhen der Oberfläche verbessert werden sollen, was wiederum zu einer höheren Bioverfügbarkeit führt [22].

Neben den reinen Wirkstoffnanopartikeln gibt es auch noch nanopartikuläre Wirkstoffträger, also Partikel, die Vesikel für eine pharmazeutisch aktive Substanz sind. Die Funktion dieser Trägerpartikel ist es, den Wirkstoff gezielt an den Wirkort zu bringen. Um Wirkstoffe immer effizienter an den Wirkort zu befördern, wurden unterschiedliche Trägersysteme und Wirkstoffträgerarten entwickelt. Liposome bestehen aus einer amphiphilen Doppellipidschicht, die kugelförmig angeordnet ist. Die lipophilen Enden der Moleküle sind zueinander gerichtet, während die hydrophilen Enden zum Lumen hin und nach außen zeigen [23]. Im Lumen können sich entsprechend hydrophile Wirkstoffe anlagern, während sich lipophile Wirkstoffe zwischen der Doppellipidschicht anreichern. Die nicht kovalenten Bindungen können leicht gespalten werden, wodurch der Wirkstoff freigesetzt wird. Solid-Lipid-Nanoparticles (SLN) bestehen ebenfalls aus Fetten, die eine solide Lipidkugel bilden, die selbst bei Körpertemperatur fest ist [24]. An der Oberfläche dieser Wirkstoffträger befinden sich oberflächenaktive Substanzen, die die Partikel im Medium stabilisieren. Polymernanopartikel bestehen aus Polymerketten, die maßgeblich für die Partikeleigenschaften verantwortlich sind. Neben natürlichen Polymeren werden auch synthetische Polymere eingesetzt und sogar Polymere, die speziell für nanopartikuläre Trägersysteme entwickelt wurden. Die Eigenschaften dieser Polymernanopartikel können so unterschiedlich sein wie die Eigenschaften der Polymere, aus denen sie hergestellt wurden. Dementsprechend bieten sie ein enormes Potenzial fürs Drug Delivery.

Nicht nur das Material, sondern auch der Aufbau der Partikel hat einen Einfluss auf ihre Eigenschaften und Effizienz. Der Wirkstoff kann im Träger homogen verteilt sein (Nanosphären), im Inneren des Trägers eingeschlossen sein (Nanokapseln) oder an Oberfläche adsorbiert oder kovalent gebunden sein (Abbildung 2-1, B) [25]. Wo sich der Wirkstoff befindet, hat einen großen Einfluss auf seine Freisetzung und Stabilität.

Um den Wirkstoff gezielt an den Wirkort zu bringen, kann die Oberfläche der Träger weiter modifiziert werden (Abbildung 2-1, C). Die Oberfläche kann z.B. mit Antikörpern, Rezeptoren oder Liganden versehen werden, die Oberflächenladung kann verändert werden oder der Partikel durch das Binden an Substanzen wie Polyethylenglykol (PEGylierung) vor dem Abbau geschützt werden [26].

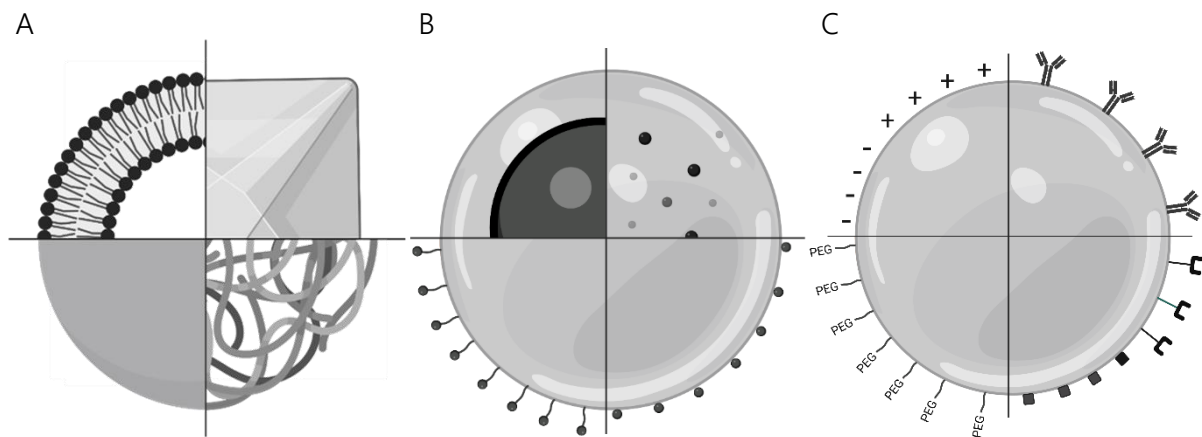


Abbildung 2-1: Schematische Darstellung der Nanopartikelarten (A): Liposomen (o. l.), Nanokristalle (o. r.), SLN (u. l.), Polymernanopartikel (u. r.); des Aufbaus eines NP (B): Nanokapsel (o. l.), Nanosphäre (o. r.), Wirkstoff kovalent gebunden (u. l.), Wirkstoff an Oberfläche adsorbiert (u. r.); und der Oberflächenfunktionalisierung (C): Oberflächenladung (o. l.), Bindung an Antikörpern (o. r.), PEGylierung (u. l.), Bindung an Rezeptor oder Liganden (u. r.); Zeichnung erstellt mit BioRender.com

## 2.2 Grundlagen zur Herstellung von Polymernanopartikeln

Es gibt im Wesentlichen zwei Gruppen, in die sich Methoden zur Herstellung von Nanopartikeln einsortieren lassen, die „Top Down“- und die „Bottom Up“-Methoden (Abbildung 2-2).

Eine Möglichkeit, Partikel einer bestimmten Größe herzustellen, ist es, größere Partikel aus Ausgangsmaterial zu nehmen und diese zu zerkleinern, bis die gewünschte Größe erreicht ist. Dieses Prinzip der Nanopartikelherstellung wird als „Top Down“ bezeichnet. Bei Top-Down-Methoden handelt es sich meist um mechanische Prozesse aber auch mittels thermischer Methoden lassen sich Nanopartikel herstellen. Die üblichste Top Down Methode ist das Mahlen [27]. Um besonders kleine Partikel zu generieren, ist ein Mahlverfahren notwendig, bei dem viel Energie in die Zerkleinerungsprozesse fließt. Nassvermahlungen mittels Kugelmühle bieten eine gute Möglichkeit, Partikel unter 1000 nm herzustellen. Aber auch die Behandlung eines groben Materials mittels Ultraschall, UV-Bestrahlung oder ätzenden Substanzen ist geeignet, um NP herzustellen [28].

Die zweite Möglichkeit ist es, Partikel aus kleineren Einheiten aufzubauen. Dieses Prinzip wird als „Bottom Up“ bezeichnet. Bei der Herstellung von Nanopartikeln sind die Ausgangsstoffe meist Moleküle oder Atome, die miteinander reagieren oder interagieren und so zu einem Partikel werden. Meist liegen die Einheiten, aus denen der Partikel aufgebaut wird, zu Beginn der Herstellung

gelöst vor und fallen durch Veränderungen am Material selbst oder im Lösungsmittel aus. Die verschiedenen Bottom Up Methoden lassen sich gut nach ihrer Art der intermolekularen Wechselwirkungen einteilen [28].

Polymernanopartikel können z.B. durch eine Polymerisation direkt aus den Monomeren hergestellt werden [29]. Durch die kovalente Bindung entstehen besonders stabile Partikel. Die Herstellungsmethode muss so aufgebaut sein, dass die Reaktion nach Erreichen der gewünschten Partikelgröße endet. Dafür kann z.B. zuerst eine Emulsion hergestellt werden, bei der ein Tröpfchen der inneren Phase den Reaktionsraum darstellt und so die Partikelgröße mitdefiniert. Bei kleineren Tröpfchen entstehen im Mittel weniger Polymerketten pro Partikel, die zudem noch kürzer sind [30].

Bei der ionischen Gelierung entstehen Nanopartikel durch elektrostatische Wechselwirkungen [31]. Ein geladenes Polymer reagiert mit einem mehrfach geladenen Gegenion oder einem mehrfach geladenen anderen Polymer. Durch den Ladungsausgleich entstehen unlösliche Partikel. Da die Moleküle durch ionische Wechselwirkungen gebunden sind, sind sie während und auch noch nach der Partikelformierung empfindlich gegenüber Änderung der Ionenkonzentration oder des pH-Wertes im Medium [32].

Anstatt das Polymer durch eine Reaktion mit einem anderen Molekül auszufällen, können auch gelöste Polymere durch Veränderungen am Lösungsmittel ausgefällt werden. Bei den Fällungs- bzw. Präzipitationsmethoden entstehen Partikel, deren Moleküle nicht kovalent gebunden sind. Das Ausfällen des Polymers kann auf unterschiedliche Weise erfolgen. Bei der Nanopräzipitation wird das Lösungsmittel mit einem Nicht-Lösungsmittel gemischt, sodass ein Medium entsteht, in dem das Polymer nicht mehr löslich ist und ausfällt [29]. Wenn Lösungsmittel und Nicht-Lösungsmittel durch eine Membran getrennt sind, spricht man von einer Dialyse-Methode [29].

Es gibt auch zweischrittige Fällungsmethoden, bei denen die Polymerlösung zuerst als Tröpfchen in einer anderen Phase dispergiert wird. Bei der Solvent-Evaporation wird zuerst eine Emulsion aus der Polymerlösung und einer zweiten flüssigen Phase hergestellt. Durch das Evaporieren des Lösungsmittels der inneren Phase entstehen die Partikel [30,33]. Wenn Wirkstoffe in die Partikel eingeschlossen werden sollen, die nicht in der Polymerphase löslich sind, kann dieses Verfahren auf eine Doppemulsion angewendet werden. Eine Emulsion kann auch aus zwei Phasen hergestellt werden, die aufgrund einer hohen Salzkonzentration in einer der beiden Phasen nicht

miteinander mischbar sind. Bei der Reverse Salting Out Methode wird dann die Ionenstärke durch Verdünnung verringert, wodurch sich die zwei Lösungsmittel mischen, zusammen ein Nichtlösungsmittel bilden und das Polymer ausfällt [30,33].

Während der Sprühtrocknung wird die Polymerlösung in einem Gas, meist Luft oder Stickstoff, dispergiert und das Lösungsmittel durch Wärme verdampft, wodurch Partikel meist im unteren Mikrometerbereich entstehen. Der Wirkstoff kann in der Polymerphase gelöst vorliegen, sich in der inneren oder äußeren Phase einer Emulsion befinden oder es wird aus einer Suspensionen sprühgetrocknet. Bei Abwandlungen dieser Methode durch überkritische Fluidtechnologie kann das Lösungsmittel auch durch Änderungen des Druckes in die Gasphase übergehen [33]. Da überkritische Fluide auch anderweitig zur Nanopartikelherstellung genutzt werden können, bildet die überkritische Fluidtechnologie eine eigene Unterkategorie. Zum Beispiel kann das superkritische Fluid auch als Nichtlösungsmittel zur Fällung verwendet werden.

Ein weiteres Verfahren, um Nanopartikel herzustellen, ist die Koazervation. Bei der Koazervation wird zuerst das Polymer im Lösungsmittel gelöst und dann der Wirkstoff in diesem dispergiert oder emulgiert [34]. Durch Änderung der Umgebungsbedingungen konzentriert sich das gelöste Polymer um den Wirkstoffpartikel und bildet eine höher konzentrierte Polymerphase, die sich Koazervat nennt. Durch diese Phasentrennung enthält die äußere Phase nun Polymer in einer geringeren Konzentration. Das Koazervat umhüllt die Wirkstoffphase vollständig und verfestigt sich dort, wodurch eine Nanosuspension entsteht. Bei der komplexen Koazervation sind zwei Polymere beteiligt, die aufgrund von intermolekularen Wechselwirkungen ein Koazervat bilden [35]. Handelt es sich dabei ausschließlich um elektrostatische Wechselwirkungen, wird diese Form der komplexen Koazervation der ionischen Gelierung zugeordnet.

Bei Emulsionsmethoden und der Nanopräzipitation können die zwei Flüssigkeiten auch auf sehr kleinem Raum miteinander gemischt werden [36,37]. Dabei strömen die Flüssigkeiten durch Kanäle, deren Durchmesser im Mikrometerbereich liegen. Ist dies der Fall spricht man von der Mikrofluidtechnologie.

Bei den meisten Fällungsmethoden kann der Einsatz von Tensiden oder anderen Stabilisatoren notwendig sein, um das Partikelwachstum zu kontrollieren und die fertige Nanopartikel-Suspension zu stabilisieren.

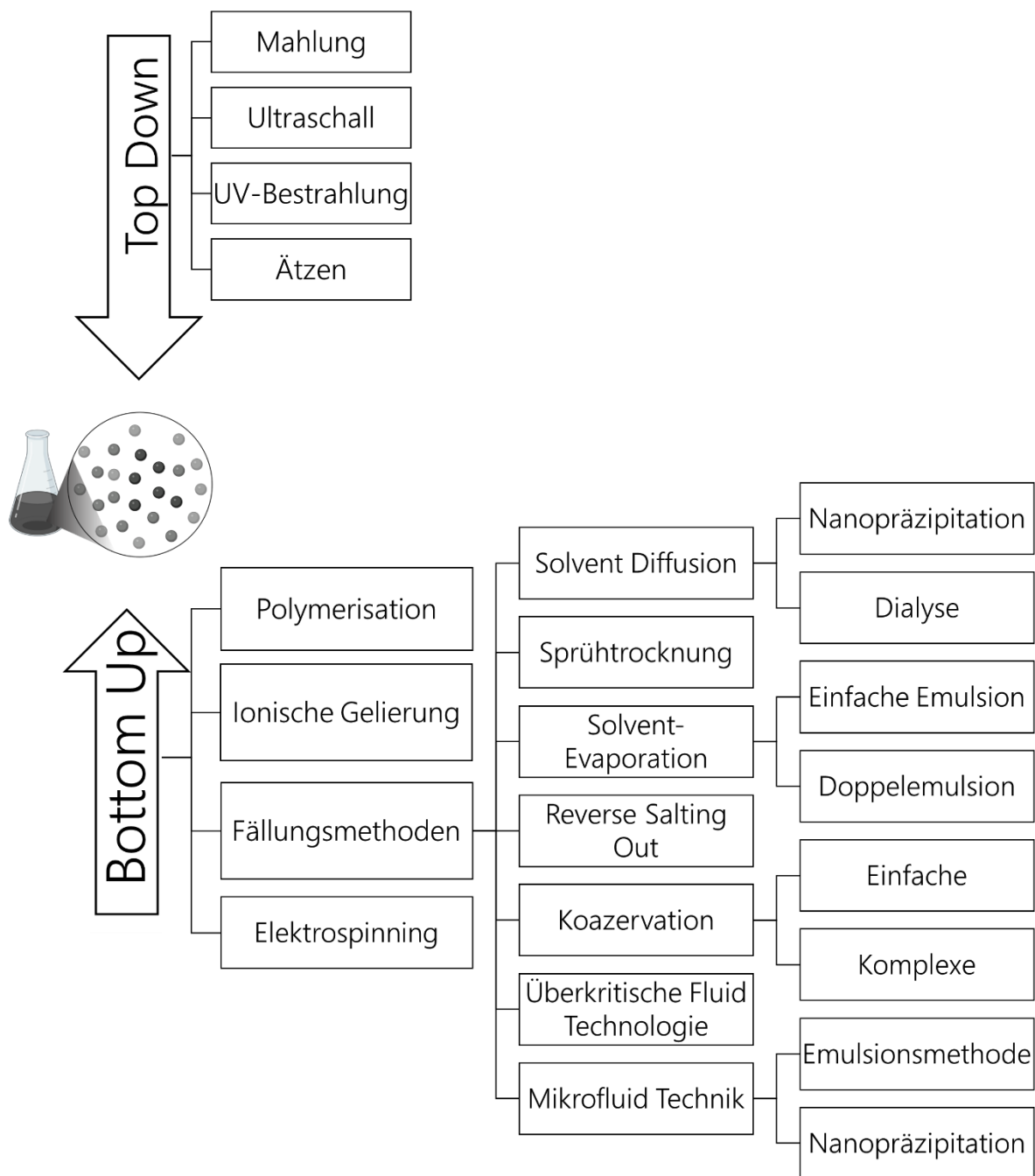


Abbildung 2-2: Herstellung von Polymernanopartikeln mittels Top Down- und Bottom Up-Methoden. Teile der Abbildung wurde erstellt mit BioRender.com

## 2.3 Quality by Design

Quality by Design (QbD) ist ein Konzept aus dem Qualitätsmanagement, das dabei helfen soll, die Endqualität eines Produktes frühzeitig anzustreben und zielsicher umzusetzen [38]. Dieses Konzept begleitet ein Produkt von der Entwicklung bis in den laufenden Herstellungsprozess, um kontinuierlich die Qualität und das Prozessverständnis zu verbessern. Da es sich bei QbD um einen sehr umfangreichen Ansatz handelt, werden für diesen Ansatz eigenständige Begrifflichkeiten verwendet, deren Definitionen in Tabelle 2-1 aufgeführt sind.

*Tabelle 2-1: Wichtige Begriffe von Quality by Design*

Begriff	verwendeter deutscher Begriff	Abkürzung	Beschreibung
Quality Target Product Profile	(Qualitäts-) Zielproduktprofil	QTTP	alle Qualitätsmerkmale eines Arzneimittels, die idealerweise erreicht werden sollen, um die gewünschte Qualität zu gewährleisten, unter Berücksichtigung von Sicherheit und Wirksamkeit [39]
Critical Quality Attributes	Kritische Qualitätsmerkmale	CQA	physikalische, chemische, biologische oder mikrobiologische Eigenschaft oder ein Merkmal, das innerhalb eines geeigneten Grenzwertes, Bereichs oder einer Verteilung liegen sollte, um die gewünschte Produktqualität zu gewährleisten [39]
Critical Process Parameters	Kritische Prozessparameter	CPP	Prozessparameter, deren Variabilität sich auf CQA auswirkt und daher überwacht oder gesteuert werden sollte, um die gewünschte Qualität zu gewährleisten [39]
Critical Material Attributes	Kritische Materialeigenschaften	CMA	Eigenschaften von Ausgangsstoffen und Zwischenprodukten, die zusammen mit den CPP die Qualität des Endproduktes beeinflussen und daher innerhalb von bestimmten Spezifikationen liegen müssen [20,40]
Unclassified Process Parameter	Nicht klassifizierte Prozessparameter	UPP	Prozessparameter bei denen nicht bekannt ist, wie kritisch eine Veränderung für das Endprodukt ist [40]

Der Nutzen und die Umsetzung dieses Konzeptes für die Entwicklung und Herstellung von Arzneimitteln ist in den ICH Guidelines Q8 bis Q11 beschrieben, die zwischen 2004 und 2011 veröffentlicht wurden [39,41–43]. Durch das Anwenden der in den Guidelines beschriebenen Methoden soll erreicht werden, dass das Arzneimittel zuverlässig eine gute Qualität aufweist, um die Sicherheit und Wirksamkeit sicherzustellen.

Die Entwicklung eines Arzneimittels beginnt damit, dass die allgemeine Absicht und das Ziel der Entwicklung definiert werden [40]. Dadurch wird sichergestellt, dass das Produkt für die beabsichtigte Verwendung geeignet ist. Teil der Zielsetzung soll es sein, das Qualitätszielproduktprofil (QTPP) zu definieren [39]. Das QTPP ist eine Zusammenfassung der Qualitätsmerkmale eines Arzneimittels, die idealerweise erreicht werden sollen, um die gewünschte Qualität zu gewährleisten und dadurch die Sicherheit und Wirksamkeit sicherzustellen. Das QTPP sollte die Bedürfnisse des Patienten und den klinischen Zweck berücksichtigen [20]. Zudem werden meistens Applikationsweg, Darreichungsform, Bioverfügbarkeit, Stärke und Stabilität des Zielproduktes einbezogen [39]. In der Praxis beschreibt das QTPP oft eine gewünschte Zieleigenschaft, ohne konkret zu definieren, wie das Ziel umgesetzt oder gemessen werden soll.

Daher werden im nächsten Schritt kritische Qualitätsmerkmale (CQA) definiert, die das Erreichen des QTPP gewährleisten sollen und dazu dienen, die Qualität zu untersuchen und zu kontrollieren. Ein CQA ist eine physikalische, chemische, biologische oder mikrobiologische Eigenschaft oder Merkmal, das innerhalb eines geeigneten Grenzwertes, Bereichs oder einer Verteilung liegen sollte, um die gewünschte Produktqualität zu gewährleisten [39]. Das bedeutet, dass ein CQA quantifizierbar und messbar sein muss. Gut ausgewählte und vollständige CQA helfen bei der Produkt- und Prozessentwicklung. Auch wenn zu Beginn der praktischen Versuche die CQA definiert sein müssen, können sie mit zunehmender Produktkenntnis und besserem Prozessverständnis angepasst werden [39].

Wenn das Zielprodukt definiert ist und entschieden wurde, welche Eigenschaften analysiert werden sollen, kann ein Herstellungsprozess entwickelt werden. Dabei wird untersucht, welche (Rohstoff-)Materialeigenschaften und welche Prozessparameter einen Einfluss auf die CQA haben. Die untersuchten Prozessparameter und Materialeigenschaften, die eindeutig einen Einfluss auf ein oder mehrere CQA haben, nennt man kritische Prozessparameter (CPP) bzw. kritische

Materialeigenschaften (CMA). In der Entwicklung werden diese vor allem genutzt, um die Eigenschaft des Endproduktes zu steuern.

Für diese Untersuchung kann ein statistischer Versuchsplan (englisch: Design of Experiment (DoE)) genutzt werden, wodurch ein Zusammenhang zwischen CMA, CPP und CQA hergestellt wird. DoE sind eines der wichtigsten QbD-Werkzeuge, um Prozessparameter zu untersuchen und zu optimieren.

Da die statistische Versuchsplanung in dieser Arbeit das Hauptwerkzeug ist, um die Nanopartikelherstellungsprozesse zu analysieren und zu optimieren, ist im nächsten Kapitel ausführlich beschrieben, was man unter DoE versteht, wofür es eingesetzt wird und welche Arten von Versuchsplänen es gibt.

Um möglichst alle Prozessvariablen zu berücksichtigen, die potenziell einen Einfluss auf das Endprodukt haben können, sollten diese systematisch gesammelt werden. Dabei können andere in der ICH Q8 Guideline beschriebene Werkzeuge, z.B. ein Ursachen-Wirkungs-Diagramm, helfen. Da dies üblicherweise mehr Variablen sind, als in der Praxis untersucht werden können, sollte evaluiert werden, welche Variablen untersucht werden sollen und welche im ersten Schritt vernachlässigt werden können. Die Variablen, die nicht untersucht werden, werden vorerst als nicht klassifizierte Prozessparameter (UPP) deklariert [40]. Sie können im weiteren Verlauf der Entwicklung untersucht werden und sollten in Betracht gezogen werden, falls es zu Problemen mit der Reproduzierbarkeit der Qualität des Endprodukts kommt.

Aus den Erkenntnissen dieser Untersuchungen werden dann Grenzen für die CMA und CPP identifiziert. Den mehrdimensionalen Raum, der durch alle möglichen Kombinationen der festgelegten Grenzen entsteht, nennt man Design Space. Das Arbeiten im Design Space führt dann zur gewünschten Qualität.

Nachdem ein funktionierender Herstellungsprozess etabliert wurde, wird dieser kontinuierlich überwacht und bei Bedarf verbessert, um eine gleichbleibende Produktqualität zu gewährleisten. Dabei spielen Prozessüberwachung, Qualitäts-Risiko-Management (QRM), pharmazeutische Qualitätssysteme und Revalidierung eine wichtige Rolle.

Nach einer erfolgreichen Entwicklung mittels eines DoE-Ansatzes sollte der Herstellungsprozess gut verstanden sein und sicher ein Produkt erzeugen, dessen Qualität den Anforderungen

entspricht. Umschrieben wird dies oft durch den Leitsatz: „Qualität kann nicht ins Produkt hineingetestet werden, sondern soll schon bei der Entwicklung hineingebaut werden“ [39]. Das bedeutet, dass im Optimalfall während der Entwicklung so viel Prozessverständnis gesammelt wurde, dass nach der Produktion die Qualität der hergestellten Charge in der Theorie bereits bekannt ist und dann nur noch von der Qualitätskontrolle bestätigt wird. Das soll zu weniger Ausschuss und gleichzeitig zu mehr Flexibilität führen, denn im Vorfeld ist bekannt, wie stark Prozessparameter und Qualität der Ausgangsstoffe schwanken dürfen, um die gewünschte Produktqualität zu erreichen.

### 2.4 Grundlagen zur statistischen Versuchsplanung

Bei der statistischen Versuchsplanung handelt es sich um einen mathematischen Ansatz, um den Zusammenhang zwischen ausgewählten Einflussgrößen, auch Einflussparameter oder Faktoren genannt und unterschiedlichen Effekten, auch Zielgröße oder Antwortvariable genannt, eines Prozesses in einem mathematischen Modell darzustellen [39].

Die verschiedenen Einflussparameter werden variiert und so auf verschiedenen Stufen miteinander kombiniert. Sie spannen so einen multidimensionalen Versuchsraum auf, der aus vielen Einzelversuchen besteht. Durch das anschließende Analysieren der Zielgrößen bekommt man ein empirisches Modell, das Ursachen und Wirkung miteinander verknüpft und diesen Zusammenhang mit einer mathematischen Funktion, einer Regressionsgleichung, beschreibt [44]. Diese mathematische Funktion kann genutzt werden, um Zielgrößen für zukünftige Versuche vorherzusagen oder um die optimale Faktoreinstellung für eine gewünschte Zielgröße oder Zielgrößenkombination zu berechnen, solange sie sich im untersuchten Bereich befinden. Genutzt wird die statistische Versuchsplanung meist zur Prozessuntersuchung und -optimierung. Mithilfe der mathematischen Auswertung der Ergebnisse lassen sich mit relativ wenigen Versuchspunkten verhältnismäßig viele Erkenntnisse über den Prozess gewinnen. Für die bessere Verständlichkeit des Themas sind die für die statistische Versuchsplanung genutzten Begriffe in Tabelle 2-2 aufgeführt.

Tabelle 2-2: Begriffe der statistischen Versuchsplanung

Begriff	Beschreibung
Zielgröße, Antwortvariable	beschreiben das Ergebnis eines Versuchs und können Messwerte sein oder aus diesen berechnet werden [45]
Einflussgröße, Prozessvariable	können die Zielgrößen möglicherweise beeinflussen [45]
(Einfluss-)Faktor, (Prozess-) Parameter	ausgewählte mögliche Einflussgrößen, die in einem Versuch untersucht werden [45]
Qualitativer Faktor	Stufen ohne Skala; nur Namen, Beschreibungen oder Bezeichnungen [45]
Quantitativer Faktor	die Stufen werden durch Zahlenwerte auf einer Messskala beschrieben; es gibt Zwischenwerte und es kann interpoliert werden [45]
Faktorstufen	Werte, die ein Faktor in einem Versuch annehmen kann [45]
Versuchsraum	mehrdimensionaler mathematischer Raum, der durch die Faktoren aufgespannt wird. Dieser ist begrenzt durch die gewählten maximalen und minimalen Werte der Faktoren [46]
Versuchspunkt	die für einen Einzelversuch festgelegte Stufenkombination aller variablen und konstanten Einflussgrößen [46]
Versuchsplan	zusammengehörende, systematisch hergeleitete Versuchspunkte [46]
Residuen	Modellfehler; Abweichung zwischen Modellvorhersagen und „echten“ Messwerten [47]
Haupteffekt	Mittelwert / Maß für den Einfluss eines Faktors auf eine Antwortvariable [45]
Wechselwirkung	Abhängigkeit des Effektes eines Faktors von der Faktorstufe eines oder mehreren anderen Faktoren [45]

Die Vorgehensweise bei der statistischen Versuchsplanung besteht aus Vorbereitung und Erstellung des Versuchsplans, Durchführen der Versuche sowie Auswerten des Versuchsplans und Interpretieren der Ergebnisse. Teil der Vorbereitung sollte es sein ein Versuchsziel zu definieren. Zudem muss geklärt sein, welche Zielgrößen und Faktoren untersucht werden sollen und welche Faktorstufen sinnvoll sind. Als nächstes muss ein geeigneter Versuchsplan ausgewählt werden, der zum Ziel und zur Art des Versuches passt. Auf die unterschiedlichen Versuchsplanarten gehe ich am Ende des Kapitels ausführlicher ein. Bei der Erstellung des Versuchsplans sollte auf eine Randomisierung der Versuchspunkte geachtet werden, um zu verhindern, dass ein Trend oder unerkannte Änderung die Schätzung der Effekte verfälscht [45]. Zusätzlich zur Randomisierung

können Versuchswiederholungen helfen, das Signal (den Effekt) vom Rauschen zu trennen [47]. Bei der Auswertung des Versuchsplans sollte auf Ausreißer, systematische Fehler und Streuung geachtet werden. Diese verfälschen das Ergebnis oder führen dazu, dass das Modell nicht aussagekräftig ist. Bei der Anpassung des Modells sollte darauf geachtet werden, welche Terme Teil des Modells sind und welche Terme rausgenommen werden. Werden zu viele Terme berücksichtigt, ist das Modell zu komplex und erfasst damit auch Zufallsstreuungen [45]. Dies wird auch Überanpassung genannt. Werden zu viele Terme aus dem Modell genommen, kann es nicht alle Aspekte des tatsächlichen Wirkzusammenhangs beschreiben [45]. Bei so einer Unteranpassung sind Modell und Vorhersagen nicht mehr genau genug.

Je nach gewähltem Versuchsplan kann man verschiedene Erkenntnisse gewinnen. Ist der Effekt, den ein Prozessparameter hat, größer als die Zufallsstreuung, spricht man von einem signifikanten Parameter [45]. Ist der Effekt kleiner als die Streuung, dann kann dieser nicht oder nicht eindeutig erkannt werden. In diesem Fall spricht man von einem nicht signifikanten Parameter. Für die signifikanten Parameter kann man erfassen, in welche Richtung der Effekt geht, also ob eine Antwortvariable erhöht oder erniedrigt wird, und anhand der Steigung der Funktion wie stark dieser Effekt ist. In der Realität ist ein Zusammenhang zwischen Faktor und Zielgröße selten linear. Um eine Krümmung festzustellen, braucht man mehr als zwei Stufen pro Faktor. Je mehr Stufen man wählt und je stärker die tatsächliche Krümmung ist, desto einfacher wird diese Krümmung erkannt. Ist die Krümmung größer als das Rauschen, nennt man diese signifikant. Ist die Krümmung kleiner, wird der Faktor durch das Modell in einem linearen Term dargestellt.

Ein wichtiger Vorteil der statistischen Versuchsplanung ist das Erkennen von Wechselwirkungen der untersuchten Parameter. Untersucht man immer nur einen Parameter zurzeit („one-factor-at-a-time“ kurz: OFAT), lassen sich keine Wechselwirkungen feststellen. Von einer Wechselwirkung spricht man, wenn der Effekt eines Faktors davon abhängt, auf welcher Stufe sich ein anderer Faktor befindet [45]. Dies drückt sich mathematisch durch zwei unterschiedliche Steigungen bei den jeweils zwei Stufen des abhängigen Faktors aus.

### 2.4.1 Arten von statistischen Versuchsplänen

Es gibt verschiedene Arten von Versuchsplänen, die unterschiedliche Zwecke erfüllen. In Abbildung 2-3 sind exemplarisch drei dieser Versuchspläne optisch dargestellt. Je nach Ziel der Versuchsreihe kann der Versuchsplan ausgewählt werden. Innerhalb einer Entwicklung oder Optimierung werden oft mehrere Versuchsplanarten genutzt, um den Prozess auf verschiedenen Ebenen zu untersuchen und um sich dem Optimum anzunähern.

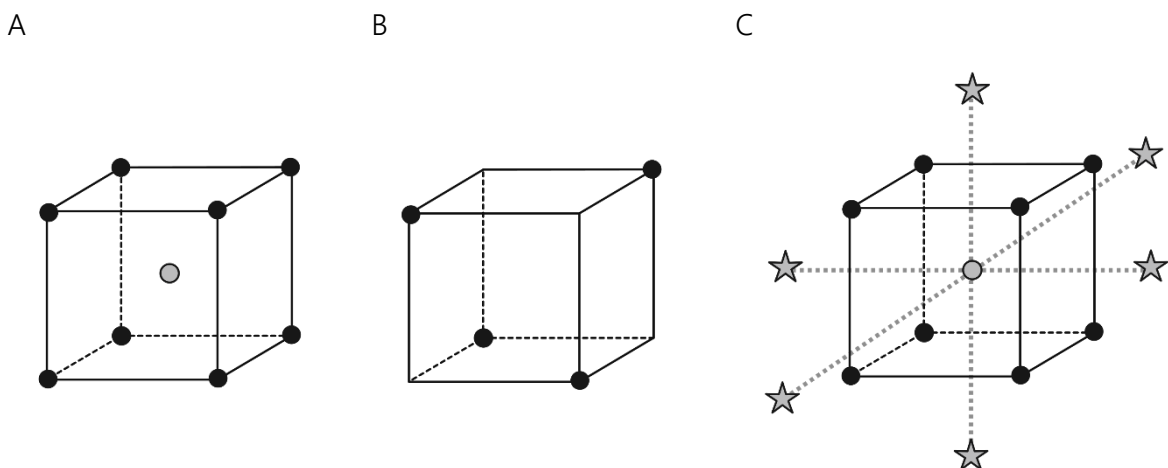


Abbildung 2-3: Schematische Darstellung eines vollfaktoriellen Versuchsplans mit Zentralpunkt (A), eines halbfaktoriellen Versuchsplans (B) und eines zentral zusammengesetzten Versuchsplans mit Zentralpunkten und Sternpunkten (C) mit je drei Faktoren; grauer Punkt = Zentralpunkt, schwarzer Punkt = Eckpunkt, grauer Stern = Sternpunkt

#### 2.4.1.1 Vollfaktorieller Versuchsplan

Der vollfaktorielle Versuchsplan ist die Grundlage vieler weiterer Versuchspläne. Dieser Versuchsplan enthält alle möglichen Kombinationen der einzelnen Faktorstufen, die den kompletten Versuchsraum wie ein Gitter abdecken (Abbildung 2-3 A). Es kann zusätzlich ein Zentralpunkt ( $N_0$ ) zur Beurteilung (nicht aber Berechnung) der Krümmung eingefügt werden. Die Anzahl der Versuche ( $N$ ) steigt mit der Anzahl der Faktoren ( $k$ ) exponentiell (Formel 2-1). Da es je zwei Faktorstufenkombinationen gibt, die sich in nur einem Faktor unterscheiden, kann man Effekte relativ gut einem Faktor zuordnen [45].

$$N = 2^k + N_0 \quad \text{Formel 2-1}$$

### 2.4.1.2 Screening Versuchspläne

Wenn noch nicht viel über einen Prozess, also über den Zusammenhang zwischen Faktoren und Zielgrößen, bekannt ist, kann man einen Screening-Versuchsplan wählen. Mit ihm können viele Faktoren mit minimalen Aufwand untersucht werden [47]. Man erfährt, welche Faktoren einen signifikanten Einfluss haben und in welche Richtung der Faktor die Zielgröße beeinflusst [45]. Da nie nur ein Faktor gleichzeitig variiert wird, ist das Erkennen von Wechselwirkungen deutlich schwieriger. Zudem kann es zu Vermengungen von Effekten kommen. Wenn Effekte vermengt sind, kann man in der Auswertung nicht unterscheiden, ob ein Effekt durch den einen Faktor entstanden ist oder durch die Wechselwirkung der übrigen Faktoren [45].

Gut darstellbare Beispiele für Screening Versuchspläne sind die teilfaktoriellen Versuchspläne (Abbildung 2-3 B). Diese entstehen, indem man bestimmte Punkte aus einem vollfaktoriellen Versuchsplan streicht. Die Anzahl der Versuchspunkte ergeben sich aus Formel 2-2. Da aufgrund der Symmetrien bei diesen Versuchsplänen Zusammenhänge schlechter zugeordnet werden können, haben Jones und Nachtsheim 2011 das Definitive Screening Design eingeführt [48]. Bei dieser Versuchsplanart hat jeder Versuchspunkt außer dem Zentralpunkt genau einen Faktor auf mittlerer Stufe und alle anderen an den Extremen. Ein großer Vorteil dieser Versuchspläne ist, dass die Haupteffekte nicht durch Effekte zweiter Ordnung, sprich Wechselwirkungen von zwei Faktoren, verzerrt werden. Zudem können Zwei-Faktor-Interaktionen oder quadratische Effekte geschätzt werden, wenn die wahren Effekte viel größer sind als die Fehlerstandardabweichung [49]. Der Aufwand ist selbst bei vielen Faktoren überschaubar, denn es werden nur doppelt so viele Versuchspunkte plus Zentralpunkt benötigt, wie Faktoren untersucht werden (Formel 2-3) [48].

$$N = 2^{k-1} + N_0 \quad \text{Formel 2-2}$$

$$N = 2k + 1 \quad \text{Formel 2-3}$$

### 2.4.1.3 Wirkungsflächenversuchspläne

Bei den Wirkungsflächenversuchsplänen wird jeder Faktor auf mehr als zwei Stufen untersucht. Dadurch kann eine „mehrdimensionale Karte“ (Wirkungsfläche) erstellt werden, die die Ergebnisse miteinander in Beziehung setzt und Wechselwirkungen und Krümmungen berücksichtigt [50]. Da durch die zusätzlichen Versuchspunkte der Umfang größer ist als bei den vollfaktoriellen Versuchsplänen, sollte man sich hier auf wenige, gut ausgewählte Parameter beschränken. Für den

untersuchten Versuchsraum können zukünftige Ergebnisse gut vorhergesagt werden [51]. Zudem kann die optimale Parameterkombination ermittelt werden, bei der das Endprodukt die gewünschten Eigenschaften besitzt [52]. Für einen zentral-zusammengesetzten Versuchsplan wird ein vollfaktorieller Versuchsplan um Sternpunkte und Wiederholungen des Zentralpunktes ergänzt (Abbildung 2-3 (C)). Dadurch wird jeder Faktor auf fünf Stufen untersucht [47]. Jeder einzelne Sternpunkte befindet sich für alle bis auf einen Faktor auf mittlerer Einstellung und für einen Faktor auf einer zusätzlichen Einstellung, mit dem Wert  $\pm \alpha'$ . Alpha' ist also der Abstand zwischen den Sternpunkten und dem Zentralpunkt. Normalerweise wird  $\alpha'$  so gewählt, dass die Sternpunkte knapp über die Würfeldimension hinausragen. Wenn dies in der Praxis zu Problemen führt, da zum Beispiel ein Wert zu klein oder gar negativ wird, kann  $\alpha'$  auch auf dem oder innerhalb des Würfels platziert werden [47]. Dadurch wird jedoch die Berechnung der Krümmung ungenauer. Die Anzahl der Versuchsdurchläufe errechnet sich aus Formel 2-4.

$$N = 2^k + 2k + N_0 \quad \text{Formel 2-4}$$

## 3 Materialien

### 3.1 Ovalbumin

Ovalbumin (OVA) ist das im Hühnereiweiß am häufigste vorkommende Protein [53]. Es besteht aus 385 Aminosäuren, die zusammen ein Molekulargewicht von 42,7 kDa besitzen [54]. Eine Denaturierung des Proteins beginnt ab 67°C [55]. Aufgrund eines Isoelektrischen Punktes von 4,6 liegt OVA bei geringeren pH-Werten positiv geladen und bei höheren pH-Werten negativ geladen vor [56].

In dieser Arbeit wird OVA als Modell-Wirkstoff verwendet, das je nach Herstellungsverfahren durch Wirkstoffe mit ähnlichen Eigenschaften, sprich therapeutische Proteine, Antigene oder hydrophile niedermolekulare Wirkstoffe, ausgetauscht werden kann. Es hat zudem den Vorteil, dass es sich durch eine Antigen-spezifische Immunreaktion gut in Mausmodellen einsetzen lässt. Die dabei entstehenden Anti-OVA Antikörper lassen sich mittels Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) nachweisen [57].

Das verwendete Albumin aus Hühnereiweiß stammt von Sigma Aldrich (USA), welches ein lyophilisiertes Pulver mit einer Reinheit von  $\geq 98$  % ist. Die Löslichkeit in Wasser wird mit 40 mg/mL angegeben.

### 3.2 Polylactid-co-Glycolid

Poly(lactid-co-glycolid) (PLGA) ist ein Polyester aus D,L-Milchsäure und Glycolsäure, die je nach Art des PLGA zu unterschiedlichen Anteilen und in unterschiedlicher Abfolge vorkommen. PLGA ist biokompatibel, bioabbaubar und in diversen organischen Lösungsmitteln löslich [58,59]. Zudem ist es von der FDA und EMA für die parenterale Verabreichung zugelassen und es gibt bereits langjährige klinische Erfahrungen mit PLGA als Hilfsstoff für Drug Delivery Systeme [58,59].

Weitere Eigenschaften des PLGA sind maßgeblich von seiner Zusammensetzung, Kettenlänge und endständigen Gruppen abhängig [58,60]. Erhöht man den Anteil an Milchsäure, wird das Copolymer hydrophober, der Kristallinitätsgrad steigt sowie die Glasübergangstemperatur [58]. Dies hat wiederum einen hemmenden Effekt auf den Abbau und die Wirkstofffreisetzung. Besitzt das Polymer eine endständige Hydroxylgruppe, ist es hydrophiler als wenn es mit einer Estergruppe abschließt [58]. In vivo wird PLGA durch hydrolytische Spaltung des Esters innerhalb von Tagen bis Monaten abgebaut [58,61]. Dabei entstehen zuerst Oligomere, die dann wiederum in die

Monomere Milchsäure und Glycolsäure abgebaut werden [61]. Da es sich bei beiden Monomeren um körpereigene Stoffe handelt, ist die systemische Toxizität gering [61]. Hergestellt wird PLGA mittels Ringöffnungspolymerisation aus D,L-Lactid und Glycolid [62].

In dieser Arbeit wurde das PLGA Resomer<sup>®</sup> RG 503 H von Evonik (Deutschland) verwendet. Resomere sind Hilfsstoffe, die speziell für die kontrollierte Wirkstofffreigabe entwickelt wurden [63]. Es gibt unterschiedliche Resomere. Der Kennbuchstabe R steht für „Racemat“ und bedeutet, dass für die Herstellung D,L-Lactid verwendet wurde und „G“ steht für das verwendete Glycolid [64]. Die ersten zwei Ziffern der Kennzahl geben den Anteil von Lactid an. In diesem Fall besteht das Polymer zu 50 % aus Lactid und zu 50 % aus Glycolid [63,64]. Die letzte Ziffer der Kennzahl ist das Maß für die Viskosität [64]. Das hier verwendete Resomer hat eine inhärente Viskosität von 0,32 – 0,44 dl/g [63]. Der Zusatz „H“ bedeutet, dass die Polymerkette mit einer freien Säuregruppe endet [63].

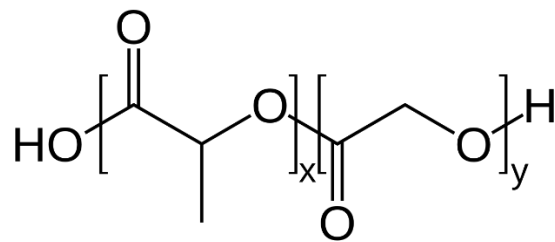


Abbildung 3-1: Chemische Struktur von PLGA,  $x$  = Anzahl Milchsäureeinheiten,  $y$  = Anzahl Glycolsäureeinheiten

### 3.3 Chitosan

Chitosan ist ein Polymer, das durch Deacetylierung des Chitins gewonnen wird, aber auch in einigen Pilzen vorkommt [65,66]. Es ist unverzweigt und besteht aus  $\beta$ -1,4-glycosidisch verknüpftem Glucosamin und N-Acetylglucosamin [66]. Die Eigenschaften und vor allem die Löslichkeit des Chitosans sind vom Molekulargewicht und vom Deacetylierungsgrad abhängig. Je kürzer das Molekül ist und je größer der Deacetylierungsgrad, desto besser ist das Polymer in sauren wässrigen Medien löslich [66]. Je saurer der pH-Wert ist, desto mehr Aminogruppen werden protoniert. Chitosan ist mukoadhäsiv, entzündungshemmend, biologisch abbaubar und weist eine geringe Toxizität auf [65–67]. Aufgrund seiner immunmodulierenden Eigenschaften und der penetrationfördernden Wirkung hat es eine adjuvante Wirkung bei der Vakzinierung [68,69].

Für die ionische Gelierung wurden Chitoscience 90/20 und Chitoscience 90/200 von Heppe Medical (Germany) verwendet, die beide einen Deacetylierungsgrad von 90 % aufweisen. Die Viskosität von 1 % Chitoscience 90/20 in 1 %-igen Essigsäure wird laut Spezifikation mit 16 mPas bis 30 mPas bei 20 °C angegeben, während Chitoscience 90/200 eine Viskosität von 151 mPas bis 350 mPas hat. Für die Sprühtrocknung wurde Chitoscience 90/10 verwendet, für das eine Viskosität von 8 mPas bis 15 mPas spezifiziert ist. Die Viskosität ist ein Maß für die Kettenlänge der Chitose. Dementsprechend wurden ein Chitosan mit geringer Kettenlänge (Chitoscience 90/20) und eins mit hoher Kettenlänge (Chitoscience 90/200) verwendet.

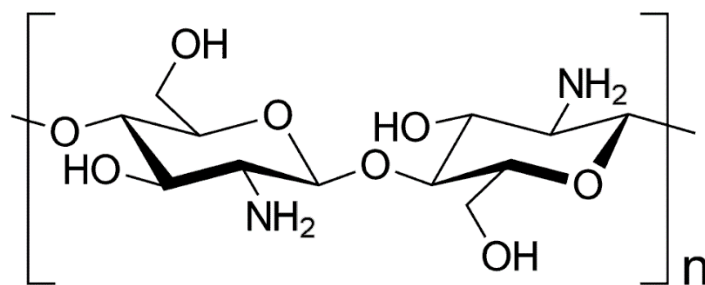


Abbildung 3-2: Chemische Struktur von Chitosan (vollständig deacetyliert)

### 3.4 Carboxymethylcurdlan

Carboxymethylcurdlan (CM-Curdlan) ist ein Derivat des Curdlans, das an einigen der Hydroxidgruppe carboxymethyliert ist. Curdlan ist ein Polysaccharid, dessen Glucose-Einheiten β-1,3-glykosidisch verknüpft sind. Das Polymer weist eine lineare Struktur ohne Seitenketten und ohne Substituenten auf, was ihm seine besondere Eigenschaften verleiht [70,71]. Curdlan ist in Wasser, Alkoholen und den meisten organischen Lösungsmitteln unlöslich, löst sich aber in verdünnten Basen [70–72]. Curdlan ist ein natürlich vorkommendes Polymer, das in Zellwänden einiger gramnegativer Bakterien vorkommt, unter anderem in der Gattung *Alcaligenes faecalis* [73]. Curdlan werden eine Vielzahl von positiven Effekten auf das menschliche Immunsystem zugeschrieben. Es ist unter anderem immunstimulierend, antiinfektiös, entzündungshemmend und wundheilend [70,71,73]. Curdlan kann dendritische Zellen über den Dectin-1-Rezeptor und über den Toll-like-Rezeptor 4 aktivieren [73]. Durch die Carboxymethylgruppen wird CM-Curdlan wasserlöslich, behält aber viele der positiven Eigenschaften des Curdlans. Die Carboxylgruppe des CM-Curdlans ist je nach pH-Wert unterschiedlich stark negativ geladen. Das für diese Arbeit verwendete CM-Curdlan stammt von Megazyme (USA), das ein Molekulargewicht von 1650 kDa aufweist.

### 3.5 Carboxymethylcellulose Natrium

Carboxymethylcellulose-Natrium (Na-CMC) ist ein halbsynthetisches Polymer, das aus Cellulose hergestellt wird. Die Cellulose ist partiell O-carboxymethyliert. Einige der Alkoholgruppen wurden durch Substitutionsreaktion verethert und tragen einen Carboxymethyl-Rest, der als Natriumsalz vorliegt [74]. Je nach pH-Wert des Lösungsmittels trägt die CMC unterschiedlich viele negative Ladungen. Je höher die Kettenlänge des Na-CMC ist, desto viskoser wird die daraus hergestellte Lösung. Die hier verwendete Na-CMC mit niedriger Viskosität stammt von der Firma Sigma Aldrich (USA). Es hat einen Substitutionsgrad von 0,65 bis 0,90 und ein Molekulargewicht von ca. 90 kDa [75].

### 3.6 Beta-Glucane

Als Beta-Glucane werden Polysaccharide bezeichnet, die aus Glucosemolekülen bestehen, die beta-D-glycosidisch miteinander verbunden sind. Je nach Kettenlänge und Verzweigung weisen sie unterschiedliche Lösungseigenschaften auf. Da Beta-Glucane unter anderem in Pilzen und Bakterien jedoch nicht im menschlichen Körper vorkommen, können einige von ihnen Mustererkennungszustoren wie dem Dectin-1-Rezeptor und den Toll-like-Rezeptoren-2 und -4, aktivieren und eine Immunreaktion auslösen oder verstärken [76]. Dadurch stimulieren oder hemmen sie die Freisetzung von Zytokinen durch Makrophagen oder beeinflussen die Phagozytose von Makrophagen [77]. Zudem werden Beta-Glucanen positive Eigenschaften in Bezug auf das menschliche Herz-Kreislauf-System zugeschrieben, da sie den Cholesterinspiegel senken und die Glukoseverwertung durch die Körperzellen verbessern [77].

Bei dem in dieser Arbeit verwendeten Beta-Glucan handelt es sich um das lösliche Beta-Glucan M-Gard® aus *Saccharomyces cerevisiae* (Bäckerhefe) der Firma Biotec (Norwegen). Die aus Bäckerhefe gewonnenen Beta-Glucane weisen ein beta-1-3-d-glucosidisches Grundgerüst auf mit in O6-Position gebundenen Seitenketten.

### 3.7 Polyvinylalkohol

Polyvinylalkohol (PVA) ist ein wasserlösliches Polymer, das durch die Polymerisation von Vinylacetat mit anschließender Hydrolyse entsteht [74]. Charakterisiert wird PVA über das Molekulargewicht und die Esterzahl, sowie die Viskosität einer 4 %-igen wässrigen Lösung [65]. Das hier verwendete PVA ist das Mowiol 4-88 von Sigma-Aldrich (USA). Es hat ein Molekulargewicht von

~31.000 g/mol, einen Hydrolysegrad von 88 % und eine Viskosität von 4 mPas. Im Rahmen dieser Arbeit wurde PVA als Stabilisator eingesetzt, der die Tröpfchen der Emulsion vor Koaleszenz schützen soll. Zudem stabilisiert es die fertige Nanopartikelsuspension.

### 3.8 Mannitol

D-Mannitol ist ein nicht-reduzierender Zuckeralkohol, der in Wasser leicht löslich ist [74,78]. Eingesetzt wird er unter anderem als Hilfsstoff für gefriergetrocknete Injektionszubereitungen, da er nicht hygroskopisch ist und bereits während des Gefriertrocknungsprozesses kristallisiert, was sich positiv auf die physikalische Stabilität des Endproduktes auswirkt [65,79]. Des Weiteren kann Mannitol auch als Hilfsstoff beim Sprühtrocknen eingesetzt werden oder in hohen Konzentrationen als Diuretikum [79]. In dieser Arbeit wurde Mannitol als Matrixbildner beim Gefriertrocknen eingesetzt, um die Nanopartikel für einen längeren Zeitraum haltbar zu machen. Für diese Arbeit wurde Pearlitol 160 C von Roquette (Frankreich) verwendet.

### 3.9 Ethylacetat

Ethylacetat, auch Essigsäureethylester genannt, wurde in dieser Arbeit als organisches Lösungsmittel verwendet. Es handelt sich dabei um eine klare, farblose, flüchtige Flüssigkeit, die nicht mit Wasser mischbar ist [74]. Bezogen wurde dieses von Carl Roth (Deutschland) in der Qualität "HPLC-grade".

### 3.10 Wasser

Bei dem in dieser Arbeit verwendete Wasser, handelt es sich um Reinstwasser, welches mittels des Direct-Q<sup>®</sup>-Wasseraufbereitungssystem von Merck (Deutschland) frisch hergestellt wurde. Das System hält  $\geq 99$  % der partikulären Verunreinigungen zurück und reduziert Mikroorganismen auf 0,1 KBE/ml [80].

### 3.11 Phosphatpuffer

Zur Herstellung und für die Freisetzungsversuche der PLGA-Nanopartikel wurde natriumchloridhaltiger Phosphatpuffer pH 7,4 verwendet, der nach Europäischem Arzneibuch 10.0/4.1.3 hergestellt wurde [74].

## 4 Methoden

### 4.1 Präparative Methoden

#### 4.1.1 Doppelemulsion-Lösungsmittelveraporationsmethode

Bei der Doppelemulsion-Lösungsmittelveraporationsmethode handelt es sich um ein zweistufiges Bottom Up Verfahren zur Herstellung von Nanopartikeln. Im ersten Schritt wird eine Doppelemulsion aus einer wässrigen wirkstoffhaltigen Phase, der organischen Polymerphase und einer wässrigen Phase, die einen oder mehrere Stabilisatoren enthält, hergestellt. Im nächsten Schritt wird das organische Lösungsmittel der Polymerphase evaporiert, wodurch das Polymer ausfällt und die Hülle der festen Nanopartikel bildet.

Die hier verwendete Methode wurde von Janke adaptiert [81]. In Abbildung 4-1 ist der Herstellungsprozess mit Zusammensetzung der Phasen und der einzelnen Herstellungsschritten schematisch dargestellt. Als Modellwirkstoff diente Ovalbumin, das in einem Puffer gelöst wurde (W1). Die organische Phase enthielt PLGA als partikelbildendes Polymer, das in Ethylacetat gelöst wurde (O). Die äußere wässrige Phase enthielt PVA als Stabilisator (W2). Um das Volumen für den Evaporationschritt zu vergrößern, wurde die Doppelemulsion in eine 1 %-ige PVA-Stabilisatorlösung (S) gegeben. Da verschiedene Konzentrationen und Volumina verwendet wurden, werden diese in Kapitel 5 angegeben.

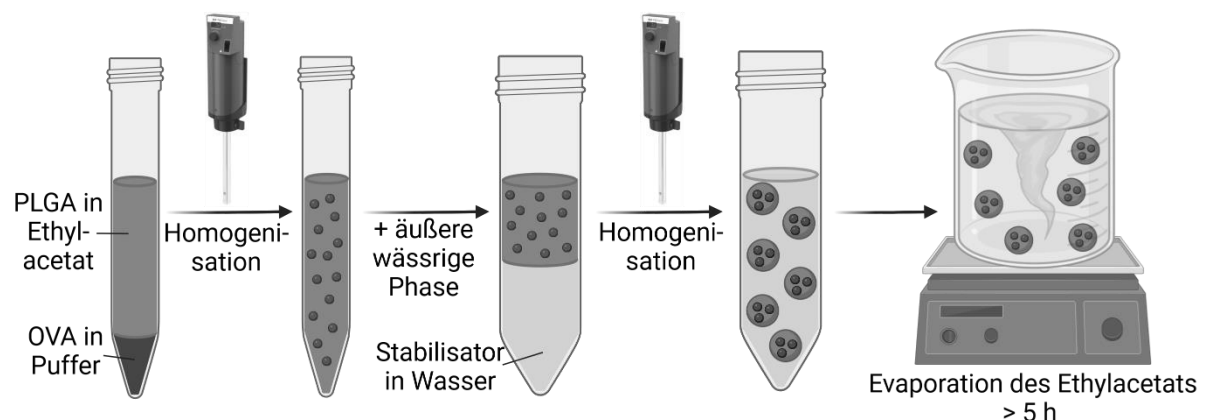


Abbildung 4-1: Herstellung von OVA-beladenen PLGA-Nanopartikeln mittels Doppelemulsion-Lösungsmittelveraporationsverfahren, Abbildung adaptiert von Struzek et al. [82], Abbildung erstellt mit BioRender.com

Zur Herstellung der Emulsionen wurde ein Rotor-Stator-Homogenisator (Ultra-Turrax® T25 von IKA Labortechnik, Deutschland) oder ein Ultraschallhomogenisator (Sonoplus HD 4100 mit TS 103 von Bandelin, Deutschland) verwendet.

Das zylinderförmige Dispergierwerkzeug des Ultra Turraxes® besteht aus einem inneren rotierenden Bauteil (Rotor) mit Schlitzfenstern und einem äußeren statischen Bauteil (Stator), das ebenfalls mit Schlitzfenstern versehen ist. Dazwischen befindet sich ein enger Spalt. Durch die hohe Geschwindigkeit des Rotors entsteht eine starke Zentrifugalwirkung, die das Medium in das Werkzeug einsaugt und beschleunigt. Das Medium wird dann durch die Schlitzfenster des Stators gedrückt. Dadurch werden hohe Scherkräfte und Turbulenzen erzeugt, die zum Aufbrechen der Tröpfchen führen [83].

Ein Ultraschallhomogenisator besteht aus einem Generator, einem Wandler und einer Sonotrode. Der Generator erzeugt hochfrequente elektrische Schwingungen, die vom Wandler in mechanische Ultraschallschwingungen umgewandelt werden. Diese Schwingungen werden über die Sonotrode in das flüssige Medium übertragen. Durch die Ultraschallschwingungen entstehen im Medium schnell wechselnde Druckphasen. Sinkt der lokale Druck unterhalb des Dampfdruckes des Mediums bzw. unterhalb des systemabhängigen Kohäsionsdruckes, entstehen Gasblasen innerhalb der Flüssigkeit, die sogenannten Kavitationsblasen. Wenn diese kollabieren, entstehen Stoß- und Scherkräfte, sowie Mikroströmungen, die zu Verformung und Zerkleinerung der Tröpfchen führen [84].

Mittels Homogenisierung wurde aus W1 und O die innere Emulsion (W/O) hergestellt. Nach Zugabe von W2 und weiterer Homogenisierung entstand eine Doppelemulsion (W/O/W). Nach Zugabe von S wird durch Rühren mittels Magnetrührer (IKA® Ro 15 von IKA Labortechnik, Deutschland) das Ethylacetat über Nacht oder mindestens fünf Stunden evaporiert. Die entstandene Nanopartikelsuspension wurde analysiert und weiterverarbeitet.

### 4.1.2 Ionische Gelierung

Die ionische Gelierung wurde genutzt, um Chitosan-Nanopartikel herzustellen. Bei saurem pH sind die primären Amine des Chitosans positiv geladen, wodurch es gut geeignet für diese Art der Nanopartikelherstellung ist. Als Gegenion wurde Carboxymethylcellulose bzw. Carboxymethylcurdlan verwendet. Beides sind Polymere, deren Carboxylgruppen je nach pH-Wert negativ

geladen sind. Durch elektrostatische Wechselwirkungen der Polymerstränge des Chitosans und des Gegenions entstehen bei den richtigen Bedingungen Partikel, die im Herstellungsmedium unlöslich sind und ausfallen.

Die in dieser Arbeit verwendete Methode wurde von Heidland adaptiert [85]. Das jeweilige Chitosan (Chitoscience 90/20 bzw. Chitoscience 90/200) wurde in 2 %-iger Essigsäure gelöst und mit 1-molarer Natriumhydroxid-Lösung auf den gewünschten pH-Wert eingestellt. Eine zweite Lösung aus Na-CMC bzw. CM-Curdlan wurde in partikelfreiem Wasser hergestellt. Diese Lösung wurde mittels Magnetrührer gerührt, während die Chitosan-Lösung langsam hinzugegeben wurde, wodurch gelartige Polymerpartikel ausgefallen sind.

#### 4.1.3 Aufreinigung

Nach der Herstellung wurden die wirkstoffhaltigen Nanopartikel aufgereinigt. Um unverkapselten Wirkstoff und überschüssigen Stabilisator zu entfernen, wurden die PLGA und Chitosan-CMC Nanopartikel durch fraktionierte Zentrifugation (siehe Tabelle 4-1) vom Suspensionsmedium getrennt, in insgesamt 50 ml partikelfreiem Wasser redispergiert und die Fraktionen vereinigt. Dies wurde einmal wiederholt, um alle Wirkstoffreste zu entfernen. Es wurde die Centrifuge 5430 R mit dem Rotor F-35-6-30 (Eppendorf AG, Deutschland) verwendet.

*Tabelle 4-1: Zentrifugationsschritte für PLGA-NP und Chitosan-CMC-NP.*

	PLGA-NP	Chitosan-CMC-NP
Fraktion 1	10 min, 1438 rcf, 4 °C	15 min, 1438 rcf, 4 °C
Fraktion 2	10 min, 3551 rcf, 4 °C	15 min, 3551 rcf, 4 °C
Fraktion 3	30 min, 7197 rcf, 4 °C	30 min 7197 rcf, 4 °C

#### 4.1.4 Gefriertrocknung

Um die hergestellten PLGA-Nanopartikel für eine eventuelle spätere Weiterverarbeitung oder Analytik haltbar zu machen, wurden sie in einer 1 %-igen Mannitollösung gefriergetrocknet. Durch Trocknung wird die chemische, physikalische und mikrobiologische Stabilität erhöht [86]. Es wurde der Gefriertrockner Alpha 1-4 von Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH (Deutschland) verwendet. Die Proben wurden für mindestens zwei Stunden bei -20 °C eingefroren. Als die Proben vollständig gefroren waren, wurde die Temperatur auf -10 °C geändert und der Luftdruck für den ersten Trocknungsschritt auf 2,56 mbar reduziert. Nach zwei Tagen wurde

die Temperatur auf 10 °C erhöht und der Luftdruck auf 0,0001 mbar für die Sekundärtrocknung eingestellt, die einen Tag dauerte.

### 4.1.5 Sprühtrocknung

Beim Sprühtrocknen werden aus einer Polymerlösung feste Partikel hergestellt. Dabei wird die Lösung in einem geeigneten erwärmten Gas zerstäubt, wodurch feinste Tröpfchen der Polymerlösung entstehen. Im Anschluss wird das Lösungsmittel in einem Trocknungszyylinder evaporiert und die Tröpfchen zu festen Partikeln eingetrocknet. Zuletzt werden die Partikel vom Trocknungsgas getrennt und das fertige Produkt aufgefangen.

Für die Herstellung von Chitosan-Partikeln mittels Sprühtrocknung wurden der Nano Sprühtrockner B-90 HP und der Mini Sprühtrockner B-290 der Firma Büchi Labortechnik AG (Flawil, Schweiz) verwendet, die in Abbildung 4-2 schematisch dargestellt sind. Für die Herstellung der Beta-Glucan Partikel wurde der Mini Sprühtrockner B-290 eingesetzt. Der Mini Sprühtrockner wurde mit einer Zweistoffdüse mit einem Durchmesser von 1,4 mm und dem Hochleistungszyklon verwendet, der laut Hersteller eine hohe Abscheiderate für kleine Partikel hat [87]. Mittels Durchflussmesser wurde ein Sprühdruk von 60 mm eingestellt, was einem Durchsatz von ca. 742 l/h entspricht. Für eine zuverlässige Trocknung wurde der Aspirator auf 100 % eingestellt, entsprechend 35 m<sup>3</sup>/h Trocknungsgas [88]. Variiert wurden je nach Herstellungsmethode die Einlasstemperatur, die Auslass-temperatur, die über die Geschwindigkeit der Schlauchpumpe eingestellt wurde, sowie die Feststoffkonzentration der Ausgangslösung.

Beim Nano Sprühtrockner erfolgt die Zerstäubung über einen Membranvernebler, bei dem eine Edelstahlmembran mit mikrometergroßen Bohrlöchern durch Ultraschallfrequenzen von 80 kHz bis 140 kHz zum Schwingen gebracht wird [89]. Nach dem Trocknen werden die Partikel über einen elektrostatischen Partikelsammler abgetrennt [90]. Die positiv geladene Sammelelektrode ist ein Zylinder, der den Trocknungszyylinder nach untenhin dicht abschließt. In der Mitte der Sammelelektrode befindet sich eine geerdete Elektrode. Durch eine Spannung von 17.000 V bis 20.000 V entsteht zwischen den zwei Elektroden ein starkes elektrisches Feld, wodurch die Partikel aufgeladen und an der Sammelelektrode abgeschieden werden.

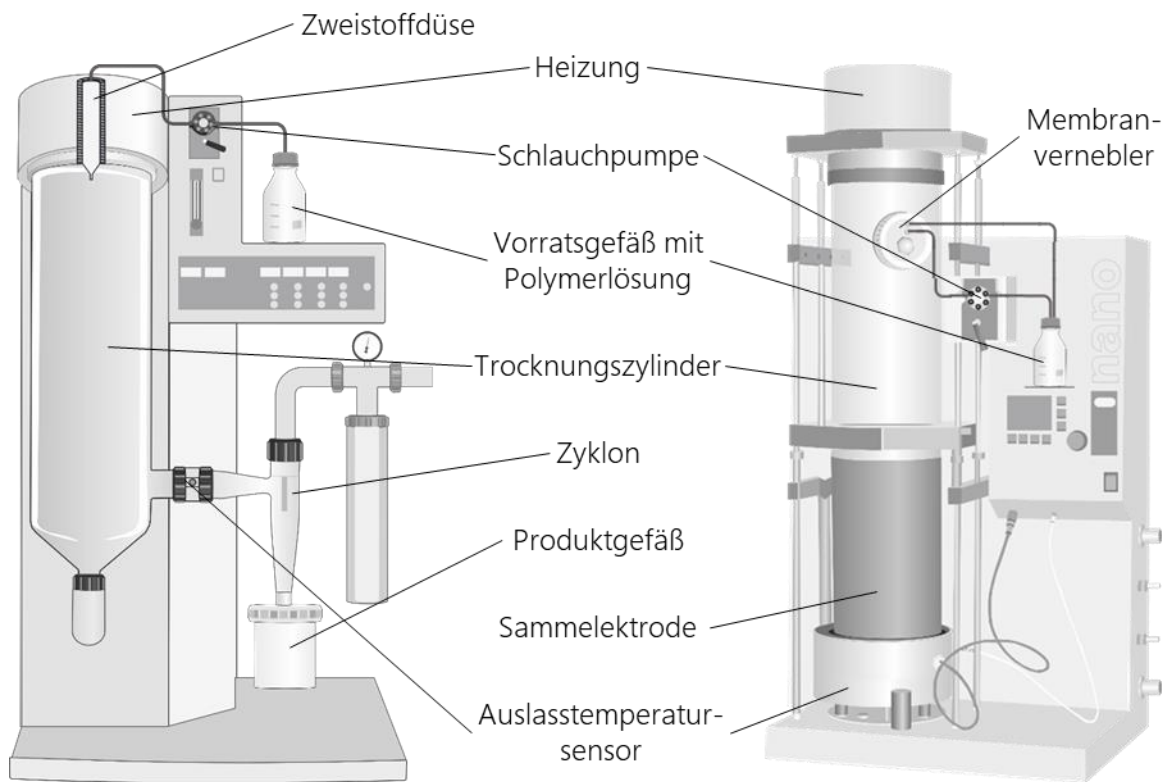


Abbildung 4-2: Mini Sprühtrockner B-290 (links) und Nano Sprühtrockner B-90 HP (rechts) der Firma Büchi (Schweiz)

## 4.2 Analytische Methoden

### 4.2.1 Bestimmung der Partikelgröße und Partikelgrößenverteilung mittels dynamischer Lichtstreuung

Mittels Photonen-Korrelations-Spektroskopie bzw. dynamischer Lichtstreuung (DLS) kann der hydrodynamische Durchmesser von Partikeln bestimmt werden, deren Größe im Submikrometer-Bereich liegt [91]. Der hydrodynamische Durchmesser wird durch die Diffusionseigenschaften eines Partikels definiert und schließt nicht nur das Volumen des Partikels ein, sondern auch die Teilchen des umgebenden Mediums, die durch Wechselwirkungen an dem Partikel gebunden sind und daher die Diffusionseigenschaften des Partikels beeinflussen.

Durch DLS wird die brown'schen Molekularbewegung von Teilchen gemessen, die als feste Partikel oder Tröpfchen in einer äußeren flüssigen Phase dispergiert sind [91]. Die brown'sche Molekularbewegung ist die zufällige Bewegung kleiner Teilchen, die durch Kollision mit Molekülen des umgebenden Mediums ausgelöst wird. Dies führt dazu, dass sich kleine Partikel schneller bewegen und große Partikel langsamer.

Durch die brown'sche Molekularbewegung fluktuiert das Streulicht, das durch die Bestrahlung der Probe mit monochromatischem Licht entsteht [91]. Das zurückgestreute Licht wird in einem bestimmten Winkel für einen kurzen Zeitabschnitt gemessen und in einem Intensitäts-Zeit-Diagramm aufgetragen (Abbildung 4-3). Über Autokorrelation kann die Geschwindigkeit der Partikel bzw. der translatorische Diffusionskoeffizient bestimmt werden (Abbildung 4-4). Wird eine Dispersion kleiner Partikel vermessen, fällt die Korrelationskurve früher ab, als wenn größere Partikel vermessen werden und je steiler die Kurve ist, desto monodisperser ist die Probe [92,93].

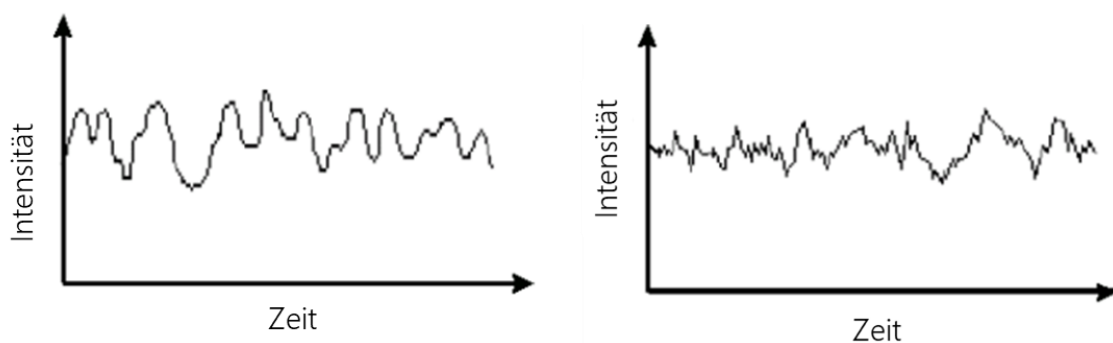


Abbildung 4-3: Intensitäts-Zeit-Diagramm großer Partikel (links) mit langsamerer Fluktuation und kleiner Partikel (rechts) mit schnellerer Fluktuation, adaptiert von Malvern Instruments [92].

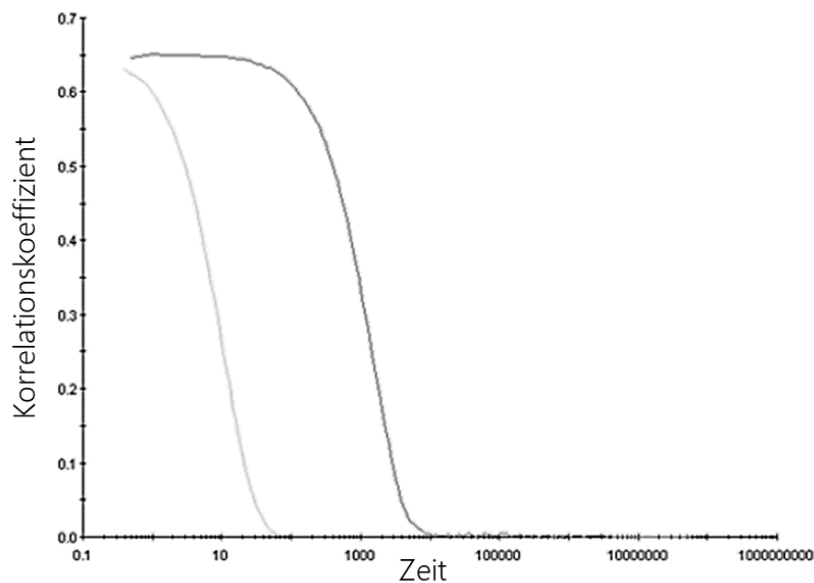


Abbildung 4-4: Korrelogramm des Intensitäts-Zeit-Diagramms kleiner Partikel (hellgrau) und großer Partikel (dunkelgrau) adaptiert von Malvern Instruments [92]

Um den hydrodynamischen Durchmesser ( $\sigma_H$ ) zu berechnen, muss ein mathematischer Zusammenhang zwischen diesem und der brown'schen Molekularbewegung, ausgedrückt durch den translatorischen Diffusionskoeffizienten ( $D$ ), hergestellt werden. Dieser Zusammenhang wird durch die Stokes-Einstein-Gleichung (Formel 4-1) beschrieben [92,94]. Die Geschwindigkeit der Teilchen hängt nicht nur von ihrer Größe ab, sondern auch von der Viskosität des umgebenden Mediums und der Temperatur, die für die korrekte Berechnung des hydrodynamischen Durchmessers mitbestimmt bzw. eingestellt werden müssen.

$$d_H = \frac{k_B \cdot T}{3 \cdot \pi \cdot D \cdot \eta} \quad \text{Formel 4-1}$$

$d_H$  = hydrodynamischer Durchmesser

$k_B$  = Boltzmann Konstante

$T$  = absolute Temperatur

$D$  = translatorischer Diffusionskoeffizient

$\eta$  = Viskosität

Als Maß für die Partikelgrößenverteilung dient bei der DLS der Polydispersitätsindex (PDI), der Werte zwischen Null und Eins annehmen kann. Je größer der PDI ist, desto polydispenser ist die Probe und desto größer ist die Partikelgrößenverteilung [95]. Ab wann eine Partikelgrößenverteilung eng oder weit ist, wird in der Literatur sehr unterschiedlich definiert. Ab einem PDI von über

0,4 bis 0,7 wird von einer weiten Verteilung gesprochen und bei einem PDI von unter 0,05 bis 0,1 von einer Monodispersen Probe [95–98]. Proben mit einem PDI unter 0,3 werden in der Literatur oftmals als homogen bezeichnet [99].

Der mittlere hydrodynamische Durchmesser und der Polydispersitätsindex wurden im Rahmen dieser Arbeit mit dem Zetasizer ZS Nano von Malvern Instruments (UK) gemessen. Dafür wurden die unverdünnten Proben bei 25 °C für 120 Sekunden equilibriert. Der Messwinkel betrug 173°. Es wurden je drei Messreihen hintereinander durchgeführt und der Mittelwert berichtet. Um eine zuverlässige mittlere Partikelgröße zu erhalten, wurde die Viskosität jeder Probe mit dem SV-10 Vibro-Viskosimeter von Malvern (UK) bestimmt.

### 4.2.2 Bestimmung der Partikelgröße mittels Laserlichtbeugung

Die mittlere Partikelgröße und Partikelgrößenverteilung der sprühgetrockneten Partikel wurden mittels Laserlichtbeugung (auch Laserdiffraktometrie genannt) bestimmt. Dazu wurden die Proben zuerst mit dem RODOS®-Modul (Sympatec GmbH, Deutschland) mit Luftdruck dispergiert. Für die Beta-Glucanpartikel wurde ein Dispergierdruck von 3 bar angelegt und für die sprühgetrockneten Chitosanpartikel ein Dispergierdruck von 6 bar. Die dispergierten Partikel wurden dann im Laserbeugungssensor HELOS® von Sympatec GmbH (Deutschland) unter Verwendung der R1-Linse (0,1 bis 35 µm) vermessen. Bei der Laserlichtbeugung entsteht ein charakteristisches Beugungsmuster, wenn ein monochromatischer Laserlichtstrahl auf die zu untersuchenden Partikel fällt. Dieses Beugungsmuster wird dann über mehrere Detektorringe gemessen. Die Intensitätsverteilung wird dann über einen Computer in die Partikelgrößenverteilung mittels Fraunhofer-Theorie umgerechnet. Die Fraunhofer-Theorie beschreibt die Lichtablenkung allein durch Beugung und vernachlässigt dabei die Auswirkung von Lichtbrechung, Reflexion und Absorption. Sie kommt ohne die Kenntnis optischer Konstanten aus und stellt eine gute Näherung dar, wenn die zu vermessene Partikel nicht transparent sind und im Vergleich zur Wellenlänge relativ groß. Die ermittelte Partikelgröße entspricht dabei dem Äquivalentdurchmesser der beugungsgleichen Kugel. Die Partikelgrößenverteilung wurde als Verteilungsdichte und Verteilungssumme dargestellt. Zusätzlich wurden der x10, x50 und x90 angegeben und der Span (Formel 4-5) berechnet.

$$\text{Span} = \frac{x_{10} - x_{90}}{x_{50}} \quad \text{Formel 4-2}$$

#### 4.2.3 Bestimmung des Zeta-Potentials

Ist ein geladenes Partikel in einer Flüssigkeit dispergiert, bildet dieses ein elektrisches Feld aus, das Einfluss auf umgebende Ladungen hat. Diese Kraft führt dazu, dass sich geladene Teilchen des umgebenden Mediums in zwei Schichten an das Partikel anlagern, die elektrische Doppelschicht genannt wird [100]. Die Sternschicht besteht aus entgegengesetzt geladenen Teilchen, die direkt an das Partikel angrenzen [100,101]. Innerhalb der Abscherebene sind Teilchen beider Ladungsarten mit der inneren Schicht assoziiert. Das elektrokinetische Potential des Partikels samt elektrischer Doppelschicht wird Zeta-Potential (ZP) genannt [101]. Werden die Partikel samt elektrischer Doppelschicht durch Elektrophorese bewegt, spiegelt das ZP die Potentialdifferenz zwischen der Doppelschicht und dem umgebenden stehenden flüssigen Medium wider [101,102]. Das Zeta-Potential ist dementsprechend nicht nur vom Partikel selber, sondern auch von den Eigenschaften des umgebenden Mediums abhängig. NP mit einem ZP zwischen -10 and +10 mV gelten als annähernd neutral, während NP mit einem ZP über +30 mV als stark kationisch und mit einem ZP unter -30 mV als stark anionisch gelten [100]. Das ZP kann Hinweise auf die Stabilität eines solchen Kolloides geben, da die Kolloidstabilität von der Summe der Van-der-Waals-Anziehungskräften und der elektrostatischen Abstoßungskräfte abhängt [102]. Bei einem ZP von mehr als  $\pm 30$  mV wird ein Kolloid als sehr stabil eingestuft, jedoch hängt die Kolloidstabilität auch von weiteren Faktoren, wie z.B. sterischen Wechselwirkungen, ab [102].

Bestimmt wurde das Zeta-Potential mit einer gefalteten Einwegkapillarzelle und dem Zetasizer ZS Nano von Malvern Instruments (UK), der die Laser-Doppler-Elektrophorese nutzt [103]. Bei dieser Messung befindet sich die Probe in einer gefalteten Einwegkapillarzelle, an die ein elektrisches Feld angelegt wird. Aufgrund des elektrischen Feldes bewegen sich geladene Teilchen, die in einer Flüssigkeit dispergiert sind, in Richtung der entgegengesetzt geladener Elektrode. Die Geschwindigkeit, mit der sich die Teilchen bewegen, wird als elektrophoretische Mobilität bezeichnet [100]. Die Geschwindigkeit hängt neben dem Zeta-Potential von der Stärke des elektrischen Feldes und der Dielektrizitätskonstante und der Viskosität des Mediums ab. Dieser Zusammenhang wird von der Henry-Gleichung beschrieben (Formel 4-3) [100,103].

Um die Geschwindigkeit der Partikel zu bestimmen, wird das durch die Probe gestreute Licht und ein Referenzlichtstrahl in einem Winkel von  $17^\circ$  gemessen [103]. Die beiden Lichtstrahlen führen

zu einem fluktuierenden Intensitätssignal, dessen Fluktuation proportional zur Geschwindigkeit der Teilchen ist.

$$U_e = \frac{2 \varepsilon \cdot z \cdot f(Ka)}{3 \eta} \quad \text{Formel 4-3}$$

$U_e$  = elektroforetische Mobilität

$\varepsilon$  = Dielektrizitätskonstante

$z$  = Zeta-Potential

$f(Ka)$  = Henrys Funktion

$\eta$  = Viskosität

#### 4.2.4 Bestimmung des isoelektrischen Punkts mittels Zeta-Potentialmessung

Weist ein kolloidal gelöstes Polymere eine Oberflächenladung auf, die vom pH-Wert abhängig ist, kann mittels Zeta-Potentialmessung der isoelektrische Punkt bestimmt werden. Wird der Lösung Säure zugegeben, führt dies zu einer Zunahme von positiven Ladungen bzw. zu einer Abnahme der negativen Ladungen, fügt man eine Base hinzu, führt dies zu einer Abnahme der positiven Ladungen bzw. zu einer Zunahme der negativen Ladungen. Aufgrund dessen, wird eine Zetapotenzial-zu-pH-Kurve bei niedrigem pH-Wert positiv und bei hohem pH-Wert niedriger oder negativ sein, wie in Abbildung 4-5 dargestellt [103]. Der Punkt, an dem die Zeta-Potential-zu-pH-Kurve den Nullpunkt schneidet wird als isoelektrischer Punkt bezeichnet.

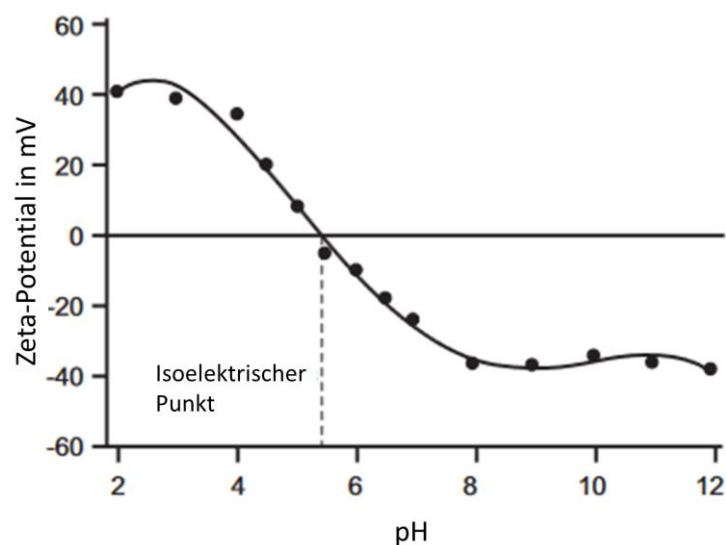


Abbildung 4-5: Zeta-Potenzial gegen pH-Wert mit isoelektrischen Punkt bei neutralem Zeta-Potential, adaptiert von Malvern Instruments [103]

#### 4.2.5 Bestimmung des Proteingehaltes und der Beladungseffizienz

Einige Nanopartikel wurden mit Ovalbumin als Modellwirkstoff beladen. Der Proteingehalt in den Partikeln bzw. im Überstand wurde mittels Bicinchoninsäure-Assay (BCA-Assay) bestimmt. Dieser Assay basiert auf der Reaktion von Bicinchoninsäure mit Kupferionen in Gegenwart von Proteinen. Unter alkalischen Bedingungen werden an den Peptidbindungen des Proteins  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen zu  $\text{Cu}^+$ -Ionen reduziert. Die  $\text{Cu}^+$ -Ionen bilden mit Bicinchoninsäure einen violetten Farbkomplex, der bei 562 nm sein Absorptionsmaximum hat [104]. Zur Durchführung des Assays wurde das Micro BCA-Assay Kit und das BCA Protein Assay Kit (beide von Thermo Fisher Scientific, USA) genutzt.

Zur Erstellung der Kalibriergeraden wurde die gleiche Charge Ovalbumin genutzt wie bei Herstellung der Partikel. Zur Berechnung des Proteingehaltes und der Beladungseffizienz wurde für die PLGA-Partikel eine direkte und für die Chitosan-Partikel eine indirekte Bestimmung der Proteinmenge gewählt. Die PLGA-Partikel wurden durch Zentrifugation vom Dispersionsmedium getrennt und anschließend in 0,2 M Natriumhydroxidlösung bei 37 °C für zwei Stunden aufgelöst. Durch basische Hydrolyse werden die Esterbindungen des PLGA gespalten, wodurch die löslichen Monomere Glycolsäure und Milchsäure entstehen und das Ovalbumin freigesetzt wird. Im Anschluss wurde die Lösung mit gleicher Menge 0,2 M Salzsäure neutralisiert. Die Chitosan-Partikel wurden ebenfalls durch Zentrifugation vom Dispersionsmedium getrennt. Dann wurde der Proteingehalt im Überstand bestimmt.

Je nach erwarteter Konzentration wurde die Proteinkonzentration der Lösung mittels BCA-Assay (20-2000  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) oder Micro BCA-Assay (0,5-20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) analysiert. In die Kavitäten einer 96-Well-Mikrotiterplatte wurden je 25  $\mu\text{l}$  Standard oder Probe pipettiert und mit jeweils 200  $\mu\text{l}$  Arbeitsreagenz versetzt (Reagenz A:Reagenz B (50:1)). Die Mikrotiterplatte wurde vorsichtig geschüttelt, abgedeckt und bei 37 °C für 30 Minuten inkubiert. Beim Micro BCA-Assay wurden je 150  $\mu\text{l}$  Standard oder Probe auf die Mikrotiterplatte pipettiert und mit 150  $\mu\text{l}$  Arbeitsreagenz versehen (Reagenz A:Reagenz B:Reagenz C (25:24:1)), gemischt und bei 37 °C für zwei Stunden inkubiert. Im Anschluss wurde die Absorption bei 562 nm gemessen. Über die Kalibriergerade wurde die Proteinkonzentration der Lösung bestimmt und die Masse des Proteins berechnet, die sich in den Partikeln befindet. Daraus wurden der Proteingehalt der Partikel (PG) berechnet (Formel 4-4) und die Beladungseffizienz (BE, Formel 4-5) sowie der Anteil des eingesetzten Proteins, der sich nach der Herstellung im Partikel befindet.

$$PG [\%] = \frac{m(\text{verkapseltes OVA})}{m(\text{verkapseltes OVA}) + m(\text{PLGA})} \cdot 100 \quad \text{Formel 4-4}$$

$$LE [\%] = \frac{m(\text{verkapseltes OVA})}{m(\text{eingesetztes OVA})} \cdot 100 \quad \text{Formel 4-5}$$

#### 4.2.6 Visualisierung der Partikel mittels Rasterelektronenmikroskop

Um die hergestellten Partikel optisch darzustellen, wurden Aufnahmen mit dem Rasterelektronenmikroskop (REM) Phenom World XL von Thermo Fisher Scientific Inc. (USA) gemacht. Dafür wurden die Proben als trockenes Pulver oder Suspension auf einen Träger aufgetragen. Feuchte Proben wurden im Anschluss luft- oder gefriergetrocknet. Um eine bessere Auflösung zu erhalten, wurden die Proben im Bal-Tech SCP 050 Sputter Coater von Bal-Tec (Lichtenstein) für 40 Sekunden behandelt und so mit einer dünnen Goldschicht versehen. Mit einer Arbeitsspannung von 10 kV wurden Aufnahmen der Partikel gemacht. Bei einigen Partikeln wurde die Partikelgröße mittels des Programms Phenom ProSuite gemessen.

#### 4.2.7 Wirkstofffreisetzung

Die fertige Formulierung der in Matrix gefriergetrockneten ovalalbuminhaltigen PLGA-Nanopartikel wurde auf Wirkstofffreisetzung untersucht. Das Lyophilisat mit einem theoretischen Ovalbumin-gehalt von 15 mg wurde in 150 ml Phosphatpuffer, pH 7,4 resuspendiert. Da Ovalbumin sehr gut in Phosphatpuffer löslich ist, wurden für den ganzen Versuch Sinkbedingungen mit weniger als 10 % der Sättigungskonzentration eingehalten. Die Probe wurde über einen Zeitraum von 49 Tagen bei 37°C geschüttelt und die Wirkstofffreisetzung in regelmäßigen Abständen bestimmt. Dazu wurden 500 µl aus der homogenen Probe entnommen. Da bei diesem Vorgehen sowohl Medium als auch Nanopartikel entnommen werden, wurde kein Freisetzungsmedium ergänzt und so das Verhältnis zwischen Arzneiform und Freisetzungsmedium konstant gehalten. Die Probe wurde bei 13000 U/min und 15°C zentrifugiert, bis der Überstand klar war. Die Ovalbuminkonzentration im Überstand wurde mittels BCA-Assay analysiert. Um verschiedene Proben miteinander vergleichen zu können, wurde der Ähnlichkeitsfaktor ( $f_2$ , Formel 4-6) berechnet [105].

$$f_2 = 50 \cdot \log \left\{ \left[ 1 + \frac{1}{n} \sum_{t=1}^n (R_t - T_t)^2 \right]^{-0.5} \cdot 100 \right\} \quad \text{Formel 4-6}$$

$n$  = Anzahl der Probenahmezeitpunkte

$t$  = Zeit

$R_t$  = Freisetzungswert der Referenzprobe

$T_t$  = Freisetzungswert der Probe

### 4.3 Mathematische und statistische Methoden

Die statistische Auswertung wurde mit Minitab® Version 18 (Minitab Inc., USA) und Excel 2016 (Microsoft Corporation, Redmond WA, USA) durchgeführt.

#### 4.3.1 Deskriptive Statistik

Um Ergebnisse einer Mehrfachbestimmung darzustellen, wurden der Mittelwert ( $\bar{x}$ ) durch Formel 4-7 und die Standardabweichung (SD) der Stichprobe durch Formel 4-8 berechnet.

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i \quad \text{Formel 4-7}$$

$$SD = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} \quad \text{Formel 4-8}$$

Um festzustellen, ob sich zwei unabhängige Gruppen voneinander unterscheiden, wurde ein Hypothesentest durchgeführt. Dafür wurde ein zweiseitiger t-Test mit der Statistiksoftware Minitab® Version 18 (Minitab Inc., USA) durchgeführt. Dabei besagt die Nullhypothese, dass die zwei Mittelwerte gleich sind. Das Signifikanzniveau wurde auf  $\alpha = 5 \%$  festgelegt. Bei einem p-Wert kleiner 0,05 wurde die Nullhypothese verworfen. Es wird also angenommen, dass die Grundgesamtheiten unterschiedlich sind.

#### 4.3.2 Statistische Versuchsplanung

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Versuchspläne wurden mit der Statistiksoftware Minitab® Version 18 (Minitab Inc., USA) erstellt und ausgewertet. Bei der Erstellung der Pläne wurde eine randomisierte Reihenfolge gewählt und die Versuchspunkte in dieser Reihenfolge abgearbeitet. Bei der Ausführung der Versuchspläne wurde darauf geachtet, dass die Parameter präzise eingestellt wurden und alle übrigen Variablen so konstant wie möglich gehalten wurden.

Nach Durchführen der praktischen Versuche und Übertragung der Ergebnisse kann der Versuchsplan ausgewertet, interpretiert und evtl. angepasst werden. Für alle Auswertungen wurde ein 95 %-iges beidseitiges Konfidenzniveau gewählt. Daraus ergibt sich ein Signifikanzniveau ( $\alpha$ ) von 0,05. Unter der Minitab Funktion „Terme“ kann angegeben werden, ob nur lineare Terme oder zusätzlich auch quadratische Terme und/oder Wechselwirkungen mit eingebunden werden

sollen. Für Screening Designs wurden nur lineare Terme untersucht, während bei Wirkungsflächenversuchsplänen alle Terme mit eingebunden wurden. Nicht signifikante Terme wurden mittels Rückwärtselimination nach und nach aus dem Modell entfernt, wobei ein  $\alpha$  für Ausschluss von 0,1 gewählt wurde. Größere Abweichungen der Daten von der Normalverteilung, können mittels Transformation reduziert werden. Dies war bei keinem meiner Datensätze nötig.

Nachdem ein Modell erstellt wurde, wurden die wichtigsten Kennzahlen und Diagramme kontrolliert, damit eingeschätzt werden kann, ob das Modell gut angepasst ist und man es für weitere Zwecke verwenden kann.

Wichtige Kennzahlen sind die p-Werte. Wenn der p-Wert des Modells kleiner als das Signifikanzniveau ist, kann daraus geschlossen werden, dass das Modell die Streuung in der Antwortvariablen erklärt [106]. Es wurden nur signifikante Modelle verwendet. Terme mit p-Werten kleiner als das Signifikanzniveau sind signifikant. Diese Terme wurden im Modell belassen und bei der Regressionsgleichung berücksichtigt.

In der Zusammenfassung des Modells wird  $S$  angegeben.  $S$  hat die gleiche Einheit wie die Antwortvariable und drückt aus, wie groß der Abstand der Daten von den angepassten Werten ist [107]. Je kleiner  $S$  ist, desto besser ist das Modell.  $R^2$  ( $R$ -Qd) ist der Prozentsatz der Streuung der Antwortvariablen, die durch das Modell erklärt wird. Die restliche Streuung wird nicht durch das Modell erklärt. Das prognostizierte  $R^2$  ( $R$ -Qd(prog)) gibt die Prognosefähigkeit für neue Beobachtungen an. Je größer es ist, desto besser können zukünftige Werte vorhergesagt werden. Ist es deutlich kleiner als  $R^2$ , deutet das auf eine Überanpassung des Modells hin. Da  $R^2$  besser wird, je mehr Terme ins Modell genommen werden, kann es sinnvoll sein, sich das korrigierte  $R^2$  ( $R$ -Qd(kor)) anzuschauen, um zu entscheiden, welche Terme ins Modell einbezogen werden.

Zusätzlich sollten die Residuendiagramme überprüft werden, um einzuschätzen, ob das Modell gut an die Daten angepasst ist [108]. Im Wahrscheinlichkeitsnetz für Normalverteilung sollten alle Punkte möglichst nah an der Geraden liegen und nicht in erkennbarem Muster um die Gerade schwanken. Wenn die Punkte keine Gerade bilden, könnte das auf eine Nicht-Normalverteilung hindeuten. Im Residuen-vs.-Anpassungen-Diagramm sollten die Punkte zufällig auf beiden Seiten der gestrichelten Nulllinie verteilt sein und kein erkennbares Muster aufweisen. Ist ein Punkt weit von der Linie entfernt, kann das ein Hinweis für einen Ausreißer sein. Ist eine Krümmung als

Muster erkennbar, kann dies auf fehlende Terme höherer Ordnung hinweisen. Bei einem definitiven Screening Design könnte man dann die Daten neu auswerten und quadratische Terme und/oder Wechselwirkungen hinzufügen. Wenn die Residuen gegen die Reihenfolge aufgetragen werden, sollte kein eindeutiges Muster erkennbar sein, das auf systematische Fehler oder einen Trend hinweist. Bei Hinweisen auf einen Trend oder systematischen Fehler sollte die Versuchsreihe kritisch betrachtet und gegebenenfalls wiederholt werden. Punkte, die weit von der gestrichelten Linie entfernt sind, könnten Ausreißer sein. Für jeden potentiellen Ausreißer muss entschieden werden, ob der Versuchspunkt wiederholt, neu analysiert, neu berechnet oder weggelassen werden soll. In dieser Arbeit wurden nur Modelle verwendet deren Residuen-Diagramme keine Auffälligkeiten aufwiesen.

Für jeden ausgewerteten Versuchsplan gibt Minitab® die Regressionsgleichung an. Diese kann genutzt werden, um zukünftige Ergebnisse für neue Parametereinstellungen vorherzusagen oder um eine optimale Einstellung für ein gewünschtes Ergebnis zu finden. Zusätzlich habe ich mittels Minitab® Haupteffekte- und Wechselwirkungsdiagramme erstellt. Im Haupteffektediagramm kann man schnell erkennen, welchen Effekt jeder Parameter hat und anhand der Steigung, wie groß dieser ist. Im Wechselwirkungsdiagramm ist die Antwortvariable gegen einen Parameter mit definiertem Wert für die abhängige Variable aufgetragen. Für Wirkungsflächendesigns wurden zusätzlich Wirkungsflächendiagramme erstellt, die einen guten visuellen Gesamtüberblick über den Versuchsraum liefern.

## 5 Ergebnisse und Diskussion

### 5.1 Entwicklung von PLGA-Nanopartikeln mittels Doppelemulsions-Lösungsmittel- televaporationsmethode

Für die Herstellung von mit Ovalbumin beladenen PLGA-Nanopartikeln wurde eine Herstellungsmethode von Jahnke [81] ausprobiert und so angepasst, dass mit ihr zielsicher Nanopartikel hergestellt werden können, die vorher definierte Eigenschaften besitzen und so einem bestimmten Produktprofil entsprechen. Unter Anwendung des Konzeptes „Quality by Design“ wurde zuerst das Ziel der Entwicklung definiert und das Qualitätszielproduktprofil (QTPP) erarbeitet. Dann wurde ausgearbeitet, welche Produkteigenschaften als kritische Qualitätsmerkmale (CQA) gelten und welche davon im Rahmen von statistischen Versuchsplänen (DoE) als Zielgrößen untersucht werden sollen. Einige der übrigen Eigenschaften des QTPP wurden im weiteren Verlauf der Entwicklung untersucht.

#### 5.1.1 Ziel der Entwicklung und Definition des Zielproduktes

Neben der Gesamtzielsetzung dieser Arbeit, ein allgemeines Prozessverständnis zu gewinnen, um verschiedene Nanopartikelherstellungsmethoden miteinander vergleichen zu können, soll die Entwicklung der PLGA-Nanopartikel dazu dienen exemplarisch darzustellen, wie ein systematischer Entwicklungsansatz im Sinne des Quality by Design (QbD) unter Anwendung statistischer Versuchsplanung umgesetzt werden kann. Es sollen ovalbuminbeladene PLGA-Nanopartikel generiert werden, die vielfältige Einsatzgebiete haben können. Dadurch könnten die Endprodukte nicht nur für konkrete Therapien genutzt werden, sondern auch für die weitere Forschung, bei der man unterschiedliche Produkteigenschaften miteinander vergleichen möchte. Zum Beispiel können die Produkte für Zellversuche genutzt werden, um herauszufinden, welche Partikelgröße am besten aufgenommen wird oder welche Proteinbeladung einen guten Effekt erzielt. Da Veränderungen an der Oberfläche noch zu einem späteren Zeitpunkt erfolgen können, habe ich mich hier auf die Herstellung des „Grundkörpers“ konzentriert. Um einen möglichst großen Einsatzbereich mit den Endprodukten abdecken zu können, orientiert sich das Zielproduktprofil an der allgemeinen Funktion von nanopartikulären Trägern. Diese ist es, ausreichend Wirkstoff an einen Zielort zu bringen und ihn dort kontrolliert freizusetzen, so dass der Wirkstoff gezielt einen pharmakologischen Effekt hervorrufen kann [20]. Das Erreichen des Zielorts bzw. der Zielzelle ist überwiegend von der Partikelgröße, Partikelform, Oberflächenladung und

Oberflächenfunktionalisierung abhängig. Zudem darf der Wirkstoff bis zum Erreichen des Wirkortes nicht abgebaut werden, soll danach aber im Idealfall vollständig freigesetzt werden. Die Wirkstoffbeladung sollte so gewählt werden, dass eine Wirkung am Zielort erreicht wird, ohne für die Zielzelle oder das Zielgewebe toxisch zu sein. Das sich daraus ergebende Qualitätsproduktprofil ist in Tabelle 5-1 dargestellt.

*Tabelle 5-1: Qualitätszielproduktprofil der PLGA-Nanopartikel*

QTTP-Element	Ziel	Begründung
Produkt	Nanosuspension bzw. getrocknete Nanosuspension	Für die weitere Verarbeitung oder Zelltests werden die Partikel in Suspension benötigt. Bei therapeutischer oder diagnostischer Anwendung ist die benötigte Arzneiform vom Applikationsort und der Funktion abhängig.
Partikelgröße	Verschiedene Stufen zwischen 1 und 1000 nm	Es sollen „kleine“, „mittlere“ und „große“ Nanopartikel hergestellt werden (hier wurden 250 nm, 500 nm und 700 nm gewählt).
Partikelgrößenverteilung	Enge Partikelgrößenverteilung, idealerweise PDI <0,3	Um Ergebnisse zukünftiger Versuche einer Partikelgröße zuordnen zu können und um sicher zu gehen, dass möglichst viele Partikel ihr Ziel erreichen, sollte die Größenverteilung nicht zu breit sein.
Proteingehalt	Verschiedene Stufen zwischen 1 und 50 %	Es sollen Partikel mit „geringem“, „mittlerem“ und „hohem“ Proteingehalt hergestellt werden (hier wurden 4,5 %, 20 % und 40 % gewählt).
Stabilität	Mind. 30 Tage im KS	Das Endprodukt soll über einen ausreichend langen Zeitraum physikalisch stabil sein, damit es für weitere Versuche zur Verfügung stehen kann.
Redispergierbarkeit (bei getrockneter Nanosuspension)	Geringe Abweichung zur ursprünglichen Nanosuspension	Die Redispergierbarkeit aus einer getrockneten Nanosuspension ist ausschlaggebend für den Erhalt der Funktionalität des Endproduktes.
Wirkstofffreisetzung	Geringe initiale Freisetzung (<10 %, besser <5 %), danach Freisetzung über längeren Zeitraum möglich	Protein soll durch die PLGA-Hülle gut geschützt werden und sollte sich daher nicht sofort freisetzen. Protein soll erst in der Zielzelle freigesetzt werden, um sicherzugehen, dass es keine Interaktionen mit Nicht-Zielgewebe gibt (Toxizität).
Sicherheit	Nur sichere Ausgangsstoffe verwenden	Alle Stoffe, die sich noch im Endprodukt befinden, sollten für die parenterale Gabe zugelassen sein. Alle bedenklichen Ausgangsstoffe dürfen im finalen Produkt nicht nachweisbar sein.

Konkret sollen (getrocknete) Nanopartikelsuspensionen hergestellt werden, die eine mittlere Partikelgröße von 250 nm, 500 nm und 700 nm aufweisen, mit einem PDI unter 0,3 und einem Proteingehalt von jeweils 4,5 %, 20 % und 40 %. Für mindestens ein getrocknetes Produkt soll gezeigt werden, dass es mindestens 30 Tage im Kühlschrank physikalisch und chemisch stabil ist. Wird das trockene Produkt redispergiert, soll es möglichst den Eigenschaften der Nanopartikelsuspension vor der Trocknung entsprechen und eine geringe initiale Wirkstofffreisetzung aufweisen.

### 5.1.2 Auswahl der kritischen Qualitätsmerkmale

Vor der ersten Herstellung sollte definiert sein, welche Eigenschaften des Endproduktes analysiert werden sollen. Als Grundlage hierfür dienen die kritischen Qualitätsmerkmale, die sich aus dem Qualitätsproduktprofil ergeben. Es sollten gut messbare Größen sein, für die es eine funktionierende Analytik gibt. Für Nanopartikel ist die Partikelgröße eine der wichtigsten Eigenschaften, denn sie beeinflusst neben der Verteilung im Körper auch die Wirkstoffbeladung, Wirkstofffreigabe und Pharmakokinetik der Nanopartikel [20]. Zum Beispiel können kleine Partikel aufgrund ihres Oberflächen-Volumen-Verhältnis weniger Wirkstoff verkapseln. Handelt es sich um eine Formulierung, bei der der Wirkstoff an der Oberfläche angebracht ist, können sie jedoch mit mehr Wirkstoff beladen werden. Zudem setzen sie den Wirkstoff aufgrund der großen Oberfläche und kurzen Diffusionswege potenziell schneller frei [20]. Die Partikelgröße wurde als z-Average bzw. mittlere Partikelgröße mittels DLS gemessen. Als Anhaltspunkt für die Partikelgrößenverteilung diente der PDI.

Ein weiteres kritisches Qualitätsmerkmal ist der Proteingehalt, also die Gesamtmasse an Protein pro Gesamtmasse der Nanopartikel (Formel 4-4). Die Beladungseffizienz, also die Masse an eingesetztem Protein, die im Endprodukt verbleibt (Formel 4-5), kann je nach Wirkstoff und Methode sehr unterschiedlich sein. Wichtig ist, dass die Beladungseffizienz hoch genug ist, um auf eine bestimmte Proteinbeladung zu kommen. Ansonsten ist sie vor allem ein wirtschaftlicher Faktor und wurde daher in dieser Arbeit zwar ausgewertet, ist aber kein kritisches Qualitätsmerkmal, auf das optimiert wurde.

Die Wirkstofffreisetzung wird als Verlauf über einen bestimmten Zeitraum dargestellt. Die nanopartikelären Träger sollen erst bei Erreichen des Zielgewebes bzw. der Zielzelle den Wirkstoff freisetzen. Solange sie sich im Blutkreislauf befinden, sollen sie wenig bis gar keinen Wirkstoff freigeben. Dementsprechend sollte ein optimales Freisetzungsprofil einen geringe initiale

Wirkstofffreisetzung zeigen und erst im Anschluss einen Großteil des Wirkstoffes freisetzen. Als kritische Qualitätsmerkmal für die initiale Freisetzung wurde die freigesetzte Menge nach 24 h gewählt. Zudem wird das gesamte Freisetzungsprofil bei pH 7,4 betrachtet.

Es ist wichtig, dass das Endprodukt über einen gewissen Zeitraum stabil ist und im Falle eines getrockneten Endproduktes dieses auch wieder in wässrigem Medium redispergierbar ist. Als kritische Qualitätsmerkmale wurden hier die mittlere Partikelgröße, PDI und die Gesamtproteinmenge zu einem bestimmten Zeitpunkt gewählt. Diese sollten nicht oder nur geringfügig von den Werten zum Startzeitpunkt bzw. vor dem Trocknen abweichen. Während Partikelgröße, PDI und der Proteingehalt für die Funktionalität der Nanopartikel wichtig sind, kann zusätzlich noch das Zeta-Potential bestimmt werden, das eine gute Größe ist, um Veränderungen der Nanosuspension festzustellen, die evtl. durch die anderen Größen nicht feststellbar sind.

Die kritischen Qualitätsmerkmale sollten während der Entwicklung bestimmt und evtl. optimiert werden. Da die Herstellung des Endproduktes aus einzelnen Teilprozessen (Herstellung, Aufreinigung und Stabilisieren der Nanopartikel) besteht, wurden für jeden Teilprozess nur die entsprechenden CQA analysiert. Die mittlere Partikelgröße, der PDI und der Proteingehalt wurden direkt nach der Herstellung analysiert. Zudem wurde die Beladungseffizienz berechnet.

Das Zeta-Potential ist für die PLGA-Nanosuspension kein kritisches Qualitätsmerkmal, da es bei sterisch stabilisierten Nanopartikeln nicht für die kolloidale Stabilität ausschlaggebend ist. Zudem gibt es keine eindeutige Zielgröße, bei der das Zeta-Potential die Verteilung im Körper positiv beeinflusst. Dazu kommt, dass sich die Nanopartikel der einzelnen Chargen direkt nach der Herstellung in unterschiedlichen Medien befinden. Da das Zeta-Potential stark vom Medium abhängig ist, müssten alle Partikel in das gleiche Medium überführt werden, um vergleichbare Daten zu generieren. Daher wurde das Zeta-Potential nur im Rahmen der Vorversuche und der finalen Formulierung gemessen, jedoch nicht während des Optimierungsprozesses.

Die CQA, die Einfluss auf die Freisetzung, Stabilität und Redispergierbarkeit haben, wurden vor und nach dem Trocknen der Nanosuspension bestimmt, jedoch nicht im Rahmen der DoE-Versuche.

### 5.1.3 Praktisches Vorgehen und Vorversuche

Bei der Herstellungsmethode handelt es sich um eine Doppelemulsions-Lösungsmittelveraporationsmethode, bei der erst eine Emulsion aus dem in einer wässrigen Phase (W1) gelösten Wirkstoff und dem in einer organischen Phase (O) gelösten Polymer hergestellt wurde. Diese erste Emulsion wurde dann in einer wässrigen äußeren Phase (W2) emulgiert, wodurch eine Doppelemulsion entstand. Durch das Evaporieren der organischen Phase fällt das Polymer aus und eine Nanosuspension entsteht. Für diesen Schritt wurde das Volumen durch eine Stabilisatorlösung (S) erhöht.

Um die große Variabilität der Partikelgröße und des Proteingehalts aus dem QTPP zu realisieren, wurden zwei verschiedene Varianten der Methoden ausprobiert, bei denen unterschiedliche Homogenisatoren verwendet wurden, um die Emulsionen herzustellen. Zuerst wurde die ursprüngliche Methode, bei der ein Rotor-Stator-Homogenisator (Ultra-Turrax®) eingesetzt wurde, untersucht und optimiert. Für die zweite Variante wurde dieser durch einen Ultraschallhomogenisator ausgetauscht. Zuletzt wurden beide Varianten zu einer dritten kombiniert, da noch nicht alle Zielgrößen und Zielproteingehalte erreicht wurden.

Zu Beginn wurden beide Herstellungsvarianten mit möglichst ähnlichen Parametern und gleicher Formulierungszusammensetzung (Tabelle 5-2) untersucht. Da sich bei der Homogenisierung mittels Ultraschall die Proben stark erwärmt hatten, wurde die Beschallungszeit reduziert.

*Tabelle 5-2: Zusammensetzung der Formulierung für die Chargen UT\_start und US\_start*

Phase	Menge	Zusammensetzung
1. hydrophile Phase	1600 µl	4,0 % (m/V) OVA in Phosphatpuffer pH 7,4
Organische Phase	4 ml	2,5 % (m/V) PLGA in Ethylacetat
2. hydrophile Phase	12 g	5 % (m/m) PVA in Wasser
Stabilisatorlösung	40 g	1 % (m/m) PVA in Wasser

Die Charge UT\_start wurde mittels Ultra Turrax® homogenisiert. Dafür wurden die innere Emulsion (W/O) für 60 Sekunden bei 20.500 rpm und die Doppelemulsion (W/O/W) für 120 Sekunden bei 20.500 rpm homogenisiert. Im Anschluss wurde das Ethylacetat über Nacht bei 400 rpm evaporiert. Die Charge US\_start wurde in der gleichen Zusammensetzung hergestellt und mittels Ultraschallhomogenisator bei einer Amplitude von 20 % erst für 20 Sekunden (W/O) und anschließend bei gleicher Amplitude für 40 Sekunden (W/O/W) homogenisiert.

Mittels beider Methoden-Varianten wurden Partikel im Nanometerbereich hergestellt, die sich in der Partikelgröße, jedoch nicht in der Partikelgrößenverteilung (PDI) und im Zeta-Potential voneinander unterschieden (Tabelle 5-3). Die Herstellung mittels Ultraschall-Homogenisierung lieferte signifikant kleinere Partikel ( $p = 0,002$ ), obwohl bereits eine geringe Amplitude und eine verringerte Homogenisierungsdauer als bei der Ultraturrax-Homogenisierung gewählt wurden. Dies ist ein Hinweis darauf, dass der Energieeintrag durch Ultraschall bei den gewählten Einstellungen deutlich höher ist als beim Rotor-Stator-Prinzip. Die Partikelgrößenverteilungen der zwei Chargen sind in Abbildung 5-1 gut erkennbar.

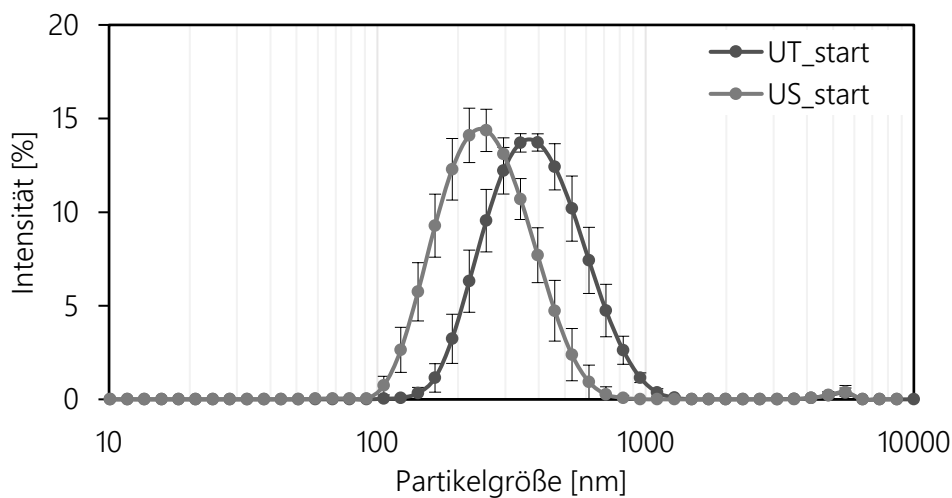


Abbildung 5-1: Partikelgrößenverteilung der Chargen, die mittels Ultra Turrax® (UT) und Ultraschallhomogenisator (US) hergestellt wurden ( $n = 3$ , Fehlerbalken = SD)

Die zwei Intensitätskurven haben einen ähnlichen Verlauf, der leicht zueinander verschoben ist. Trotz gleicher Formulierungszusammensetzung unterschieden sich beide Produkte auch deutlich im Proteingehalt und in der Beladungseffizienz (Tabelle 5-3). Dies könnte an dem unterschiedlichen Energieeintrag bei der Homogenisierung liegen. Die Einflüsse auf die Partikeleigenschaften wurden in den weiteren Abschnitten dieses Kapitels untersucht.

Tabelle 5-3: Partikeleigenschaften ( $n = 3$ ,  $\pm$  Standardabweichung)

Charge	Mittlere Partikelgröße [nm]	PDI	Zeta-Potential [mV]	Beladungseffizienz [%]	Proteingehalt [%]
UT_start	$366,8 \pm 22,3$	$0,169 \pm 0,030$	$-9,5 \pm 1,6$	$12,56 \pm 4,02$	$7,46 \pm 2,23$
US_start	$241,2 \pm 19,5$	$0,180 \pm 0,021$	$-9,6 \pm 0,4$	$45,79 \pm 4,05$	$22,66 \pm 1,54$
p-Wert (US zu UT)	0,002	0,621	0,899	0,001	0,001

### 5.1.4 Herstellung mittels Rotor-Stator-Homogenisator

Im nächsten Schritt wurde die Herstellungsmethode, bei der der Ultra-Turrax® zur Homogenisierung verwendet wurde, auf kritische Prozessparameter untersucht und optimiert. Im Anschluss wurden die Prozessparameter so eingestellt, dass die Nanopartikel vorher definierten kritischen Qualitätsmerkmalen entsprächen.

#### 5.1.4.1 Identifikation und Evaluation der Prozessparameter

Nachdem anhand der kritischen Qualitätsmerkmale entschieden wurde, welche Zielgrößen mittels statistischen Versuchsplänen analysiert und optimiert werden sollen, musste im nächsten Schritt identifiziert werden, welche Variablen bei der jeweiligen Herstellungsvariante Einfluss auf diese Qualitätsmerkmale haben können und dementsprechend als Prozessparameter variiert werden sollten. Durch die Vorversuche bekommt man einen ersten Eindruck, welche variierbaren Prozessparameter und Materialeigenschaften es gibt. Um eine möglichst vollständige Liste zu erhalten, habe ich mich entschieden, ein Ishikawa-Diagramm als Ursachen-Wirkungs-Diagramm zu erstellen, das die 5 Ms (Mensch, Material, Maschine (Equipment), Methoden (Prozessparameter), Mitwelt (Umwelt)) enthält und zusätzlich die Formulierungszusammensetzung als separate Ursache betrachtet (Abbildung 5-2). Damit sind bereits sechs Hauptursachen definiert, die dabei helfen, möglichst viele Ursachen zu finden. Auch wenn nicht alle Prozessvariablen auf einmal untersucht werden können, erhält man eine umfangreiche Liste, die im Lebenszyklus der Methode hilfreich sein kann. Damit kann das hier ausgearbeitete Ishikawa-Diagramm im späteren Verlauf der Entwicklung oder in der Produktion für eine Risikoanalyse genutzt werden. Bei einer Risikoanalyse geht es vor allem darum zu bewerten, wie stark sich potenzielle Abweichungen auf das Endprodukt und die CQA auswirken. Falls im späteren Lebenszyklus der Herstellungsmethoden Fehlerquellen analysiert werden, ist es sinnvoll, nicht genauer untersuchte und als unbekannte Prozessparameter klassifizierte Prozessvariablen genauer zu betrachten.

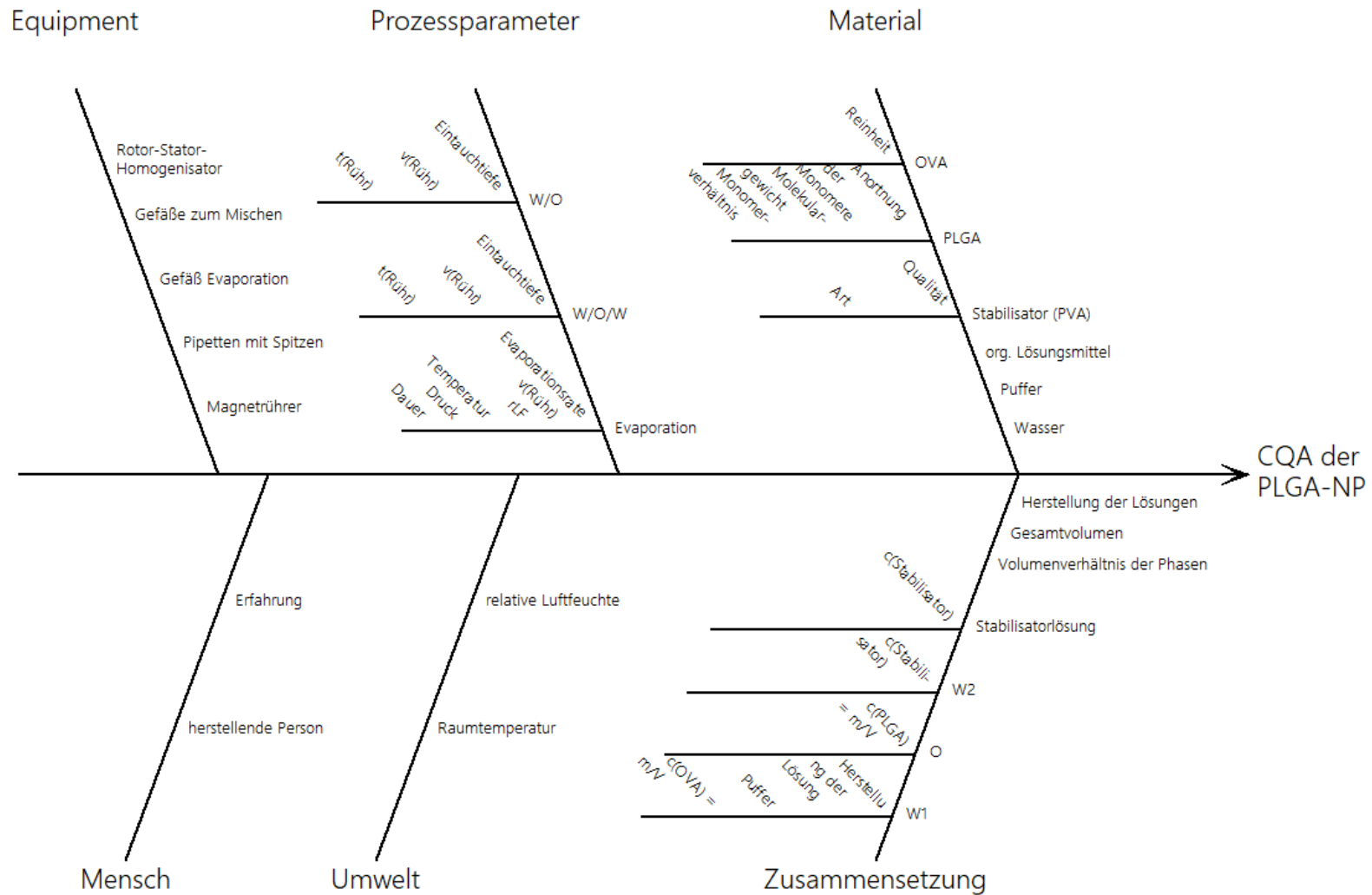


Abbildung 5-2: Ishikawa (Fischgräten)-Diagramm zum Sammeln der potenziellen Einflussfaktoren (Ursachen) für die CQA (Wirkung)

In der frühen Phase der Entwicklung geht es jedoch zuerst darum, die Variablen zu identifizieren, mit denen man die CQA der Nanopartikel steuern kann, also kontrollierbare Variablen mit hohem Einfluss. Aufgrund dessen habe ich mich entschieden, vorerst nur die Prozessparameter inklusive der Formulierungszusammensetzung für eine praktische Prozessanalyse in Betracht zu ziehen. Da es sich dabei immer noch um mehr Variablen handelt als für praktische Versuche in Bezug auf Aufwand und Nutzen angemessen sind, habe ich evaluiert, welche Variablen als Faktoren in einem DoE untersucht werden sollen. In die Evaluation wurde mit einbezogen, wie groß der Einfluss auf Partikelgröße, PDI und Proteingehalt vermutet wird, wie genau, weit, reproduzierbar, stufenlos und aufwändig die Faktorstufen einstellbar sind und welches Equipment zur Verfügung steht. Zudem können nur Parameter untersucht werden, die voneinander unabhängig einstellbar sind. Für eine sinnvolle Einschätzung sollte neben dem pharmazeutischen Wissen und der Erfahrung aus den Vorversuchen wissenschaftliche Literatur einbezogen werden, bei der ähnliche Emulsionen oder Nanopartikel untersucht wurden. Auch wenn Erkenntnisse aus anderen Systemen nicht einfach übertragen werden können, bieten sie trotzdem einen guten Anhaltspunkt. Im Folgenden werden die Faktoren im Einzelnen bewertet:

Die Eintauchtiefe bietet beim Herstellen der inneren Phase nur sehr wenig Spielraum, da der Rotor des Ultra-Turrax mit Flüssigkeit bedeckt sein muss. Zudem hat sich in den Vorversuchen gezeigt, dass für das Herstellen der Doppelemulsion die Ultra-Turrax®-Spitze von oben nach unten durch die Emulsion geführt werden muss, um ein gleichmäßiges Durchmischen der Phasen zu gewährleisten. Daher ist die Eintauchtiefe kein guter Parameter, um die Eigenschaften des Endproduktes zu steuern. Zudem kann es schwierig sein, die Eintauchtiefe bzw. das Bewegen der Ultra-Turrax-Spitze durch die Emulsion reproduzierbar einzustellen.

Mainardes et al. hat für die Untersuchung einer Einfachemulsions-Lösungsmittelveaporationsmethode die Hypothese aufgestellt, dass bei schnellerer Evaporation die Diffusion des Wirkstoffes Praziquantel in die äußeren Phase verringert wird und dadurch die Wirkstoffbeladung erhöht werden müsste [109]. Bei einer Doppelemulsion müsste der hydrophile Wirkstoff zuerst in die organische Phase diffundieren und dann in die äußere wässrige Phase. Auch hier liegt die Vermutung nahe, dass bei höherer Evaporationsrate die Diffusion verringert wird und die Wirkstoffbeladung erhöht wird. Dennoch wurde die Evaporationsrate nicht als Parameter für die Untersuchung mittels statistischen Versuchsplans ausgewählt, da der zeitliche Aufwand dieser

Untersuchung ohne den Einsatz eines Reihenrotationsverdampfers enorm hoch wäre, da jede Charge einzeln verdampft und das Gerät im Anschluss gereinigt werden müsste. Für den Fall, dass die Wirkstoffbeladung der Endprodukte noch nicht hoch genug sein sollte, könnte man die Evaporationsrate mittels OFAT untersuchen.

Der von mir verwendete Ultra-Turrax® T25 hat fünf Stufen für die Rotationsgeschwindigkeit, die einen Bereich von 8500 bis 24000 rpm abdecken. Damit lässt sich die Rotationsgeschwindigkeit sehr genau und reproduzierbar einstellen und sich die Weite der Stufen gut, aber nicht stufenlos, wählen. Hussein et al. und Narayanan et al. haben bereits gezeigt, dass die Homogenisierungsgeschwindigkeit einen Einfluss die Partikelgröße haben kann [110,111]. Beide haben Doppalemulsions-Evaporationsmethoden untersucht, um linamarin- bzw. hyaluronidasebeladene PLGA-Nanopartikel herzustellen. Zudem ist auch in der Theorie der Energieeintrag durch die Rotationsgeschwindigkeit ein wichtiger Faktor, um neue Grenzflächen in einer Emulsion zu schaffen und dadurch die Tröpfchengröße zu verringern, was potenziell zu kleineren Partikeln führt. Wie die Geschwindigkeit den PDI und die Wirkstoffbeladung beeinflusst, ist deutlich schwieriger einzuschätzen. Ähnliches gilt für die Homogenisierungsdauer, sie ist sehr gut einstellbar und es kann ein Einfluss auf die Partikelgröße erwartet werden. Daher wurde die Rotationsgeschwindigkeit und Homogenisierungsdauer für sowohl die innere Emulsion als auch für die Doppalemulsion als Faktoren des DoE untersucht.

Von der Zusammensetzung der Formulierung können alle Konzentrationen, die Volumina der einzelnen Phasen, das Volumenverhältnis der Phasen und das Gesamtvolumen einen Einfluss auf das Endprodukt haben. Zusätzlich sind sie genau, stufenlos und reproduzierbar einstellbar und die Stufen sind mit hohem Abstand wählbar. Die Parameter sind jedoch nicht unabhängig voneinander. Daher kann nicht innerhalb eines Versuchsplans untersucht werden, ob die Konzentration oder die Masse der gelösten Substanzen oder das Volumen der Phase ausschlaggebend für den Einfluss auf die CQA sind. Daher habe ich mich dazu entschieden, das Volumenverhältnis der Phasen und das Gesamtvolumen konstant zu halten und die Konzentrationen der einzelnen Phasen einzustellen. Die Masse der Substanzen ergibt sich dann aus der Konzentration und dem Volumen (Formel 5-1). Dementsprechend wurden die OVA-, PLGA und PVA-Konzentration als Faktoren im DoE untersucht.

$$M = c \cdot V \quad \text{Formel 5-1}$$

#### 5.1.4.2 Identifikation der signifikanten Prozessparameter (CPP) mittels definitivem Screening Versuchsplan

Im letzten Abschnitt wurde entschieden, welche Parameter im praktischen Versuchsteil mittels statistischem Versuchsplan untersucht werden sollen. Da es sich dabei um sieben Prozessparameter handelt, ist es sinnvoll, mittels eines Screening-Versuchsplans die Parameter zu identifizieren, die den größten Einfluss haben. Bei der Wahl der Faktorstufen wurde sich an den Parametern der Vorversuche orientiert, wobei die Faktorstufen so gewählt wurden, dass potenziell etwas größere Partikel entstehen. (Tabelle 5-4).

*Tabelle 5-4: Parametereinstellung des definitiven Screening Versuchsplans zur Untersuchung der Herstellungsmethode von OVA-beladenen PLGA-Nanopartikeln mittels Rotor-Stator-Homogenisator (Ultra Turrax®)*

Parameter	Tief	Mittel	Hoch
c (OVA) [%]	2	3	4
c (PLGA) [%]	3	6	9
Rührgeschwindigkeit (W/O) [upm]	9500	-	20500
Homogenisierungsdauer (W/O) [s]	30	60	90
c (PVA) [%]	2	3,5	5
Rührgeschwindigkeit (W/O/W) [upm]	8000	-	13500
Homogenisierungsdauer (W/O/W) [s]	60	105	150

Der mittels Minitab 18 Software generierte und randomisierte Versuchsplan wurde in der vorgegebenen Reihenfolge abgearbeitet und die Nanopartikelsuspensionen analysiert (Tabelle 5-5). Es wurden PLGA-Partikel mit einer mittleren Partikelgröße von 374 nm bis 5565 nm, einem PDI von 0,178 bis eins und einer Proteinbeladung von 0,32 % bis 6,64 % generiert. Die Beladungseffizienz lag zwischen 7,22 % und 23,95 %. Es fällt auf, dass Probe vier Partikel über 5 µm enthält und einen PDI von eins hat. Bei einem PDI von eins sollte der ermittelte Wert der mittleren Partikelgröße kritisch betrachtet werden. Dieser beruht sehr wahrscheinlich darauf, dass die analytische Methode bei so großen Partikeln an ihre Grenzen stößt und daher die angegebene mittlere Partikelgröße eher als Näherungswert betrachtet werden muss. Da plausibel ist, dass bei den angewendeten Prozessparametern sehr große Partikel entstanden sind und es keinen Hinweis für Fehler während der Herstellung gab, wurden die Werte mit in die Auswertung des Designs genommen.

Tabelle 5-5: Parametereinstellungen und Ergebnisse der Zielgrößen des definitiven Screening Versuchsplans zur Untersuchung der Herstellungsmethode von OVA-beladenen PLGA-Nanopartikeln mittels Rotor-Stator-Homogenisator (Ultra Turrax®)

Probe	Parameter							Zielgröße			
	c (OVA) [%]	c (PLGA) [%]	v (W/O) [upm]	t (W/O) [s]	c (PVA) [%]	v (W/O/W) [upm]	t (W/O/W) [s]	Dz [nm]	PDI	LE [%]	PG [%]
1	2	3	9500	60	5	8000	150	558,8	0,366	11,52	2,98
2	4	9	9500	90	5	8000	105	1527,7	0,560	14,23	2,47
3	2	9	9500	30	5	13500	60	594,1	0,374	15,05	1,32
4	2	9	20500	90	2	8000	60	5565,0	1,000	22,68	1,98
5	4	9	20500	60	2	13500	60	2584,7	0,178	15,63	2,70
6	2	9	20500	30	3.5	8000	150	1850,7	0,597	22,17	1,93
7	4	6	20500	30	5	8000	60	1120,7	0,568	15,28	3,92
8	4	3	20500	90	2	8000	150	2402,7	0,378	13,35	6,64
9	4	9	9500	30	2	8000	150	3304,3	0,271	16,72	2,89
10	2	3	20500	90	5	13500	60	443,9	0,280	13,13	3,38
11	2	6	9500	90	2	13500	150	701,0	0,425	14,74	1,93
12	3	6	20500	60	3.5	13500	105	621,0	0,350	17,45	3,37
13	4	3	9500	90	3.5	13500	60	596,9	0,401	8,10	4,14
14	3	9	20500	90	5	13500	150	689,1	0,360	23,95	3,09
15	4	3	9500	30	5	13500	150	374,5	0,196	7,22	3,71
16	3	6	9500	60	3.5	8000	105	2129,7	0,583	11,55	2,26
17	2	3	20500	30	2	13500	105	510,7	0,331	15,24	3,90
18	3	3	9500	30	2	8000	60	1642,7	0,580	9,53	3,67

Der Screening-Versuchsplan wurde für jede Antwortvariable wie beschrieben analysiert und die wichtigsten Kennzahlen in Tabelle 5-6. zusammengefasst. Die Regressionsgleichungen für alle Antwortvariablen (Formel 5-2 bis Formel 5-5) wurden berechnet.

*Tabelle 5-6: P-Werte der Parameter für die jeweiligen Antwortvariablen und Modellzusammenfassung des definitiven Screening Versuchsplans zur Untersuchung der Herstellungsmethode von OVA-beladenen PLGA-Nanopartikeln mittels Rotor-Stator-Homogenisator (Ultra Turrax®) nach Rückwärtselimination;  $\alpha$  für Ausschluss = 0,1*

Parameter \ Antwort Variable	D <sub>z</sub>	PDI	LE	PG
c (OVA)	nicht signifikant	0,051	0,004	<0,001
c (PLGA)	0,014	nicht signifikant	<0,001	<0,001
v (W/O)	nicht signifikant	nicht signifikant	<0,001	<0,001
t (W/O)	nicht signifikant	nicht signifikant	nicht signifikant	nicht signifikant
c (PVA)	0,004	nicht signifikant	nicht signifikant	nicht signifikant
v (W/O/W)	0,009	0,001	nicht signifikant	nicht signifikant
t (W/O/W)	nicht signifikant	0,058	0,016	nicht signifikant
p-Wert des Modells	<0,001	0,004	<0,001	<0,001
S	794,2 nm	0,134	1,45 %	0,52 %
R <sup>2</sup> [%]	70,95	60,10	92,62	84,15
R <sup>2</sup> (prog) [%]	51,84	27,95	85,22	70,83

$$D_z = 2016 + 200,9 c (\text{PLGA}) - 488 c (\text{PVA}) - 573 v (\text{W/O/W}) \quad \text{Formel 5-2}$$

$$\text{PDI} = 0,839 - 0,0770 c (\text{OVA}) - 0,1284 v (\text{W/O/W}) - 0,001658 t (\text{W/O/W}) \quad \text{Formel 5-3}$$

$$\text{LE} = 9,68 - 1,373 c (\text{OVA}) + 1,133 c (\text{PLGA}) + 2,378 v (\text{W/O}) + 0,02384 t (\text{W/O/W}) \quad \text{Formel 5-4}$$

$$\text{PG} = 2,840 + 0,717 c (\text{OVA}) - 0,3105 c (\text{PLGA}) + 0,492 v (\text{W/O}) \quad \text{Formel 5-5}$$

Bei der Modellzusammenfassung für den PDI fällt auf, dass das prognostizierte R<sup>2</sup> sehr klein ist und deutlich kleiner als R<sup>2</sup>. Dies hat sich auch mit anderen Auswertungsoptionen nicht verbessert. Der PDI war fast ausschließlich von der Rührgeschwindigkeit der Doppelemulsion abhängig, wurde aber durch das Modell und daher auch durch die Regressionsgleichung nicht besonders gut beschrieben. In Abbildung 5-3 (B) kann man gut erkennen, dass bei höherer Rührgeschwindigkeit der PDI sank. Ich habe mich entschieden, dies für weitere Versuche zu berücksichtigen, aber nicht die Regressionsgleichung (Formel 5-3) für weitere Optimierungen zu nutzen.

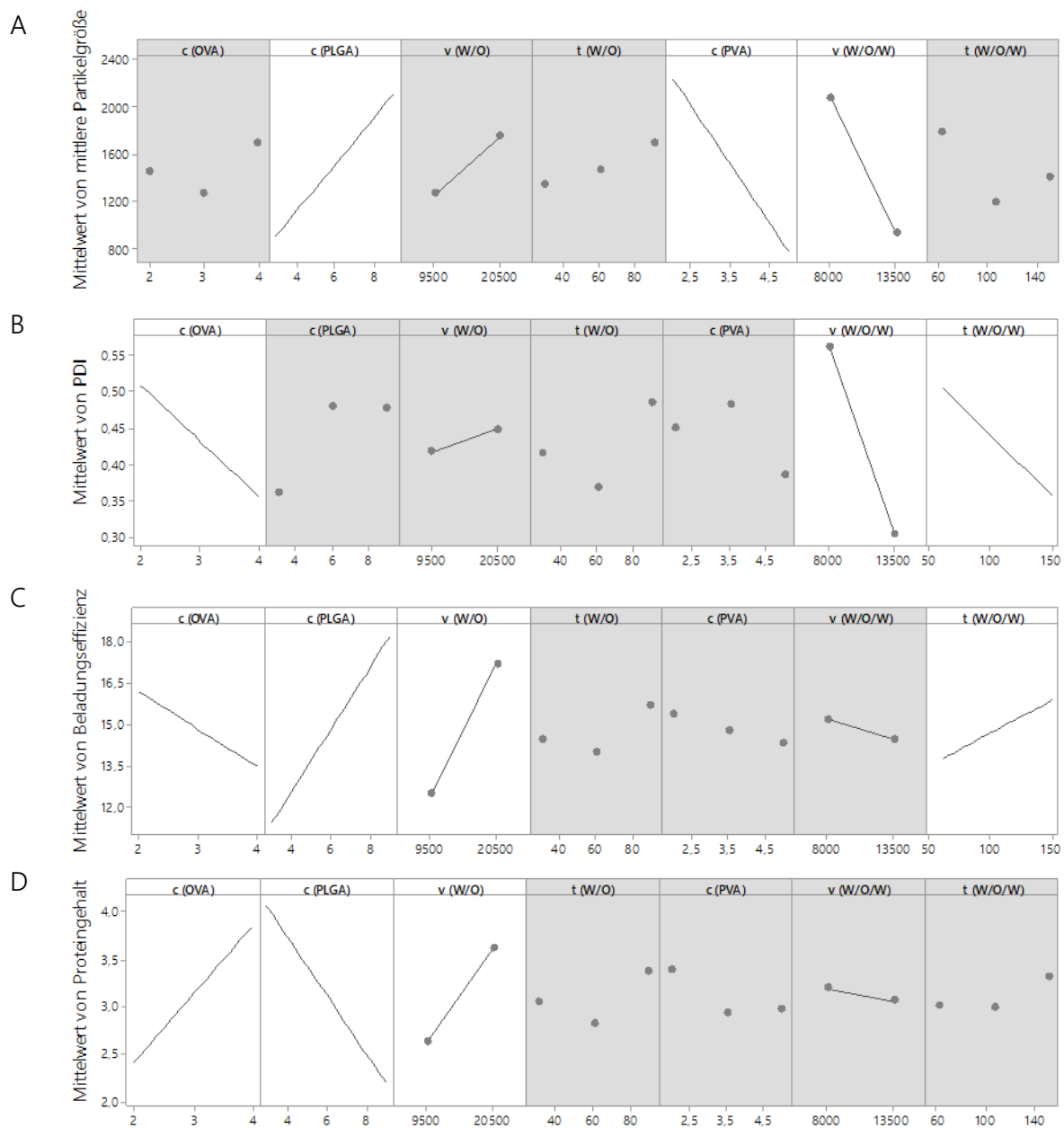


Abbildung 5-3: Haupteffektdiagramme für die mittlere Partikelgröße (A), PDI (B), Beladungseffizienz (C) und Proteingehalt (D) des definitiven Screening Versuchsplan zur Untersuchung der Herstellungsmethode von OVA-beladenen PLGA-Nanopartikeln mittels Rotor-Stator-Homogenisator (Ultra Turrax®); nicht im Modell enthaltene Terme sind grau hinterlegt

Die mittlere Partikelgröße ( $D_z$ ) war von der PLGA-Konzentration, der PVA-Konzentration und der Rührgeschwindigkeit des zweiten Homogenisierungsschritts abhängig. Je größer die PLGA-Konzentration war, desto größer wurden die Partikel. Die Stabilisatorkonzentration und die Rührgeschwindigkeit hatten den umgekehrten Effekt. Auffällig ist, dass die Homogenisierungsdauer der Doppemulsion keinen signifikanten Einfluss auf die Partikelgröße im untersuchten Bereich hatte.

Der Proteingehalt und die Beladungseffizienz waren von der OVA- und PLGA-Konzentration und der Rührgeschwindigkeit der inneren Emulsion abhängig. Während die Rührgeschwindigkeit einen positiven Effekt auf beide Antwortvariablen hatte, war der Einfluss von OVA-Gehalt und PLGA-Gehalt für die Antwortvariablen gegensätzlich. Wurde die OVA-Konzentration erhöht, war der Proteingehalt des Endproduktes auch höher, die Beladungseffizienz jedoch geringer. Wenn mehr PLGA eingesetzt wurde, wurde von dem eingesetzten OVA auch mehr in den Partikeln eingeschlossen. Da damit auch die Gesamtpolymermasse anstieg, erniedrigte sich der Proteingehalt.

Die Ergebnisse aus dem Screening-Versuchsplan sind plausibel und es konnten die signifikanten Parameter für die jeweilige Antwortvariable ermittelt werden. Um genaue Vorhersagen über die CQA treffen zu können und diese nach Wunsch einstellen zu können, sollte mit zwei bis vier Parametern ein Wirkungsflächen-Versuchsplan durchgeführt werden. Dafür sollten Parameter ausgewählt werden, die einen statistisch signifikanten Einfluss sowie einen großen Effekt auf die mittlere Partikelgröße, den PDI und den Proteingehalt haben und zusätzlich gut einstellbar sind.

Generell lässt sich sagen, dass die Rührdauer für beide Homogenisierungsschritte kaum einen Einfluss auf die CQA hatte. Es machte einen signifikanten Unterschied, ob die Rührgeschwindigkeit auf die höhere oder tiefere Stufe eingestellt wurde. Die Einstellung für die innere Emulsion hatte einen Einfluss auf den Proteingehalt und die Beladungseffizienz, während die Einstellung für die Doppelemulsion die mittlere Partikelgröße und den PDI beeinflusste. Da der verwendete Ultra-Turrax® nicht stufenlos einstellbar war, konnte man durch die Rührgeschwindigkeit nur den groben Partikelgrößenbereich beeinflussen, aber keine feineren Einstellungen an den CQA vornehmen.

### 5.1.4.3 Weitere Optimierung mittels Wirkungsflächenversuchsplan

Um Wirkungsflächen für alle CQA mit PVA- und PLGA-Konzentration als Faktoren zu generieren, wurde ein zentral zusammengesetzter Versuchsplan erstellt. Anhand dieser Wirkungsflächen können dann die CQA nach Wunsch definiert und die dazugehörigen Parametereinstellungen ermittelt werden. Alle Proben dieses Versuchsplans wurden mit einer OVA-Konzentration von 3,94 % hergestellt. Die innere wässrige und die organische Phase wurden mit 20500 upm für 68 s emulgiert und die Doppelemulsion wurde bei 13500 upm und 150 Sekunden Rührdauer hergestellt. Die gewählten Faktorstufen für die PVA- und PLGA-Konzentration können Tabelle 5-7

entnommen werden. Die Werte der mittleren Faktorstufen ergaben sich aus den optimierten Einstellungen des Screening Versuchsplans.

*Tabelle 5-7: Parametereinstellung des zentral zusammengesetzten Versuchsplans zur Untersuchung der Herstellungsmethode von OVA-beladenen PLGA-Nanopartikeln mittels Rotor-Stator-Homogenisator (Ultra Turrax®)*

Parameter	- $\alpha'$	Tief	Mittel	Hoch	+ $\alpha'$
c (PVA) [%]	2,17	3	5	7	7,83
c (PLGA) [%]	6,17	7	9	11	11,83

Die im Rahmen des Versuchsplans hergestellten Nanopartikelsuspensionen wurden analysiert und die Ergebnisse in Tabelle 5-8 zusammengefasst.

*Tabelle 5-8: Einstellungen und Ergebnisse des zentral zusammengesetzten Versuchsplans zur Untersuchung der Herstellungsmethode von OVA-beladenen PLGA-Nanopartikeln mittels Rotor-Stator-Homogenisator (Ultra Turrax®)*

Probe	Parameter		Zielgröße			
	c (PVA) [%]	c (PLGA) [%]	D <sub>z</sub> [nm]	PDI	LE [%]	PG [%]
1	5	9	714,0	0,232	20,32	3,49
2	5	11,83	1204,7	0,353	27,17	3,54
3	3	11	1807,0	0,293	23,08	3,25
4	5	9	650,2	0,286	22,48	3,84
5	5	9	707,3	0,295	18,58	3,20
6	7	7	446,6	0,192	19,64	4,30
7	7,83	9	503,4	0,180	22,71	3,88
8	2,17	9	1810,3	0,311	19,53	3,36
9	5	9	606,7	0,255	23,21	3,96
10	7	11	565,5	0,257	25,20	3,54
11	5	6,17	506,2	0,242	18,20	4,51
12	3	7	873,4	0,351	18,90	4,14
13	5	9	695,4	0,301	22,61	3,86

Es wurden PLGA-Partikel mit einer mittleren Partikelgröße von 446,6 nm bis 1810,3 nm, einem PDI von 0,180 bis 0,353 und einer Proteinbeladung von 3,20 % bis 4,51 % generiert. Die Beladungseffizienz lag zwischen 18,20 % und 27,17 %. Im Anschluss wurde der Versuchsplan für alle vier

Antwortvariablen analysiert und die wichtigsten Kennzahlen in Tabelle 5-9 zusammengefasst. Alle Modelle haben einen p-Wert kleiner  $<0,05$ ; die Antwortvariablen werden dementsprechend gut durch die Modelle dargestellt. Die Regressionsgleichungen für alle Antwortvariablen (Formel 5-6 bis Formel 5-9) wurden mittels Minitab® berechnet.

*Tabelle 5-9: P-Werte der linearen und quadratischen Terme und Wechselwirkungen für die jeweiligen Antwortvariablen sowie Modellzusammenfassung nach Rückwärtselimination;  $\alpha$  für Ausschluss = 0,1*

Parameter \ Antwort Variable	D <sub>z</sub>	PDI	LE	PG
c (PVA)	<0,001	0,002	0,096	0,093
c (PLGA)	<0,001	0,099	0,000	0,001
c (PVA) * c (PVA)	<0,001	nicht signifikant	nicht signifikant	nicht signifikant
c (PLGA) * c (PLGA)	<0,001	nicht signifikant	nicht signifikant	0,063
c (PVA) * c (PLGA)	0,021	0,081	nicht signifikant	nicht signifikant
p-Wert des Modells	<0,001	0,005	0,001	0,003
S	61,7 nm	0,032	1,41 %	0,22 %
R <sup>2</sup> [%]	98,98	73,89	77,78	77,51
R <sup>2</sup> (prog) [%]	94,50	38,61	68,64	67,33

$$D_z = 1121 - 312,3 c(\text{PVA}) + 69 c(\text{PLGA}) + 55,08 c(\text{PVA}) \cdot c(\text{PVA}) + 17,40 c(\text{PLGA}) \cdot c(\text{PLGA}) - 50,92 c(\text{PVA}) \cdot c(\text{PLGA})$$

Formel 5-6

$$PDI = 0,647 - 0,0933 c(\text{PVA}) - 0,0284 c(\text{PLGA}) + 0,00773 c(\text{PVA}) \cdot c(\text{PLGA})$$

Formel 5-7

$$LE = 6,76 + 0,459 c(\text{PVA}) + 1,401 c(\text{PLGA})$$

Formel 5-8

$$PG = 8,56 + 0,0739 c(\text{PVA}) - 0,986 c(\text{PLGA}) + 0,0443 c(\text{PLGA}) \cdot c(\text{PLGA})$$

Formel 5-9

Für die mittlere Partikelgröße waren alle linearen und quadratischen Terme signifikant, sowie die Wechselwirkung zwischen c(PVA) und c(PLGA). Das R<sup>2</sup> war mit 98,98 % sehr hoch und das fast ebenso hohe R<sup>2</sup>(prog) von 94,50 % deutete darauf hin, dass zukünftige mittlere Partikelgrößen sehr gut vorhergesagt werden. Im Haupteffektdiagramm (Abbildung 5-4 A) kann man gut erkennen, dass mit steigender PLGA-Konzentration auch die mittlere Partikelgröße steigt.

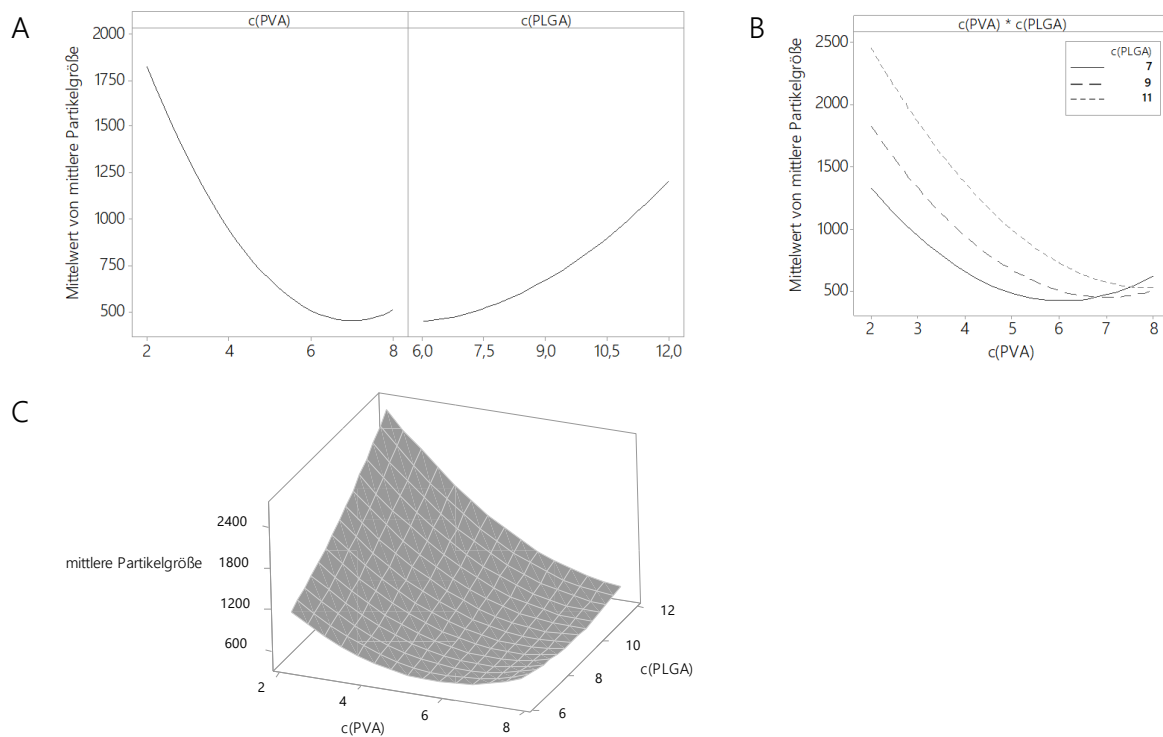


Abbildung 5-4: Einfluss der PLGA- und PVA-Konzentration auf die mittlere Partikelgröße, dargestellt als Haupteffekt- (A), Wechselwirkungs- (B) und Wirkungsfächendiagramm (C)

Mit steigenden PVA-Konzentrationen wurden die Partikel kleiner, was zwischen 6 % und 8 % stagnierte. In diesem Bereich war das System vermutlich mit Stabilisator gesättigt und höhere Stabilisatorkonzentrationen könnten keinen weiteren Effekt verursachen. Zwischen 7 % und 8 % stieg die Funktion wieder, was bedeutet, dass die Partikelgröße bei hohen Stabilisatorkonzentrationen wieder leicht anstieg. Im Wechselwirkungsdiagramm (Abbildung 5-4 B) kann man erkennen, dass der Einfluss der PVA-Konzentration früher stagnierte je geringer die PLGA-Konzentration war. Dies könnte dafürsprechen, dass bei geringeren PLGA-Konzentrationen die Oberflächen schneller abgesättigt sind. Im Wirkungsfächendiagramm (Abbildung 5-4 C) ist der kombinierte Einfluss der beiden Faktoren dreidimensional dargestellt. Die PLGA- und PVA-Konzentration sind auf der x- und y-Achse angezeigt und die mittlere Partikelgröße wird durch das dreidimensionale Gitter dargestellt. Bei geringer PVA- und hoher PLGA-Konzentration entstanden Partikel im Mikrometerbereich, während bei hoher PVA-Konzentration, die Partikel fast unabhängig von der PLGA-Konzentration um die 600 nm groß wurden.

Während der Einfluss der PLGA- und PVA-Konzentration auf den PDI durch den Screeningversuchsplan nicht als signifikant erkannt wurde, hatten beide Faktoren bei den gewählten Stufen

des Wirkungsflächenversuchsplans einen signifikanten Einfluss auf den PDI. Dies könnte an dem höher gewählten Abstand zwischen geringster und höchster Faktorstufe liegen oder an einem kleineren Rauschen, das durch das Konstanthalten der übrigen Variablen geringer geworden war. Im Wechselwirkungs- und Wirkungsflächendiagramm (Abbildung 5-5 B und C) sieht man, dass der PDI bei hohen PLGA-Konzentrationen fast unabhängig von der PVA-Konzentration bei ca. 0,3 lag. Ebenso war der PDI bei geringen Stabilisatorkonzentrationen konstant zwischen 0,3 und 0,4. Beides spricht dafür, dass in diesen Fällen das komplette PVA zur Stabilisierung der Emulsion genutzt wurde. Bei höher werdenden PVA- und geringer werdenden PLGA-Konzentrationen sank der PDI auf unter 0,15 stark ab. Dieser Effekt ist vor allem interessant, wenn er mit dem Effekt dieser beiden Faktoren auf die mittlere Partikelgröße verglichen wird (Abbildung 5-4 C), denn bei gleicher Änderung der Faktoren sank die mittlere Partikelgröße schneller ab, blieb dann aber konstant. Der Zusatz von PVA oder die Verringerung von PLGA führte dann zu einem geringeren PDI bei gleichbleibender Partikelgröße.

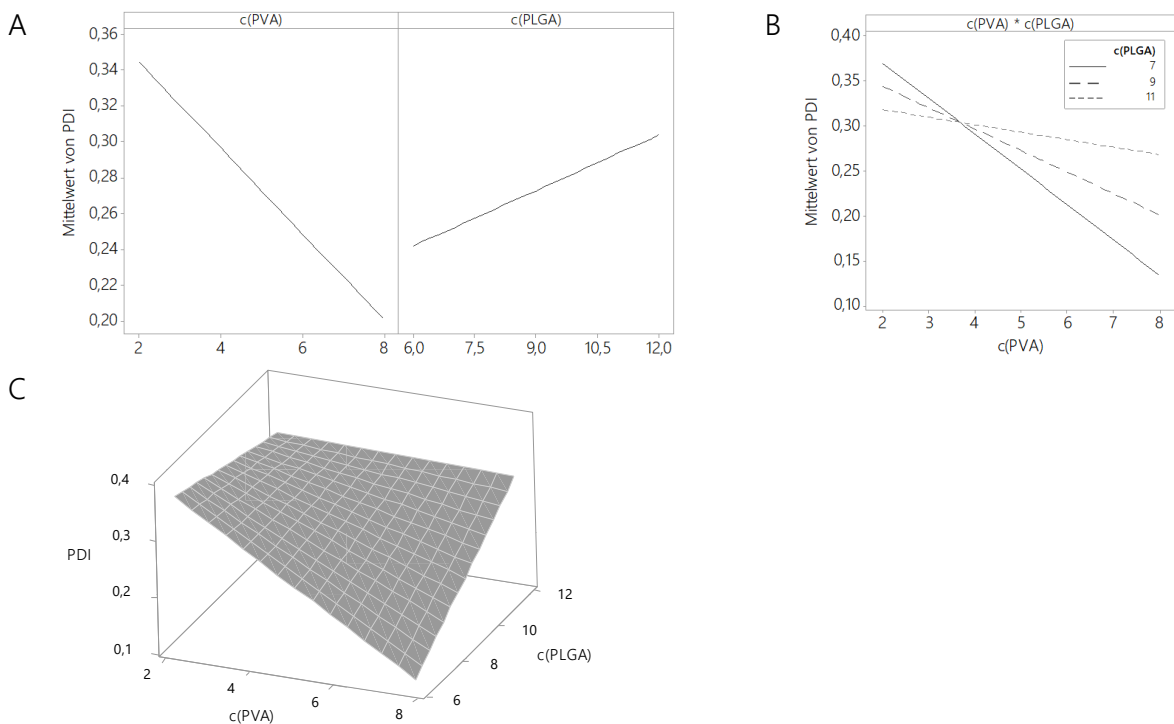


Abbildung 5-5: Einfluss der PLGA- und PVA-Konzentration auf den PDI, dargestellt als Haupteffekt- (A), Wechselwirkungs- (B) und Wirkungsflächendiagramm (C)

Wie bereits im Screening-Versuchsplan waren die Beladungseffizienz und der Proteingehalt überwiegend von der PLGA-Konzentration abhängig (Tabelle 5-9). Da keine Interaktionen zwischen den zwei Faktoren erkannt wurden, sind die Linien in den Wirkungsflächendiagrammen der

Beladungseffizienz parallel. Es gibt eine leichte Krümmung bei der Abhängigkeit des Proteingehalts von der PLGA-Konzentration (Abbildung 5-7). Bei hohen PLGA-Konzentrationen sank der Proteingehalt nicht weiter. Da mehr PLGA die Gesamtmasse der Nanopartikel erhöht, müsste die Proteinmasse im Vergleich zu Gesamtmasse (=Proteingehalt: Formel 4-4) sinken. Ein Abnehmen dieses Effektes bei besonders hohen PLGA-Konzentrationen erscheint daher erst einmal nicht plausibel und sollte mit Vorsicht betrachtet werden. Das Modell lieferte jedoch keinen Hinweis, diese Krümmung auszuschließen, weshalb sie weiterhin im Modell verblieb.

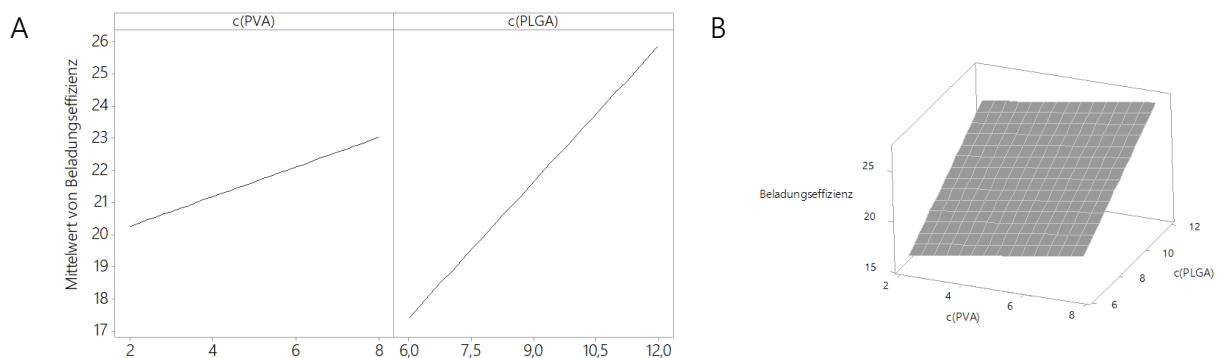


Abbildung 5-6: Einfluss der PLGA- und PVA-Konzentration auf die Beladungseffizienz, dargestellt als Haupteffekt- (A) und Wirkungsflächendiagramm (B)

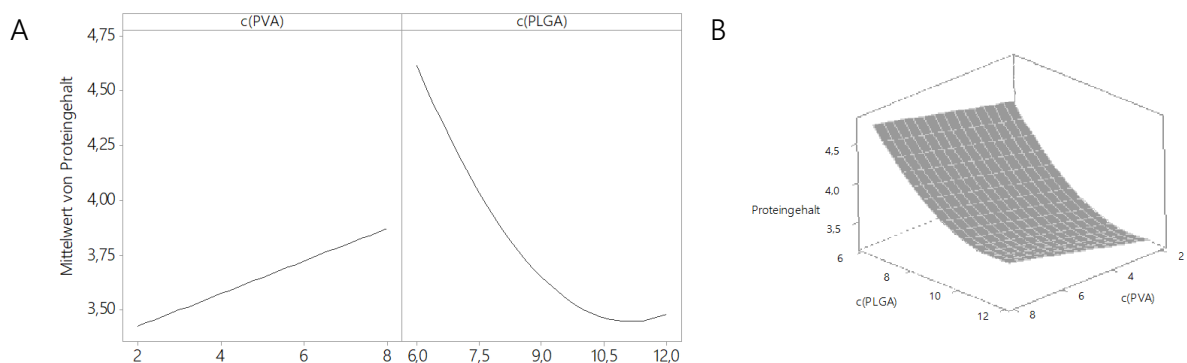


Abbildung 5-7: Einfluss der PLGA- und PVA-Konzentration auf den Proteingehalt, dargestellt als Haupteffekt- (A) und Wirkungsflächendiagramm (B)

#### 5.1.4.4 Herstellung und Charakterisierung der finalen Chargen

Die Ergebnisse des Wirkungsflächenversuchsplans bzw. der Versuchsraum definieren, welche Partikelgrößen und Proteingehalte produziert werden können.

Aufgrund dieser Ergebnisse hatte ich mich entschieden, folgende drei Produkte mittels Ultra-Turrax® herzustellen:

- UT(500;4,5) mit einer Zielpartikelgröße von 500 nm und einer Proteinbeladung von 4,5 %
- UT(700;4,5) mit einer Zielpartikelgröße von 700 nm und einer Proteinbeladung von 4,5 %
- UT(700;3,5) mit einer Zielpartikelgröße von 700 nm und einer Proteinbeladung von 3,5 %

Die Versuchspunkte UT(500;4,5) und UT(700;4,5) ergaben sich aus dem Qualitätszielproduktprofil der PLGA-Nanopartikel (Tabelle 5-1). Um die Prozessparameter für diese zwei Versuchspunkte zu berechnen, wurde die Zielgrößenoptimierung von Minitab® auf eine Partikelgröße von 500 nm bzw. 700 nm und einen Proteingehalt von 4,5 % eingestellt. Bei dem Versuchspunkt UT(700;3,5) handelt es sich um ein zusätzliches Produkt, bei dem nicht der Proteingehalt optimiert wurde, sondern die Größe auf 700 nm, die Beladungseffizienz auf maximal und der PDI auf minimal festgelegt wurde. Die entsprechenden Herstellungsparameter aller drei Versuchspunkte wurden in Tabelle 5-10 zusammengefasst.

*Tabelle 5-10: Zielgröße der mittleren Partikelgröße (D<sub>z</sub>) und des Proteingehalts (PG) sowie Herstellungsparameter der finalen Chargen, hergestellt mittels Rotor-Stator-Homogenisator (Ultra Turrax®)*

Versuchspunkt	Zielgröße		Parameter						
	D <sub>z</sub> [nm]	PG [%]	c (OVA) [%]	c (PLGA) [%]	v (W/O) [upm]	t (W/O) [s]	c (PVA) [%]	v (W/O) [upm]	t (W/O/W) [s]
UT(500;4,5)	500	4,5	3,94	6,69	20500	68	7,14	13500	150
UT(700;3,5)	700	3,5	3,94	11,7	20500	68	6,7	13500	150
UT(700;4,5)	700	4,5	3,94	6,17	20500	68	3,44	13500	150

Im Anschluss wurde jeder Versuchspunkt dreimal hergestellt und jede Charge analysiert. Die Ergebnisse der Versuchspunkte wurden als Mittelwerte und Standardabweichungen der drei Chargen in Abbildung 5-8 dargestellt. Zusätzlich wurden der berechnete Erwartungswert und das 95 %-Konfidenzintervall eingezeichnet.

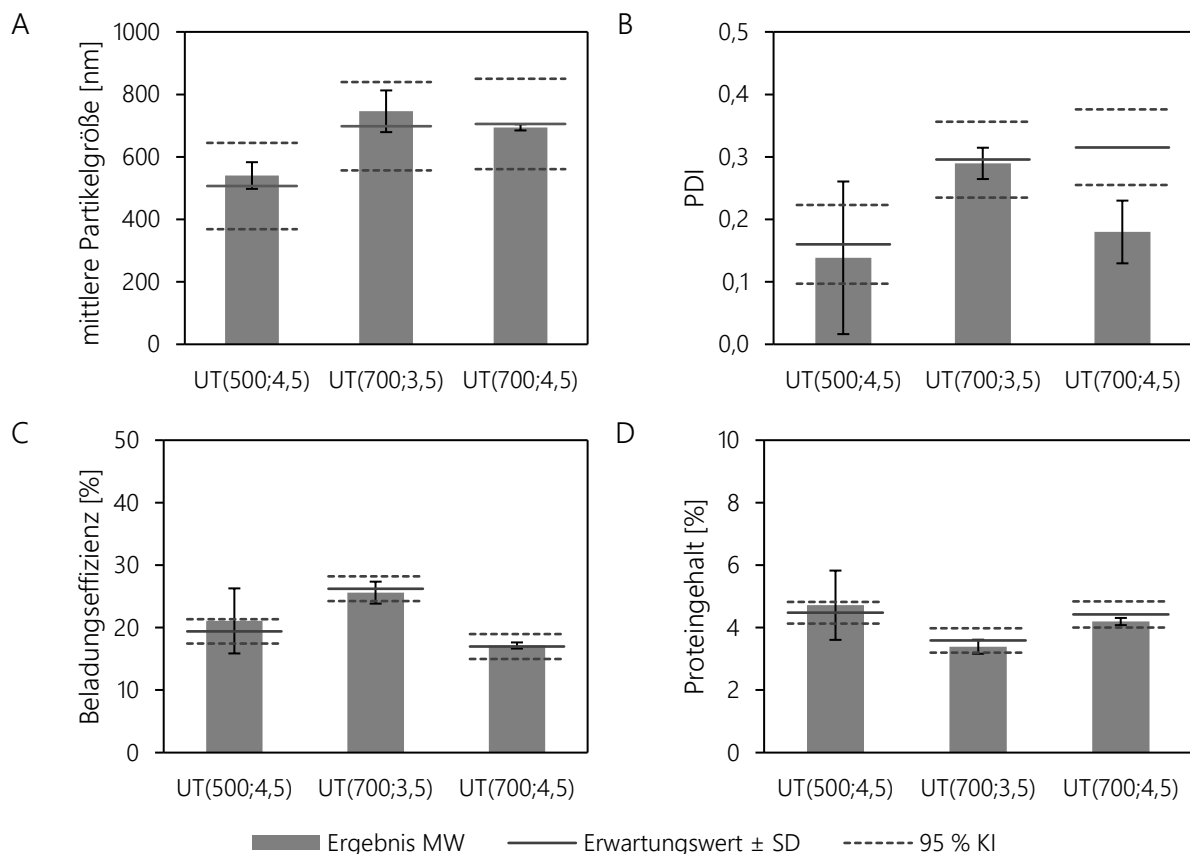


Abbildung 5-8: Erwartungswert inklusive 95 %-Konfidenzintervall sowie Mittelwert der tatsächlichen Chargen für die mittlere Partikelgröße (A), PDI (B), Beladungseffizienz (C) und Proteingehalt (D) der finalen Versuchspunkte, hergestellt mittels Ultra-Turrax®,  $n = 3$ , Fehlerbalken = SD

Die Mittelwerte der mittleren Partikelgröße und des Proteingehalts der Chargen UT(500;4,5), UT(700;4,5) und UT(700;3,5) lagen innerhalb des 95 %-KI. Beim PDI waren die Mittelwerte jeweils kleiner als der Erwartungswert und lagen alle unter 0,3, wodurch sie den Anforderungen an das Zielprodukt gerecht wurden. Die Chargen des Versuchspunktes UT(500;4,5) hatten zusätzlich eine hohe Standardabweichung. Der mittlere PDI des Versuchspunktes UT(700;4,5) lag deutlich außerhalb des 95 %-KI. Wie durch ein  $R^2(\text{prog})$  von 38,61 % zu erwarten war, war die Vorhersage des PDI durch das berechnete Modell kaum möglich. Insgesamt kann festgestellt werden, dass eine gezielte Herstellung der Partikel mit den gewünschten Eigenschaften weitestgehend möglich war.

### 5.1.5 Herstellung mittels Ultraschallhomogenisator

Nachdem die erste Herstellungsvariante, bei der der Ultra Turrax® zum Homogenisieren eingesetzt wurde, zur Herstellung größerer Nanopartikel mit mittleren Partikelgrößen ab 500 nm und Proteingehalten bis knapp 5 % geeignet war, soll nun eine zweite Variante genutzt werden, um kleinere Partikel bzw. Partikel mit höheren Beladungen zu generieren.

Der Ultraschallhomogenisator bietet im Vergleich zu dem verwendeten Ultra-Turrax® zwei große Vorteile. Zum einen ist die Amplitude im Gegensatz zur Rührgeschwindigkeit des Ultra-Turraxes® stufenlos verstellbar und zum anderen ist die Sonotrode des Homogenisators leichter und schneller zu reinigen, was das Risiko für Verschleppungen von Wirkstoff und Hilfsstoffen reduziert.

#### 5.1.5.1 Identifikation und Evaluation der Prozessparameter

Wie bereits bei der Herstellung mittels Ultra-Turrax® soll für die zweite Prozessvariante zuerst identifiziert werden, welche Variablen möglicherweise das Produkt beeinflussen.

Dazu soll anhand eines Ursachen-Wirkungs-Diagramms und durch Beobachtung der Vorversuche eine möglichst vollständige Sammlung der Prozessvariablen entstehen. Da nur das Homogenisierungsequipment ausgetauscht wurde, können bei dem bereits bestehenden Ishikawa-Diagramm (Abbildung 5-2) die Prozessvariablen der W/O- und W/O/W-Emulsionen angepasst werden. Die daraus resultierende Ursachen-Wirkungs-Beziehung ist in Abbildung 5-9 dargestellt.

Im Anschluss wurde evaluiert, ob bei der Homogenisierung mittels Ultraschalles die Amplitude (A) und die Beschallungsdauer (t) in die praktischen Versuche aufgenommen werden sollen. Dafür wurde beurteilt, ob sie potenziell geeignet sind, um die CQA zu steuern. Um geeignet zu sein, sollten die Variablen potenziell einen großen Einfluss auf die CQA haben. Zusätzlich sollten sie reproduzierbar und stufenlos ohne großen Aufwand einstellbar sein, was sowohl auf die Amplitude als auch auf die Beschallungsdauer zutrifft, weshalb beide Variablen in die praktischen Versuche einbezogen wurden.

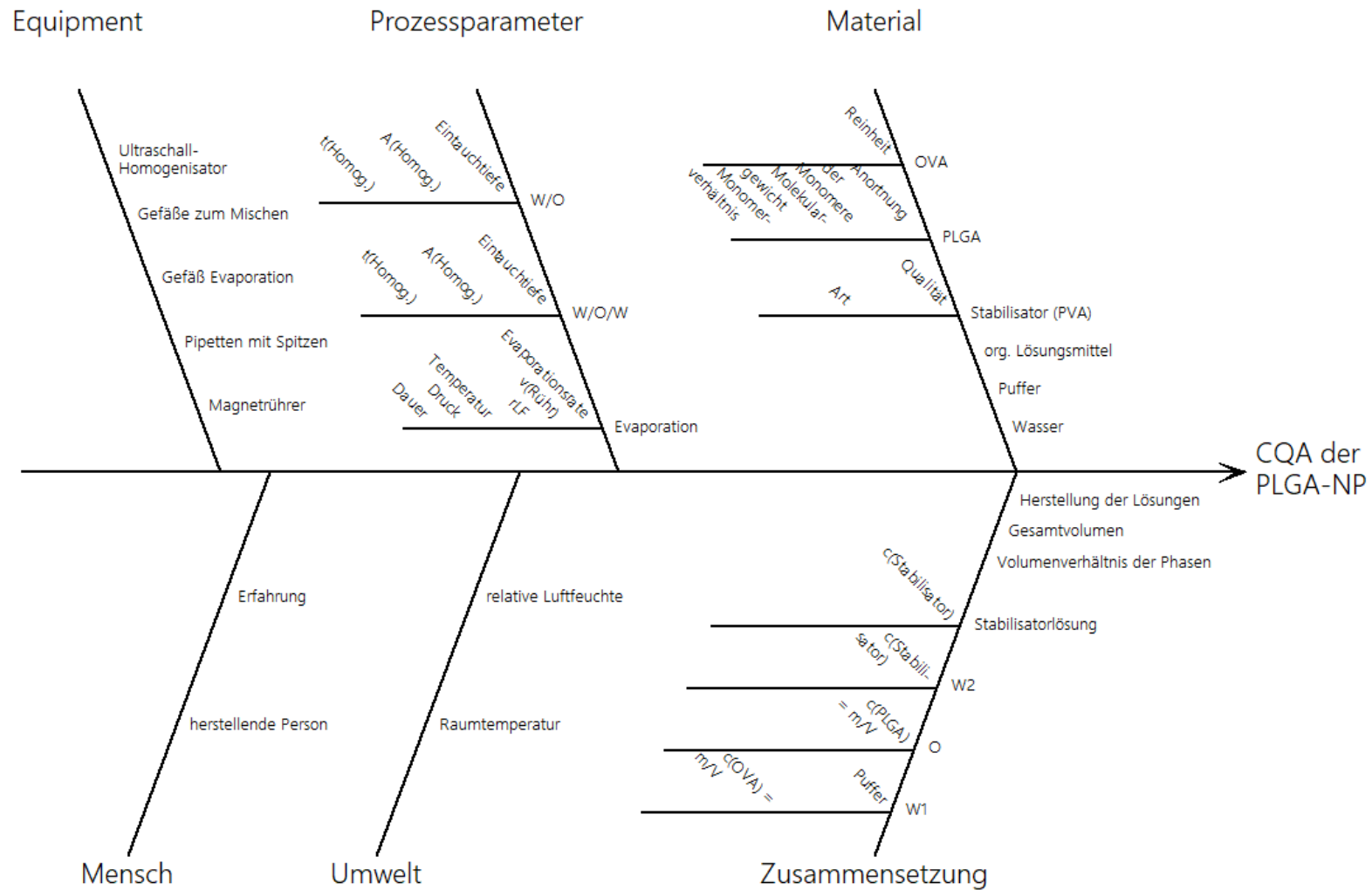


Abbildung 5-9: Ishikawa (Fischgräten)-Diagramm zum Sammeln der potenziellen Einflussfaktoren (Ursachen) für die CQA (Wirkung)

### 5.1.5.2 Identifikation der signifikanten Prozessparameter mittels definitivem Screening Versuchsplan

Wie bereits bei der Optimierung der Ultra-Turrax®-Herstellungsmethode wurden die ausgewählten Parameter mittels Screening Versuchsplan untersucht, um die Parameter zu identifizieren, die den größten Einfluss haben. Durch die Vorversuche konnte bereits erkannt werden, dass die Homogenisierung mittels Ultraschall zu kleineren Partikeln führte. Da sich die Amplitude stufenlos verstellen lässt, konnte sie als quantitativer Faktor untersucht werden. Die Faktorstufen wurden so gewählt, dass sie einen weiten Bereich abdecken, aber nicht zu sehr von den Vorversuchen abweichen (Tabelle 5-11).

*Tabelle 5-11: Parametereinstellung des definitiven Screening Versuchsplan zur Untersuchung der Herstellungsmethode von OVA-beladenen PLGA-Nanopartikeln mittels Ultraschallhomogenisator*

Parameter	Tief	Mittel	Hoch
c (OVA) [%]	2	4	6
c (PLGA) [%]	2	4	6
Amplitude (W/O) [%]	15	25	35
Homogenisierungsdauer (W/O) [s]	20	40	60
c (PVA) [%]	1	3	5
Amplitude (W/O/W) [%]	15	25	35
Homogenisierungsdauer (W/O/W) [s]	20	40	60

Die Nanopartikel wurden nach vorgegebener Reihenfolge hergestellt und analysiert (Tabelle 5-12). Insgesamt sind sehr kleine Partikel in einem Größenbereich von 153,3 nm bis 319,2 nm entstanden. Alle hergestellten Produkte wiesen mit einem PDI von unter 0,3 (0,104 bis 0,283) eine enge Partikelgrößenverteilung auf. Der Proteingehalt variierte von 6,99 % bis 35,34 %. Die Beladung der Nanopartikel mit Ovalbumin war mit einer Beladungseffizienz von 36,39 % bis 70,23 % hoch im Vergleich zur Herstellung mittels Ultra-Turrax® und deutlich höher als das Ziel von 50 %. Beim Betrachten der Einzelwerte war keiner auffällig, so dass das Modell ausgewertet werden konnte.

Tabelle 5-12: Parametereinstellungen und Ergebnisse der Zielgrößen des definitiven Screening Versuchsplans zur Untersuchung der Herstellungsmethode von OVA-beladenen PLGA-Nanopartikeln mittels Ultraschallhomogenisator

Probe	Parameter							Zielgröße			
	c (OVA) [%]	c (PLGA) [%]	A (W/O) [%]	t (W/O) [s]	c (PVA) [%]	A (W/O/W) [%]	t (W/O/W) [s]	D <sub>z</sub> [nm]	PDI	LE [%]	PG [%]
1	2	4	35	20	1	35	60	153,3	0,108	70,23	12,32
2	2	2	35	60	5	25	20	295,0	0,167	67,12	21,17
3	6	6	15	20	1	25	60	176,8	0,110	43,21	14,74
4	6	6	35	60	1	15	40	217,6	0,143	58,77	19,03
5	4	2	15	20	1	15	20	263,2	0,283	36,39	22,55
6	2	6	15	60	1	35	20	310,1	0,22	67,62	8,27
7	6	2	15	60	3	35	60	175,3	0,159	40,65	32,78
8	4	6	35	60	5	35	60	193,5	0,104	69,06	15,55
9	2	2	15	20	5	35	40	155,2	0,136	48,88	16,35
10	2	6	35	20	3	15	20	285,5	0,25	65,05	7,98
11	2	2	25	60	1	15	60	173,5	0,123	53,82	17,71
12	6	6	25	20	5	35	20	243,2	0,179	49,63	16,56
13	4	4	25	40	3	25	40	189,2	0,152	62,57	20,02
14	6	4	15	60	5	15	20	319,2	0,276	50,93	23,40
15	2	6	15	40	5	15	60	179,2	0,120	56,35	6,99
16	6	2	35	20	5	15	60	192,8	0,146	37,45	31,00
17	6	2	35	40	1	35	20	237,1	0,242	45,55	35,34

Jede Antwortvariable des Versuchsplans wurde analysiert und die wichtigsten Kennzahlen in Tabelle 5-13 zusammengefasst. Die Regressionsgleichungen für alle Antwortvariablen wurden berechnet (Formel 5-10 bis Formel 5-13).

*Tabelle 5-13: P-Werte der Parameter für die jeweiligen Antwortvariablen und Modellzusammenfassung des definitiven Screening Versuchsplans zur Untersuchung der Herstellungsmethode von OVA-beladenen PLGA-Nanopartikeln mittels Ultraschallhomogenisator nach Rückwärtselimination;  $\alpha$  für Ausschluss = 0,1*

Antwort Variable \ Parameter	D <sub>z</sub>	PDI	LE	PG
c (OVA)	nicht signifikant	nicht signifikant	<0,001	<0,001
c (PLGA)	nicht signifikant	nicht signifikant	<0,001	<0,001
A (W/O)	nicht signifikant	nicht signifikant	0,001	0,021
t (W/O)	0,051	nicht signifikant	0,005	0,027
c (PVA)	nicht signifikant	nicht signifikant	nicht signifikant	nicht signifikant
A (W/O/W)	nicht signifikant	nicht signifikant	0,070	nicht signifikant
t (W/O/W)	<0,001	<0,001	nicht signifikant	nicht signifikant
p-Wert des Modells	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
S	26,9 nm	0,034	4,38 %	1,75 %
R <sup>2</sup> [%]	79,48	69,26	89,82	96,70
R <sup>2</sup> (prog) [%]	70,83	60,19	79,88	93,32

$$D_z = 291,8 + 0,765 t(W/O) - 2,532 t(W/O/W) \quad \text{Formel 5-10}$$

$$PDI = 0,2784 - 0,002668 t(W/O/W) \quad \text{Formel 5-11}$$

$$LE = 31,22 - 3,675 c(OVA) + 2,851 c(PLGA) + 0,494 A(W/O) + 0,2040 t(W/O) + 0,235 A(W/O/W) \quad \text{Formel 5-12}$$

$$PG = 14,31 + 2,931 c(OVA) - 3,135 c(PLGA) + 0,1236 A(W/O) + 0,0586 t(W/O) \quad \text{Formel 5-13}$$

Alle Modelle hatten einen p-Wert kleiner 0,05, woraus geschlossen werden konnte, dass jedes Modell die Streuungen der jeweiligen Antwortvariablen erklärte. Zudem war kein R<sup>2</sup>(prog) um mehr als 20 Prozentpunkte kleiner als das entsprechende R<sup>2</sup>. Dies zeigt an, dass die Modelle nicht überangepasst waren. Die Haupteffektdiagramme für alle Effekte sind in Abbildung 5-10 dargestellt.

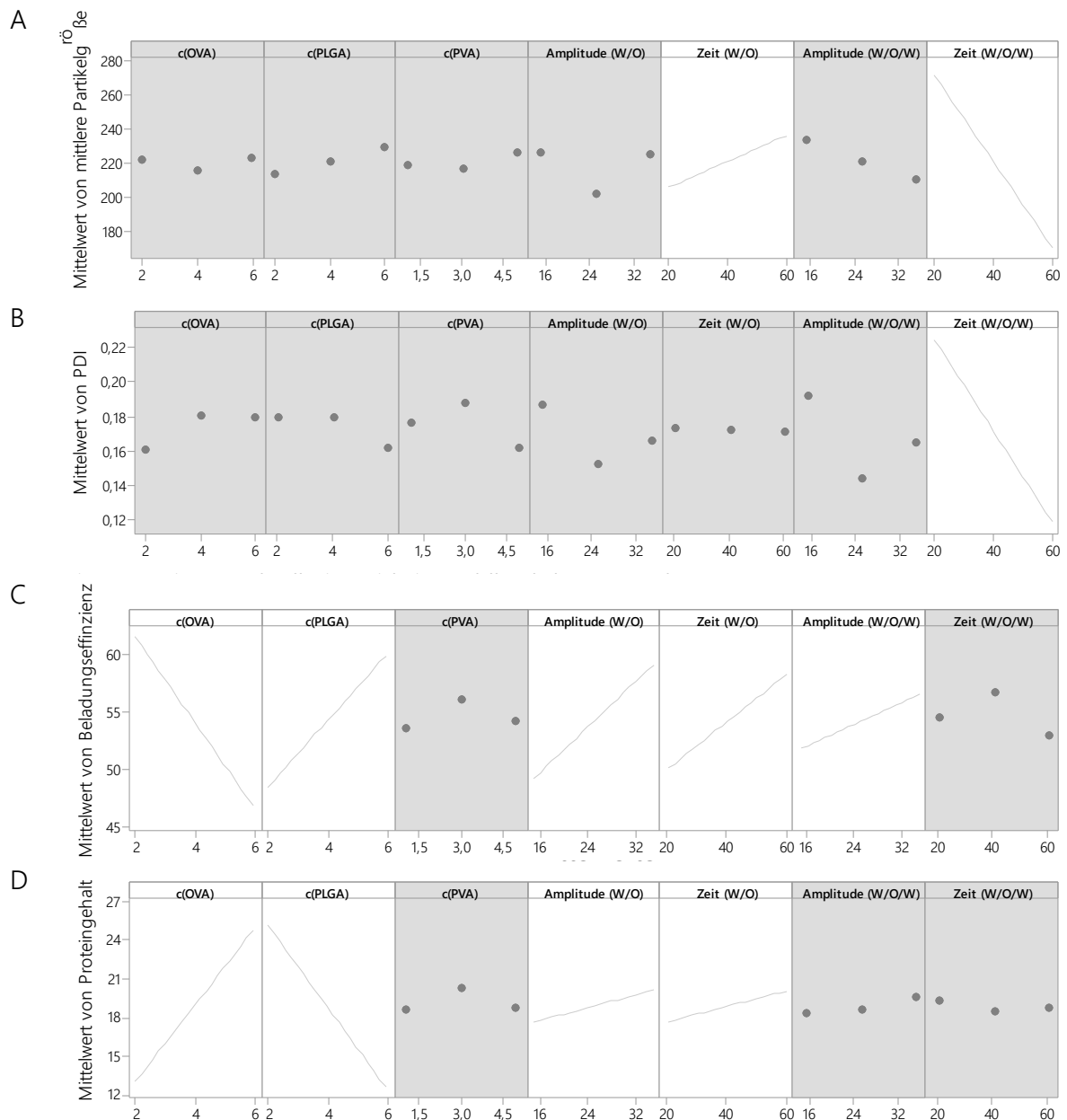


Abbildung 5-10: Haupteffektdiagramme für die mittlere Partikelgröße (A), PDI (B), Beladungseffizienz (C) und Proteingehalt (D) des definitiven Screening Versuchsplan zur Untersuchung der Herstellungsmethode von OVA-beladenen PLGA-Nanopartikeln mittels Ultraschallhomogenisator; nicht im Modell enthaltene Terme sind grau hinterlegt

Die mittlere Partikelgröße ( $D_z$ ) war zum größten Teil von der Homogenisierungsdauer der Doppemulsion abhängig. Je länger homogenisiert wurde, desto kleiner wurden die Partikel (Abbildung 5-10 A). Dieser Effekt lässt sich durch die bei der Homogenisierung eingetragene Energie erklären. Diese kumuliert über den Zeitraum der Homogenisierung. Dadurch wird bei längerer Homogenisierung mehr Energie ins System eingebracht. Dabei handelt es sich teilweise um thermische Energie, aber auch um mechanische Energie, die durch Kavitation und Scherkräfte zur Zerkleinerung der Emulsionströpfchen beiträgt. Bei längerer Homogenisierungsdauer werden die größeren Tröpfchen häufiger aufgebrochen und es entstehen kleinere Tröpfchen, aus denen nach der Lösungsmittelverdunstung wiederum kleinere Partikel entstehen.

Die Amplitude während der Doppemulsion hat keinen signifikanten Effekt auf die Partikelgröße. Es ist jedoch ein leichter Trend zu erkennen, dass bei höherer Amplitude kleine Partikel entstehen. Eine höhere Amplitude führt zu einer intensiveren Kavitation im Medium und damit zu größeren Kavitationsbläschen. Kollabieren diese, erzeugt dies größere Scherkräfte, was wiederum zu kleineren Tröpfchen führt [112]. Da dieser Effekt nicht signifikant ist, deutet auf einen schwachen Einfluss hin.

Wurde die W/O-Emulsion längere Zeit homogenisiert, zeigte sich eine Zunahme der Partikelgröße. Eine mögliche Erklärung dafür könnte eine zunehmende Viskosität der W/O-Emulsion sein, die evtl. bei längerer Homogenisierungsdauer entsteht. Je viskoser die W/O-Emulsion ist, desto mehr Energie müsste aufgewendet werden, um aus der inneren Emulsion wieder einzelne Tröpfchen zu generieren.

Der PDI war bei diesem Modell ausschließlich von der Homogenisierungsdauer der Doppemulsion abhängig. Beim Betrachten der Einzelwerte des PDI und der mittleren Partikelgröße könnte der Eindruck entstehen, dass der PDI viel mehr mit der mittleren Partikelgröße korreliert als mit den Prozessparametern. Um dies besser erfassen zu können, wurde der PDI gegen die Partikelgröße aufgetragen (Abbildung 5-11). Das daraus resultierende  $R^2$  von 0,65 deutet eine gewisse Korrelation zwischen Partikelgröße und PDI an, es werden jedoch mehr Datenpunkte für eine eindeutigere Aussage benötigt.

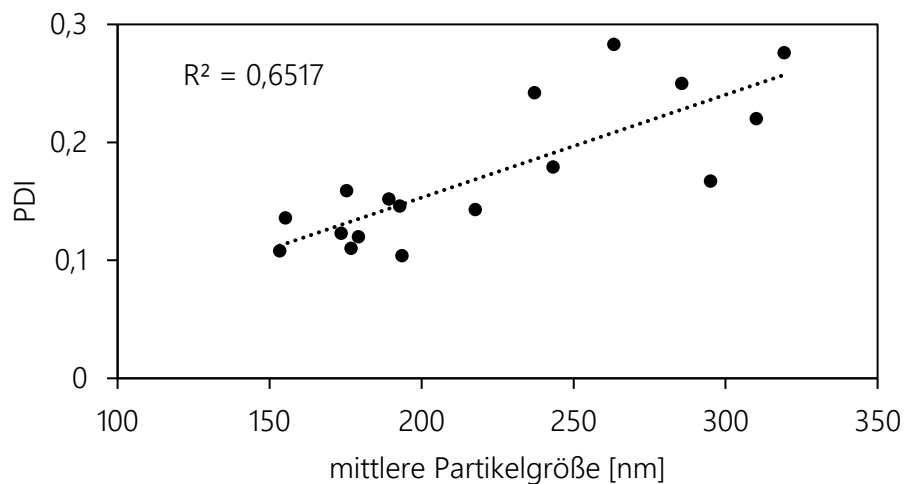


Abbildung 5-11: PDI in Abhängigkeit von der Partikelgröße, Daten aus Herstellung der PLGA-Nanopartikel mittels Doppemulsions-Lösungsmittelveraporationsmethode hergestellt mit Ultraschallhomogenisator (Absatz 5.1.5.2)

Der Proteingehalt und die Beladungseffizienz waren signifikant von vier Parametern der inneren Phase, der OVA- und PLGA-Konzentration, der Amplitude und der Homogenisierungsdauer, abhängig. Beide Zielgrößen werden sehr gut durch das Modell dargestellt und zukünftige Beladungseffizienzen und Proteingehalte können sehr gut vorhergesagt werden. Eine Erhöhung der Ovalbuminkonzentration führte zu einem höheren absoluten Ovalbumingehalt im Produkt. Gleichzeitig sank jedoch der Anteil des verkapselten Proteins, was zu einer reduzierten Beladungseffizienz führte. Der Proteingehalt sinkt bei Einsatz von größeren PLGA Mengen, da er in Relation zur PLGA-Masse steht. Die Beladungseffizienz hingegen stieg vermutlich an, da mehr Polymermaterial zur Verfügung stand, um die innere Phase effizient zu umschließen. Dadurch könnten stabilere Kapselhüllen entstanden sein, die ein Austreten des Proteins während des Prozesses verringerten.

Zudem fällt beim ersten Betrachten der Modellzusammenfassung auf, dass die PVA-Konzentration keinen signifikanten Einfluss auf eine der Antwortvariablen, insbesondere der Partikelgröße, hatte. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass bereits bei der geringsten gewählten Konzentration eine ausreichende Stabilisierung der Tröpfchen erreicht wurde und höhere PVA-Konzentrationen keinen weiteren stabilisierenden Effekt mehr hatten. Möglicherweise wurden aber auch die Effekte der Stabilisatorkonzentration von anderen Effekten oder dem Rauschen überlagert. Bei der Ultra-Turrax-Methode hatte die Stabilisator-Konzentration einen signifikanten

Einfluss auf die mittlere Partikelgröße und konnte daher genutzt werden, um die Antwortvariable zu steuern. Dies ist bei einer Herstellung mittels Ultraschall innerhalb der gewählten Faktorstufen nicht möglich.

Analog zur Optimierung der Ultra-Turrax®-Methode soll im nächsten Schritt ein Wirkungsflächenversuchsplan durchgeführt werden, um eine Feinjustierung der Zielgrößen zu ermöglichen. Dafür soll mit den Parametern weitergearbeitet werden, die den größten Einfluss auf die Zielgrößen haben. Zudem wurde bei der Auswahl darauf geachtet, dass sich mittlere Partikelgröße und Proteingehalt möglichst unabhängig voneinander einstellen lassen. Um den Proteingehalt zu steuern, ohne die mittlere Partikelgröße zu beeinflussen, können jeweils die OVA- und PLGA-Konzentration variiert werden. Für die Einstellung der mittleren Partikelgröße wurde die Homogenisierungsdauer der Doppelemulsion gewählt, die im Screening Design keinen signifikanten Einfluss auf den Proteingehalt zeigte.

### 5.1.5.3 Überprüfung des Modells des Screening-Versuchsplans

Bevor im nächsten Schritt der Prozess mittels Wirkungsflächenversuchsplan weiter untersucht und optimiert wird, ist es sinnvoll, die Ergebnisse des Screening-Versuchsplans durch drei Chargen eines Versuchspunktes zu überprüfen. Dieser Schritt hilft dabei, die Faktorstufen und die Variablen, die nicht variiert werden, festzulegen. Dafür wurde die Zielgrößenoptimierung von Minitab® (Abbildung 5-12) genutzt, aus der sich eine OVA- und PLGA-Konzentration von jeweils 4 % ergeben. Die Amplitude soll für beide Homogenisierungsschritte auf 25 % eingestellt werden, mit einer Homogenisierungsdauer von 40 s für die erste Emulgierung und 50 s für die zweite. Die PVA-Konzentration wurde analog zu den Vorversuchen auf 5 % festgelegt.

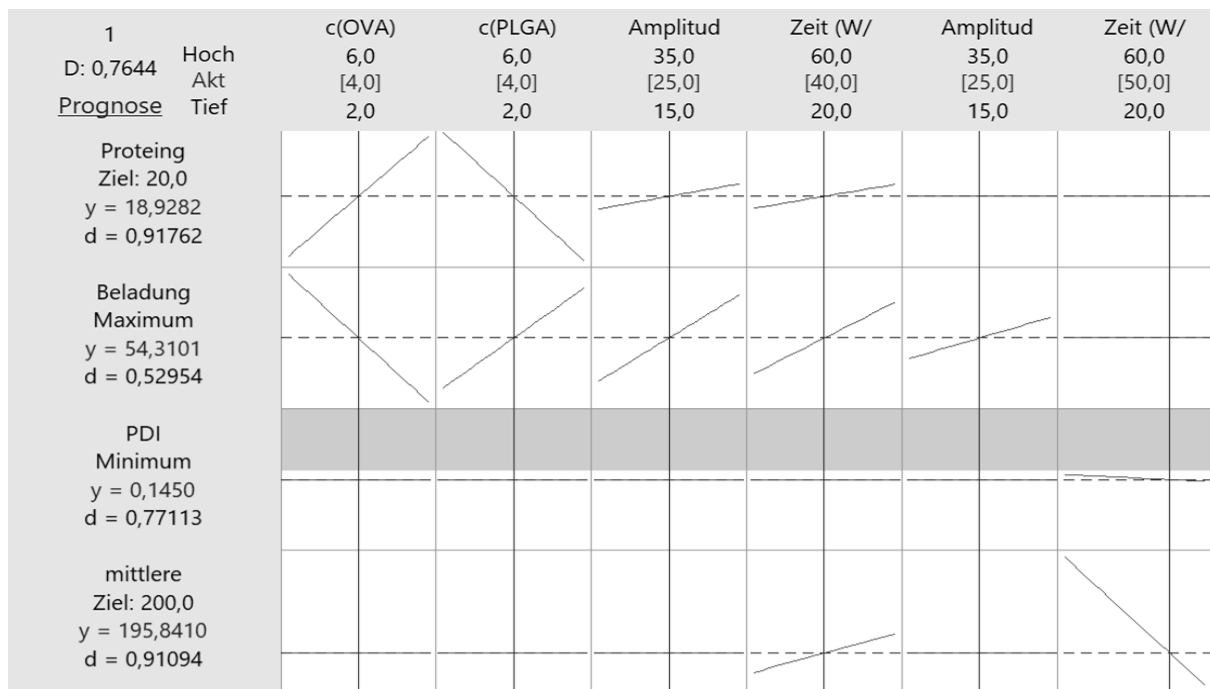


Abbildung 5-12: Zielgrößenoptimierung von Minitab® fürs Überprüfen des Screening-Versuchsplans bei der Herstellung mittels Ultraschalles

In Tabelle 5-14 sind die Erwartungswerte mit Konfidenzintervallen dargestellt sowie die Ergebnisse der Herstellung mit den genannten Einstellungen. Die Ergebnisse der Partikelgröße und des Proteingehalts wichen nur minimal vom Erwartungswert ab und lagen innerhalb des 95 %-Konfidenzintervalls. Der PDI war etwas geringer als vorhergesagt und die LE war etwas höher.

Tabelle 5-14: Prognose und Konfidenzintervall (KI) für eingestellte Parameter aus dem definitiven Screening und Ergebnisse als Mittelwert (MW) mit Standardabweichung (SD) der Herstellung,  $n = 3$

Antwort Variable	Erwartungswert	95 %-KI	Ergebnis (MW $\pm$ SD)
mittlere Partikelgröße [nm]	195,8	179,8 ; 211,9	193,0 $\pm$ 11,1
PDI	0,145	0,125 ; 0,165	0,113 $\pm$ 0,016
Beladungseffizienz [%]	54,31	51,97 ; 56,65	57,18 $\pm$ 4,49
Proteingehalt [%]	18,93	18,00 ; 19,86	18,60 $\pm$ 1,18

#### 5.1.5.4 Weitere Optimierung mittels Wirkungsflächenversuchsplan

Mittels zentral zusammengesetzten Versuchsplan sollen Wirkungsflächen für alle Zielgrößen erstellt werden. Da zwei Faktoren Einfluss auf den Proteingehalt und ein Faktor Einfluss auf die mittlere Partikelgröße haben, besteht die Möglichkeit, dass beide Zielgrößen unabhängig voneinander einstellbar sind. Zusätzlich soll für die Partikelgröße und den Proteingehalt ein weiter Bereich abgedeckt werden. Daher wurden die Faktorstufen mit einem großen Abstand gewählt, aber nicht so stark variiert, dass das Funktionieren der Methode gefährdet ist. Die OVA- und PLGA-Konzentration wurden zwischen 1 % und 7 % variiert (Tabelle 5-15). Es wurde eine maximale Homogenisierungsdauer von 70 s gewählt und eine minimale von 10 s, da bei kürzerer Homogenisierungsdauer keine ausreichende Durchmischung stattfand. Alle konstanten Prozessparameter wurden analog zu Abschnitt 5.1.5.4 gewählt.

*Tabelle 5-15: Parametereinstellung des zentral zusammengesetzten Versuchsplans zur Untersuchung der Herstellungsmethode von OVA-beladenen PLGA-Nanopartikeln mittels Ultraschallhomogenisator*

Parameter	- $\alpha'$	Tief	Mittel	Hoch	+ $\alpha'$
c (OVA) [%]	1	2	4	6	7
c (PLGA) [%]	1	2	4	6	7
t (W/O/W) [s]	10	20	40	60	70

Die Nanopartikelsuspensionen wurden nach Plan hergestellt, analysiert und die Ergebnisse in Tabelle 5-16 zusammengefasst. Es wurden PLGA-Partikel mit einer mittleren Partikelgröße von 201,3 nm bis 423,5 nm generiert (Tabelle 5-16).

Tabelle 5-16: Einstellungen und Ergebnisse des zentral-zusammengesetzten Versuchsplans zur Untersuchung der Herstellungsmethode von OVA-beladenen PLGA-Nanopartikeln mittels Ultraschallhomogenisator

Probe	Parameter			Zielgröße			
	c (OVA) [%]	c (PLGA) [%]	t (W/O/W) [s]	D <sub>z</sub> [nm]	PDI	LE [%]	PG [%]
1	2	2	20	268,7	0,186	65,28	20,71
2	4	4	10	423,5	0,327	63,53	20,26
3	4	4	70	217,4	0,117	54,51	17,90
4	1	4	40	218,4	0,092	55,11	5,22
5	4	4	40	245,0	0,143	55,90	18,27
6	4	4	40	241,7	0,128	55,32	18,12
7	4	4	40	248,4	0,124	57,88	18,80
8	6	2	60	259,5	0,227	47,30	36,21
9	6	6	60	241,5	0,134	57,84	18,79
10	6	6	20	318,2	0,176	60,79	19,56
11	4	4	40	241,7	0,144	58,43	18,94
12	6	2	20	331,1	0,267	50,74	37,84
13	2	6	60	211,0	0,132	62,95	7,74
14	4	7	40	242,2	0,131	56,28	11,40
15	4	4	40	242,2	0,137	57,19	18,62
16	4	4	40	233,1	0,124	49,80	16,61
17	7	4	40	248,8	0,148	44,01	23,55
18	4	1	40	274,1	0,347	49,01	43,95
19	2	2	60	201,3	0,151	58,10	18,86
20	2	6	20	294,9	0,164	74,26	9,01

Der Mittelwert der sechs Zentralpunkte des Wirkungsflächenversuchsplans betrug 242 nm, während die Prognose des Screening-Versuchsplans  $221 \text{ nm} \pm 14 \text{ nm}$  für die entsprechenden Einstellungen war. Damit waren die Partikel größer als durch das Screening vorhergesagt. Ob diese Abweichung an den Daten des Screening- oder Wirkungsflächen-Versuchsplans liegt, kann zu diesem Zeitpunkt nicht unterschieden werden, die Reproduzierbarkeit wird aber zu einem späteren Zeitpunkt getestet. Der Proteingehalt deckte einen großen Bereich zwischen 5,22 % und 43,95 % ab und die Beladungseffizienz lag zwischen 44,01 % und 74,26 %. Der Versuchsplan wurde für alle vier Antwortvariablen analysiert und die wichtigsten Kennzahlen Tabelle 5-17 in

zusammengefasst. Für jede Zielgröße wurden die Regressionsgleichungen berechnet (Formel 5-14 bis Formel 5-17).

*Tabelle 5-17: P-Werte der linearen und quadratischen Terme und Wechselwirkungen für die jeweiligen Antwortvariablen sowie Modellzusammenfassung nach Rückwärtselimination;  $\alpha$  für Ausschluss = 0,1*

Parameter \ Antwort Variable	D <sub>z</sub>	PDI	LE	PG
c (OVA)	0,004	0,083	<0,001	<0,001
c (PLGA)	nicht signifikant	0,001	0,004	<0,001
t (W/O/W)	<0,001	0,005	0,010	nicht signifikant
c (OVA) * c (OVA)	nicht signifikant	nicht signifikant	nicht signifikant	0,012
c (PLGA) * c (PLGA)	nicht signifikant	0,009	nicht signifikant	<0,001
t (W/O/W) * t (W/O/W)	<0,001	0,029	0,012	nicht signifikant
c (OVA) * c (PLGA)	nicht signifikant	nicht signifikant	nicht signifikant	0,031
p-Wert des Modells	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
S	18,8	0,039	3,71 %	1,90 %
R <sup>2</sup> [%]	88,39	76,67	76,91	97,14
R <sup>2</sup> (prog) [%]	72,97	21,47	55,86	90,62

$$D_z = 425,9 + 8,80 c(OVA) - 8,57 t(WOW) + 0,0767 t(WOW) \cdot t(WOW) \quad \text{Formel 5-14}$$

$$PDI = 0,5154 + 0,01031 c(OVA) - 0,0960 c(PLGA) - 0,00777 t(WOW) + 0,00925 c(PLGA) \cdot c(PLGA) + 0,000074 t(WOW) \cdot t(WOW) \quad \text{Formel 5-15}$$

$$LE = 76,41 - 2,423 c(OVA) + 1,813 c(PLGA) - 0,812 t(WOW) + 0,00823 t(WOW) \cdot t(WOW) \quad \text{Formel 5-16}$$

$$PG = 25,81 + 8,36 c(OVA) - 11,09 c(PLGA) - 0,426 c(OVA) \cdot c(OVA) + 1,051 c(PLGA) \cdot c(PLGA) - 0,403 c(OVA) \cdot c(PLGA) \quad \text{Formel 5-17}$$

Die p-Werte der Modelle waren unter 0,05 und hatten eine geringe Standardabweichung (Tabelle 5-17). Es kann daher davon ausgegangen werden, dass die Modelle die Daten gut beschreiben.

Für die mittlere Partikelgröße war die Homogenisierungsdauer der Doppelemulsion weiterhin der wichtigste Einflussfaktor. Durch den Wirkungsflächenversuchsplan wurde eine Krümmung dieses Zusammenhangs sichtbar. Zwischen 50 und 60 Sekunden sank die Partikelgröße nicht weiter. Zudem wurde sichtbar, dass im untersuchten Bereich die OVA-Konzentration einen Einfluss hatte. Im Haupteffekt- und Wirkungsflächendiagramm (Abbildung 5-13) kann man erkennen, dass

dieser Einfluss im Verhältnis zur Homogenisierungsdauer relativ gering war. Das  $R^2(\text{prog})$  von 72,97 %, zeigt an, dass zukünftige Ergebnisse gut vorhergesagt werden können.

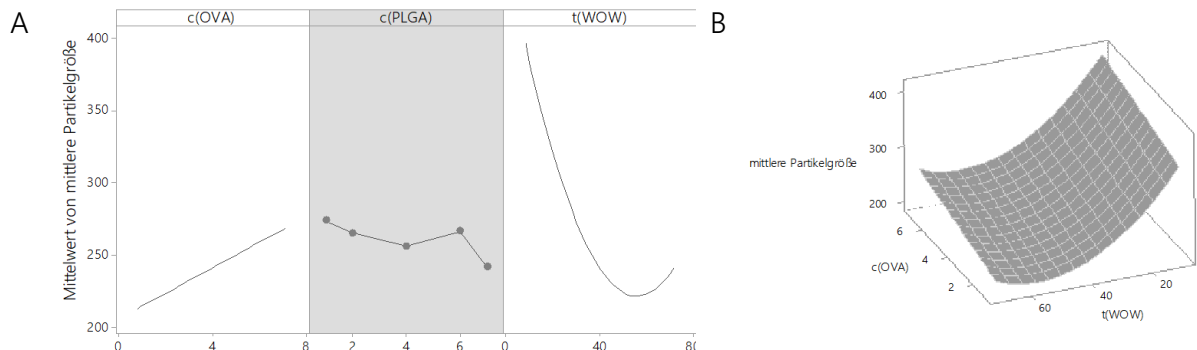


Abbildung 5-13: Einfluss der OVA- und PLGA-Konzentration und Homogenisierungsdauer auf die mittlere Partikelgröße, dargestellt als Haupteffekt- (A) und Wirkungsflächendiagramm (B); nicht im Modell enthaltene Terme sind grau hinterlegt

Im untersuchten Bereich hatten alle Faktoren einen signifikanten Einfluss auf den PDI. Der Einfluss der PLGA-Konzentration und der Homogenisierungsdauer wiesen eine Krümmung auf. Bei höheren Konzentrationen bzw. langer Homogenisierung stieg der PDI wieder an (Abbildung 5-14). Der Unterschied zwischen  $R^2$  und  $R^2(\text{prog})$  von mehr als 20 Prozentpunkten weist auf eine Überanpassung des Modells hin. Eine genaue Vorhersage von zukünftigen PDI ist daher mit diesem Modell nicht möglich.

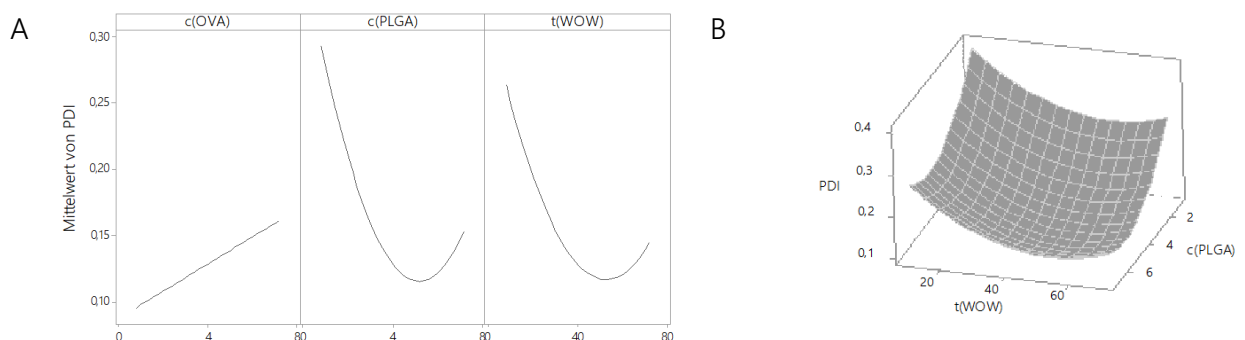


Abbildung 5-14: Einfluss der OVA- und PLGA-Konzentration und Homogenisierungsdauer auf den PDI, dargestellt als Haupteffekt- (A) und Wirkungsflächendiagramm (B)

Auch die Beladungseffizienz wies einen Unterschied zwischen  $R^2$  und  $R^2(\text{prog})$  von über 20 Prozentpunkten auf. Daher ist die Vorhersage zukünftiger Beladungseffizienzen mit Vorsicht zu betrachten. Wie bereits im Screening-Versuchsplan gezeigt, hatten die OVA- und PLGA-Konzentration

den größten Einfluss auf die Beladungseffizienz. Im untersuchten Bereich zeigte sich, dass auch  $t(W/O/W)$  einen Einfluss hat und dieser eine gewisse Krümmung aufweist (Abbildung 5-15).

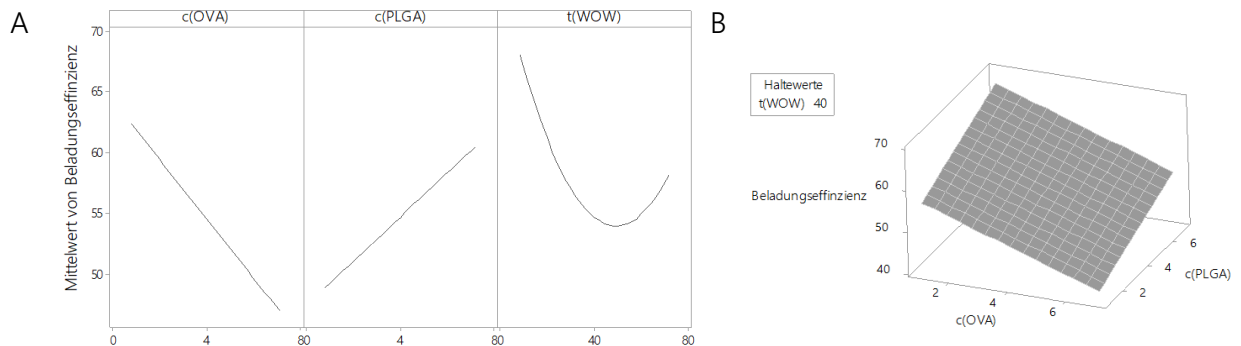


Abbildung 5-15: Einfluss der OVA- und PLGA-Konzentration und Homogenisierungsdauer auf die Beladungseffizienz, dargestellt als Haupteffekt- (A) und Wirkungsflächendiagramm (B)

Das Modell des Proteingehalts hatte ein  $R^2(\text{prog})$  von 90,62 % (Tabelle 5-17); zukünftige Ergebnisse lassen sich daher sehr gut vorhersagen. Die Homogenisierungsdauer hatte im Gegensatz zu den übrigen Parametern keinen signifikanten Einfluss auf den Proteingehalt. Im Wechselwirkungsdiagramm (Abbildung 5-16 B) erkennt man, dass die signifikante Wechselwirkung zwischen der OVA- und PLGA-Konzentration gering war. Mit steigender PLGA-Konzentration nimmt der Anstieg des Proteingehalts in Abhängigkeit von der OVA-Konzentration ab (Abbildung 5-16 B).

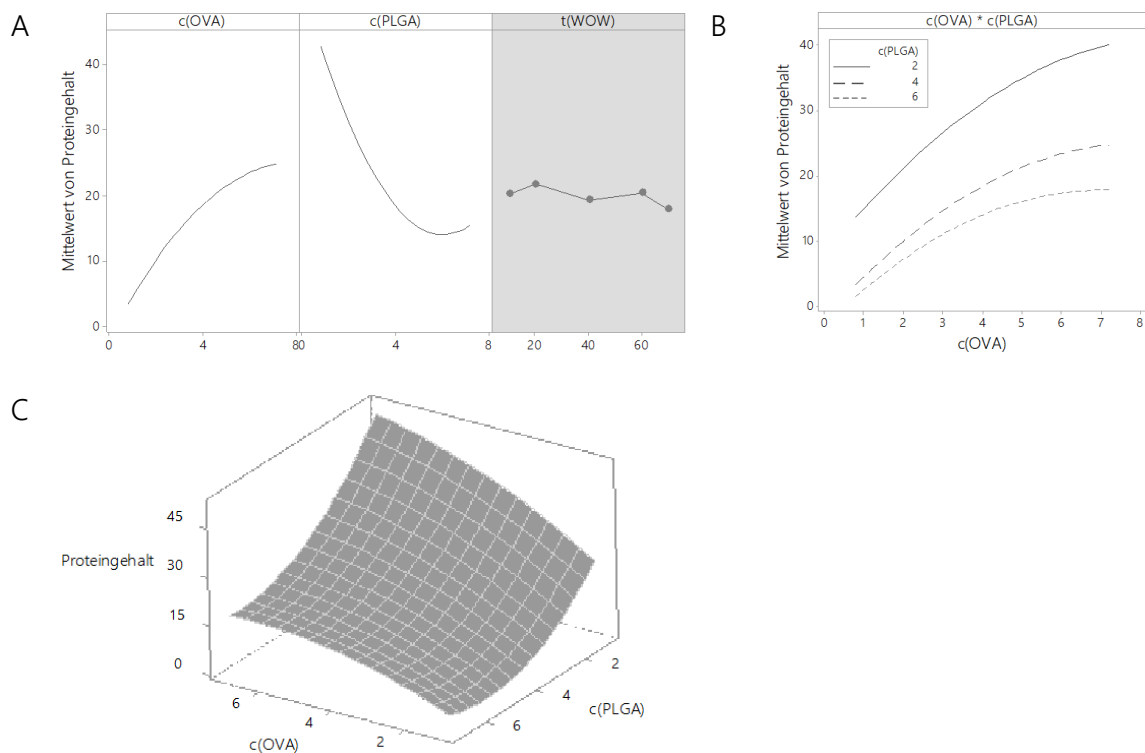


Abbildung 5-16: Einfluss der OVA- und PLGA-Konzentration und Homogenisierungsdauer auf den Proteingehalt, dargestellt als Haupteffekt- (A), Wechselwirkungs- (B) und Wirkungsflächen-diagramm (C); nicht im Modell enthaltene Terme sind grau hinterlegt

#### 5.1.5.5 Herstellung und Charakterisierung der finalen Chargen

Durch den Versuchsraum des zentral zusammengesetzten Versuchsplans der Ultraschallhomogenisator-Variante ist definiert, welche Partikeleigenschaften durch die Modelle in der Theorie generiert werden können. Mit der Zielgrößenoptimierung von Minitab® können die minimalen und maximalen Zielgrößen berechnet werden sowie die dazugehörigen Parameterkombinationen. Der geringste im Modell enthaltene Proteingehalt, der mit einer OVA-Konzentration von 1 % und einer PLGA-Konzentration von 5,5 % hergestellt werden kann, betrug 2,33 % und der höchste betrug 50,6 %, hergestellt mit 7 % OVA und 1 % PLGA. Die minimale mittlere Partikelgröße betrug 159,3 nm, hergestellt mit 1 % OVA und 56 s Homogenisierungsdauer. Durch 10 s Homogenisieren entstehen bei 7 % Ovalbumin Partikel mit einer Größe von 409 nm.

Da die OVA-Konzentration sowohl die mittlere Partikelgröße als auch den Proteingehalt beeinflusst, besteht eine gegenseitige Abhängigkeit dieser Zielgrößen. Daher ist es nicht möglich, gleichzeitig die gesamte Bandbreite an Partikelgrößen und Proteingehalten unabhängig voneinander zu erzielen. Die in der Theorie möglichen Ergebnisse decken jedoch einen weiten Bereich

ab. Die Ultraschallhomogenisator-Variante eignet sich also, um Partikel mit einer kleinen mittleren Partikelgröße herzustellen. Ich hatte mich dazu entschieden, mit einer Partikelgröße von 250 nm den unteren Bereich des Qualitätszielproduktprofils abzudecken. Für Partikel dieser Größe kann der Proteingehalt zwischen 2,5 % und knapp 50 % variiert werden. Ich hatte mich dazu entschieden, Partikel mit einer Proteinbeladung von 4,5 %, 20 % und 40 % mittels Ultraschallhomogenisator herzustellen. Zusätzlich wurde noch ein Versuchspunkt hergestellt mit hohem Proteingehalt und 300 nm großen Partikeln. Die entsprechenden Parameterkombinationen wurden mittels Zielgrößenoptimierung berechnet und in Tabelle 5-18 zusammengefasst. Die Mittelwerte und Standardabweichung aller Zielgrößen, der in dreifacher Ausführung hergestellten Versuchspunkte, sind in Abbildung 5-17 dargestellt sowie der Erwartungswert und das 95 %-Konfidenzintervall.

Tabelle 5-18: Zielgröße der mittleren Partikelgröße ( $D_z$ ) und des Proteingehalts (PG) sowie Herstellungsparameter der finalen Chargen, hergestellt mittels Ultraschallhomogenisator

Versuchspunkt	Zielgröße		Parameter						
	$D_z$ [nm]	PG [%]	c (OVA) [%]	c (PLGA) [%]	A (W/O) [%]	t (W/O) [s]	c (PVA) [%]	A (W/O) [%]	t (W/O/W) [s]
US(250;4,5)	250	4,5	1,02	4,07	35	60	5	35	29
US(250;20)	250	20	1,16	1,49	35	60	5	35	29
US(250;40)	250	40	6,99	1,98	35	60	5	35	51
US(300;40)	300	40	6,99	1,98	35	60	5	35	29

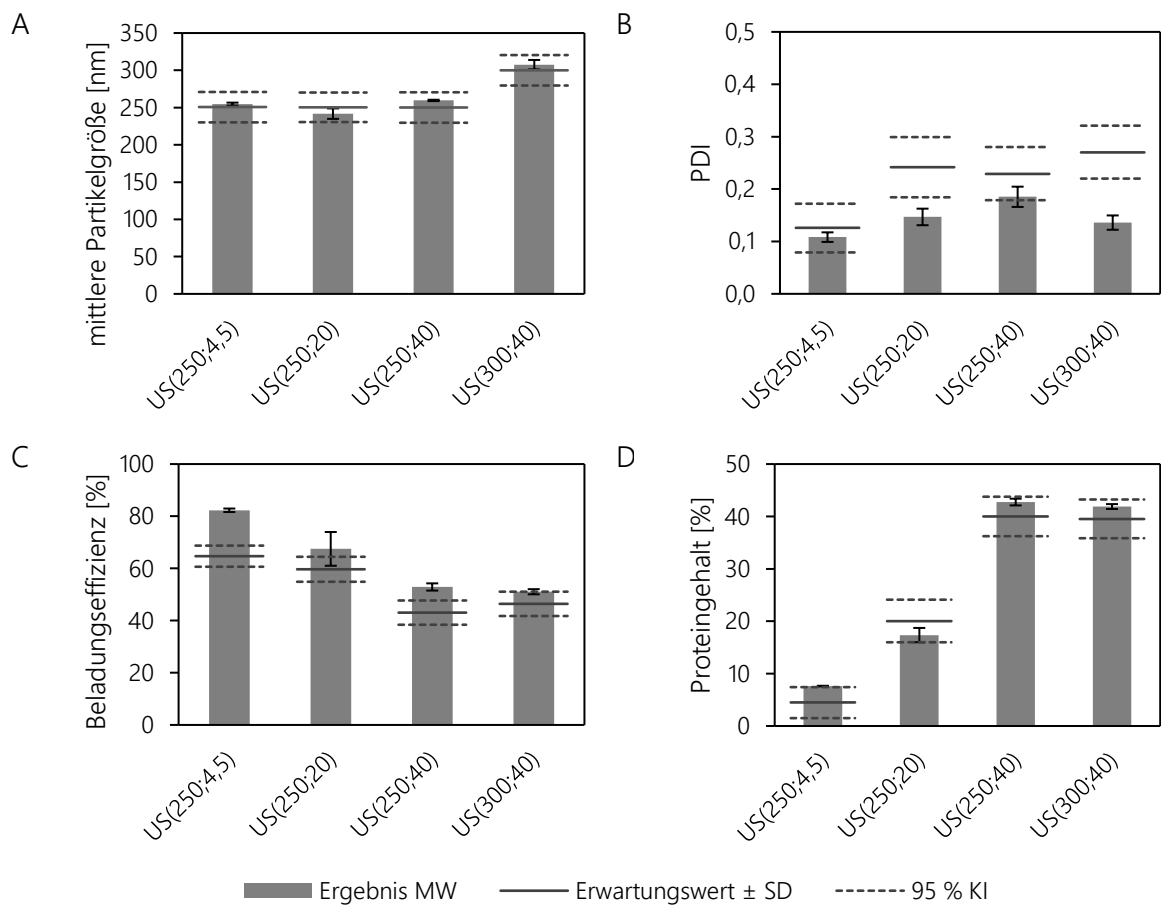


Abbildung 5-17: Erwartungswert für die mittlere Partikelgröße (A), PDI (B), Beladungseffizienz (C) und Proteingehalt (D) der finalen Versuchspunkte, hergestellt mittels Ultraschallhomogenisator inklusive 95 %-Konfidenzintervall, sowie Mittelwert der tatsächlichen Chargen; n = 3, Fehlerbalken = SD

Die mittleren Partikelgrößen ließen sich zielsicher herstellen und die Mittelwerte wichen nur minimal von den Erwartungswerten ab. Die Proteingehalte lagen auch innerhalb der Konfidenzintervalle, jedoch war der Proteingehalt des Versuchspunktes US(250;4,5) mit einem Mittelwert von 7,62 % deutlich höher als der Erwartungswert. Der Proteingehalt des Versuchspunktes US(250;20) wich mit einem mittleren Proteingehalt von 17,35 % leicht vom Zielwert ab.

Für alle Chargen war der PDI geringer als erwartet und lag deutlich unter 0,3. Daher kann von einer geringen Partikelgrößenverteilung ausgegangen werden. Die Beladungseffizienzen lagen jeweils über dem erwarteten Wert. Beide Zielgrößen hatten ein kleines  $R^2(\text{prog})$ , weshalb eine schlechte Vorhersage dieser Zielgrößen nicht verwunderlich ist.

### 5.1.6 Herstellung mittels Rotor-Stator-Homogenisator und Ultraschallhomogenisator

Mittels der betrachteten Parametereinstellungen der Ultra Turrax®-Methode konnten Partikel in einem Größenbereich ab 400 nm und bis zu über 1000 nm hergestellt werden. Die Proteinbeladung war dabei jedoch gering. Dagegen ließen sich durch Ultraschall-Homogenisation die Nanopartikel gut mit Protein beladen, was zu Proteingehalten bis zu 44 % führte. Doch selbst bei geringer Amplitude und kurzer Beschallungsdauer ließen sich keine Partikel herstellen, die im Mittel größer als 409 nm waren. Dementsprechend ließen sich mit keiner der beiden optimierten Methoden und ausgewählten Faktorstufen Partikel mit einer mittleren Größe von 500 nm und 20 % bzw. 40 % Proteingehalt herstellen. Das gleiche gilt für Partikel mit einer mittleren Größe von 700 nm und 20 % bzw. 40 % Proteingehalt.

Durch die Screening-Versuchspläne konnte die Erkenntnis gewonnen werden, dass Proteingehalt und Partikelgröße von unterschiedlichen Parametern abhängig sind und damit weitestgehend unabhängig voneinander eingestellt werden können. Der Proteingehalt wird maßgeblich durch die OVA-Konzentration, die PLGA-Konzentration beeinflusst. Die Partikelgröße wird bei der Ultra Turrax®-Variante durch die PLGA- Konzentration und die PVA-Konzentration beeinflusst. Bei beide Homogenisierungsmethoden ist das Homogenisieren der inneren Phasen (W/O) maßgeblich für den Proteingehalt verantwortlich und das Homogenisieren der Doppalemulsion (W/O/W) beeinflusst die Partikelgröße. Daher liegt die Vermutung nahe, dass man mit einer Kombination aus beiden Homogenisierungsmethoden auch große Partikel mit hoher Proteinbeladung herstellen kann. Um das zu erreichen, würde man den Ultraschallhomogenisator zur Herstellung der inneren Emulsion nutzen und mittels Ultra-Turrax® die Doppalemulsion herstellen.

Da diese Parameterkombination außerhalb des bisher betrachteten Versuchsraumes liegt, wäre zur statistischen Vorhersage der genannten Zielgrößen ein weitere Versuchsplan nötig. Da jedoch bereits viele Korrelationen aus den bereits vorhandenen Versuchsplänen bekannt und die Zielgrößen getrennt voneinander einstellbar sind, wird im Folgenden untersucht, inwieweit sich Parametereinstellungen, die aus Kombinationen der Versuchspläne und den daraus ermittelten Regressionsgleichungen berechnet werden, als zielführend erweisen. Die so ermittelten Parametereinstellungen dürfen nicht mit einem genau berechneten Optimum verwechselt werden, da ohne weiteren statistischen Versuchsplan, der genau diesen Versuchsaufbau umfasst, nicht vorhergesagt werden kann, wie sich das Emulgieren mittels Ultra Turrax® und Ultraschallhomogenisator

gegenseitig beeinflussten. Diese Abschätzung kann ein Anhaltspunkt für weitere Versuche darstellen oder als theoretischer Vorversuch für weitere statistische Versuchspläne dienen. Zum Berechnen der zwei Zielgrößen sind jeweils die Formeln aus den Screening-Versuchsplänen (Formel 5-2 für die mittlere Partikelgröße und Formel 5-13 für den Proteingehalt) und den Wirkungsflächenversuchsplänen (Formel 5-6 für die mittlere Partikelgröße und Formel 5-17 für den Proteingehalt) geeignet. Daher gibt es mehrere Möglichkeiten, die zur Berechnung der Parametereinstellung für die Versuchspunkte US\_UT(500;20), US\_UT(500;40), US\_UT(700;20) und US\_UT(700;40) genutzt werden können.

Im Folgenden möchte ich gerne drei dieser Möglichkeiten (Variante 1 bis 3) vorstellen, die ich genutzt habe, um die Partikeleigenschaften den gewünschten Zielgrößen anzunähern. Für Variante 1 und 2 wurden die Formeln der Screening-Versuchspläne genutzt. Bei der ersten Variante wurden die bereits verwendeten Umdrehungsgeschwindigkeiten des Ultra-Turrax® berücksichtigt. Bei der zweiten Variante wurde eine noch nicht verwendete Rührgeschwindigkeit genutzt und die anderen Parameter dementsprechend angepasst. Bei der dritten Variante wurden die Formeln aus den Wirkungsflächenversuchsplänen verwendet, um eine optimale Parameterkombination zu finden.

Für alle Rechenvarianten müssen Einstellungen für  $c$  (OVA),  $c$  (PLGA),  $A$  (W/O),  $t$  (W/O),  $c$  (PVA),  $v$  (W/O/W) und  $t$  (W/O/W) festgelegt werden. Diese sollen möglichst innerhalb des Bereiches liegen, der bereits in dem entsprechenden Versuchsplan untersucht wurde. Nachdem alle Parameter festgelegt wurden, wurde je eine Charge pro Versuchspunkt und Rechenvariante hergestellt.

#### 5.1.6.1 Variante 1

Für diese Rechenvariante wurde die mittlere Partikelgröße mit der Formel aus dem Ultra-Turrax®-Screening-Versuchsplan (Formel 5-2) und der Proteingehalt mit der Formel des Ultraschall-Screening-Versuchsplans (Formel 5-13) berechnet. Es wurden die Formeln der Screening-Designs gewählt, da bei diesen mehr Freiheitsgrade existieren als bei den Wirkungsflächenversuchsplänen, da dort bereits mehrere Parameter festgelegt wurden.

Um Parameterkombinationen zu finden, die 500 nm bzw. 700 nm große Partikel generieren, wurde die PVA-Konzentration für eine Rührgeschwindigkeit von 8000 upm und 13500 upm und eine PLGA-Konzentration von 2 % und 3 % mit Formel 5-2 berechnet (Tabelle 5-19 und Tabelle

5-20). Da es sich bei der Rührgeschwindigkeit um einen qualitativen Faktor handelt, wird für 8000 upm -1 in die Formel eingesetzt und für 13500 upm +1.

*Tabelle 5-19: PVA-Konzentration für eine mittlere Partikelgröße von 500 nm, berechnet aus Formel 5-2 für die Kombinationen aus einer Rührgeschwindigkeit von 8000 upm und 13500 upm mit einer PLGA-Konzentration von 2 % und 3 %; fett markiert sind die PVA-Konzentrationen, die sich innerhalb des Versuchsraumes befinden*

c(PVA) für 500 nm	c(PLGA) = 2 %	c(PLGA) = 3 %
v(W/O/W) = 8000 upm (-1)	5,10 %	5,52 %
v(W/O/W) = 13500 upm (+1)	2,76 %	3,17 %

*Tabelle 5-20: PVA-Konzentration für eine mittlere Partikelgröße von 700 nm, berechnet aus Formel 5-2 für die Kombinationen aus einer Rührgeschwindigkeit von 8000 upm und 13500 upm mit einer PLGA-Konzentration von 2 % und 3 %; als fett markiert sind die PVA-Konzentrationen, die sich innerhalb des Versuchsraumes befinden*

c(PVA) für 700 nm	c(PLGA) = 2 %	c(PLGA) = 3 %
v(W/O/W) = 8000 upm (-1)	4,69 %	5,11 %
v(W/O/W) = 13500 upm (+1)	2,35 %	2,76 %

Da eine PVA-Konzentration über 5 % außerhalb des Versuchsraums des Screening-Designs liegt, habe ich mich entschieden, eine Rührgeschwindigkeit von 13500 upm zur Herstellung der 500 nm und 700 nm großen Partikel zu verwenden.

Im nächsten Schritt sollen die Parametereinstellungen für den Proteingehalt berechnet werden. Da A(W/O) und t(W/O) eine geringe Steigung aufweisen, also nur einen geringen Einfluss auf den Proteingehalt haben, wurden diese entsprechend Abschnitt 5.1.5.3 festgelegt und die anderen Parameter mit diesen festgelegten Werten berechnet. Die Amplitude wurde auf 35 % eingestellt und die Homogenisierungsdauer auf 60 s. Die OVA-Konzentration wurde für eine PLGA-Konzentration von 2 % und 3 % und für einen Proteingehalt von 20 % und 40 % berechnet (Tabelle 5-21).

*Tabelle 5-21: OVA-Konzentration für einen Proteingehalt (PG) von 20 % und 40 % berechnet aus Formel 5-13 mit einer PLGA-Konzentration von 2 % und 3 %; fett markiert sind die PVA-Konzentrationen, die sich innerhalb des Versuchsraumes befinden*

c(OVA)	c(PLGA) = 2 %	c(PLGA) = 3 %
für 20 % PG	1,4 %	2,5 %
für 40 % PG	8,3 %	9,3 %

Für einen Proteingehalt von 20 % wurde eine PLGA-Konzentration von 3 % gewählt, da somit alle Parameter innerhalb der getesteten Grenzen liegen. Für einen Proteingehalt von 40 % liegen beide OVA-Konzentrationen außerhalb dieser Grenzen, weshalb ich mich für die kleineren Konzentrationen von 2 % PLGA und 8,3 % OVA entschieden habe. Alle Parameterkombinationen für die vier Versuchspunkte befinden sich in Tabelle 5-22.

*Tabelle 5-22: Parameterkombinationen zur Herstellung der berechneten Versuchspunkte nach Variante 1*

Versuchspunkt	Zielgröße		Parameter						
	D <sub>z</sub> [nm]	PG [%]	c (OVA) [%]	c (PLGA) [%]	A (W/O) [%]	t (W/O) [s]	c (PVA) [%]	v (W/O/W) [upm]	t (W/O/W) [s]
US_UT (500;20)I	500	20	2,5	3	35	60	3,17	13500	150
US_UT (500;40)I	500	40	8,3	2	35	60	2,76	13500	150
US_UT (700;20)I	700	20	2,5	3	35	60	2,76	13500	150
US_UT (700;40)I	700	40	8,3	2	35	60	2,35	13500	150

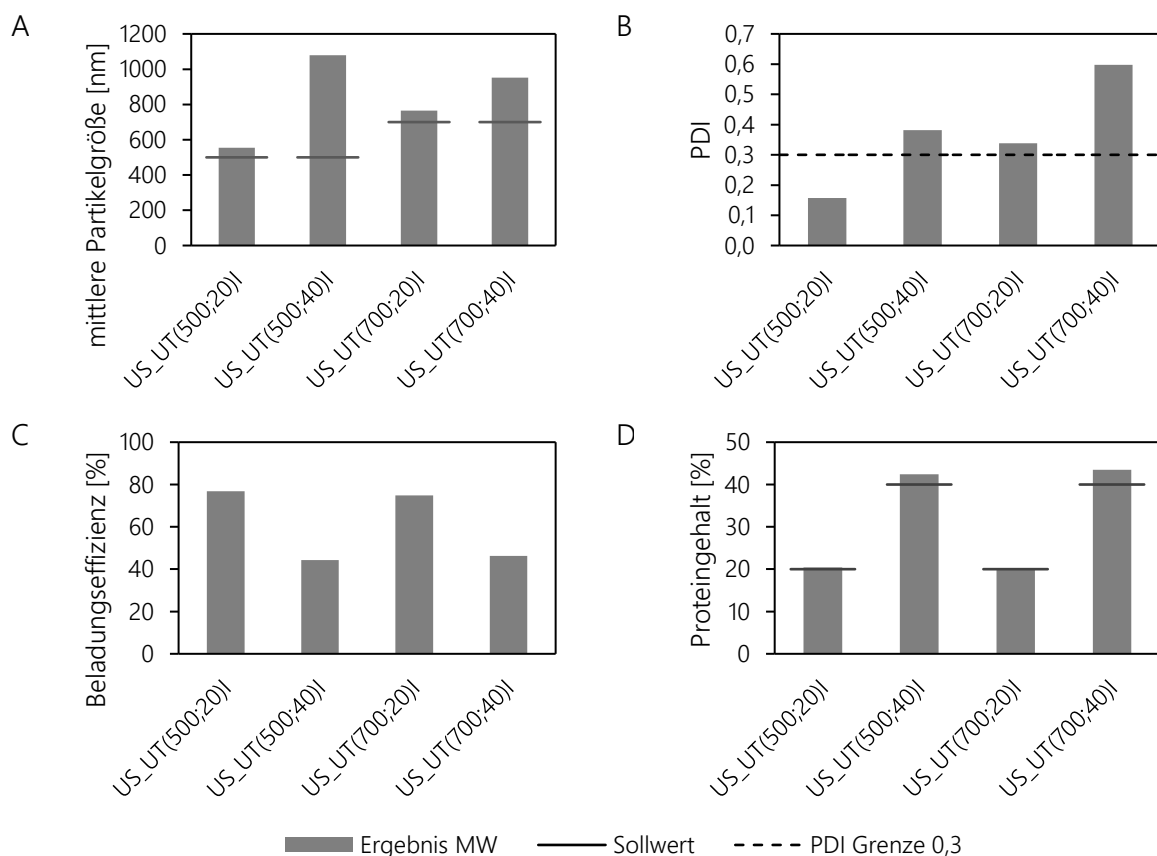


Abbildung 5-18: Ergebnisse der hergestellten Versuchspunkte der mittleren Partikelgröße (A), PDI (B), Beladungseffizienz (C) und Proteingehalt (D), inklusive Erwartungswerte, hergestellt durch Ultra-Turrax® und Ultraschallhomogenisator, berechnet durch Rechenvariante 1;  $n = 1$

Im Anschluss wurden alle drei Versuchspunkte hergestellt, analysiert und die Ergebnisse in Abbildung 5-18 zusammengefasst. Die Vorhersage des Proteingehalts hat sehr gut funktioniert. Keiner der Ergebnisse weicht um mehr als 10 % vom Erwartungswert ab. Die Vorhersage der mittleren Partikelgröße hat für die Versuchspunkte mit 20 % Proteingehalt gut funktioniert. Die mittlere Partikelgröße der Versuchspunkte US\_UT(500;40)I und US\_UT(700;40)I weicht stark vom Erwartungswert ab. Da eine OVA-Konzentration gewählt wurde, die deutlich über der im Screening getesteten Konzentration lag, ist dieses Ergebnis nicht überraschend.

### 5.1.6.2 Variante 2

Wie in der Rechnung aus dem vorherigen Abschnitt wurden auch an dieser Stelle die Formeln des Screening-Designs genutzt. Da eine Umdrehungsgeschwindigkeit von 8000 upm sehr hohe PVA-Konzentrationen erfordert, soll an dieser Stelle geprüft werden, ob neben den bereits verwendeten 13500 upm aus Variante 1 auch eine mittlere Rührgeschwindigkeit zu den gewünschten Qualitätsmerkmalen führt. Der verwendete Ultra-Turrax® lässt sich zwischen den bereits verwendeten Einstellungen zusätzlich noch auf 9500 upm einstellen. Dieser Wert wird jedoch nicht vom Screening-Design abgedeckt, da die Rührgeschwindigkeit dort als qualitativer Faktor analysiert wurde. Ein grobes Abschätzen der gewünschten Faktoreinstellung zum Annähern der definierten Qualitätsmerkmale soll an dieser Stelle dennoch ausprobiert werden. Da ein quantitativer Faktor mit den Werten -1 ( $\cong$  8000 upm) und +1 ( $\cong$  13500 upm) in die Formel eingesetzt wird, musste zuerst der entsprechende Wert für 9500 upm berechnet werden. Auch wenn es in den vorherigen Versuchen nicht untersucht wurde, wurde hierfür näherungsweise ein linearer Zusammenhang angenommen. Daraus ergibt sich ein Wert von -0,45, der einer Umdrehungsgeschwindigkeit von 9500 upm entspricht. Da mit den gleichen PLGA- und PVA-Konzentrationen wie bei der vorherigen Variante gearbeitet wurde, konnte die PVA-Konzentration über Formel 5-2 berechnet werden. Die resultierenden Parametereinstellungen sind in Tabelle 5-23 zusammengestellt.

*Tabelle 5-23: Parameterkombinationen zur Herstellung der berechneten Versuchspunkte nach Rechenvariante 2*

Versuchspunkt	Zielgröße		Parameter						
	D <sub>z</sub> [nm]	PG [%]	c (OVA) [%]	c (PLGA) [%]	A (W/O) [%]	t (W/O) [s]	c (PVA) [%]	v (W/O) [upm]	t (W/O/W) [s]
US_UT (500;20) II	500	20	2,5	3	35	60	4,88	9500	150
US_UT (500;40) II	500	40	8,3	2	35	60	4,46	9500	150
US_UT (700;20) II	700	20	2,5	3	35	60	4,46	9500	150
US_UT (700;40) II	700	40	8,3	2	35	60	4,05	9500	150

Für jede Parameterkombination wurde eine Charge hergestellt, analysiert und die Ergebnisse in Abbildung 5-19 zusammengefasst.

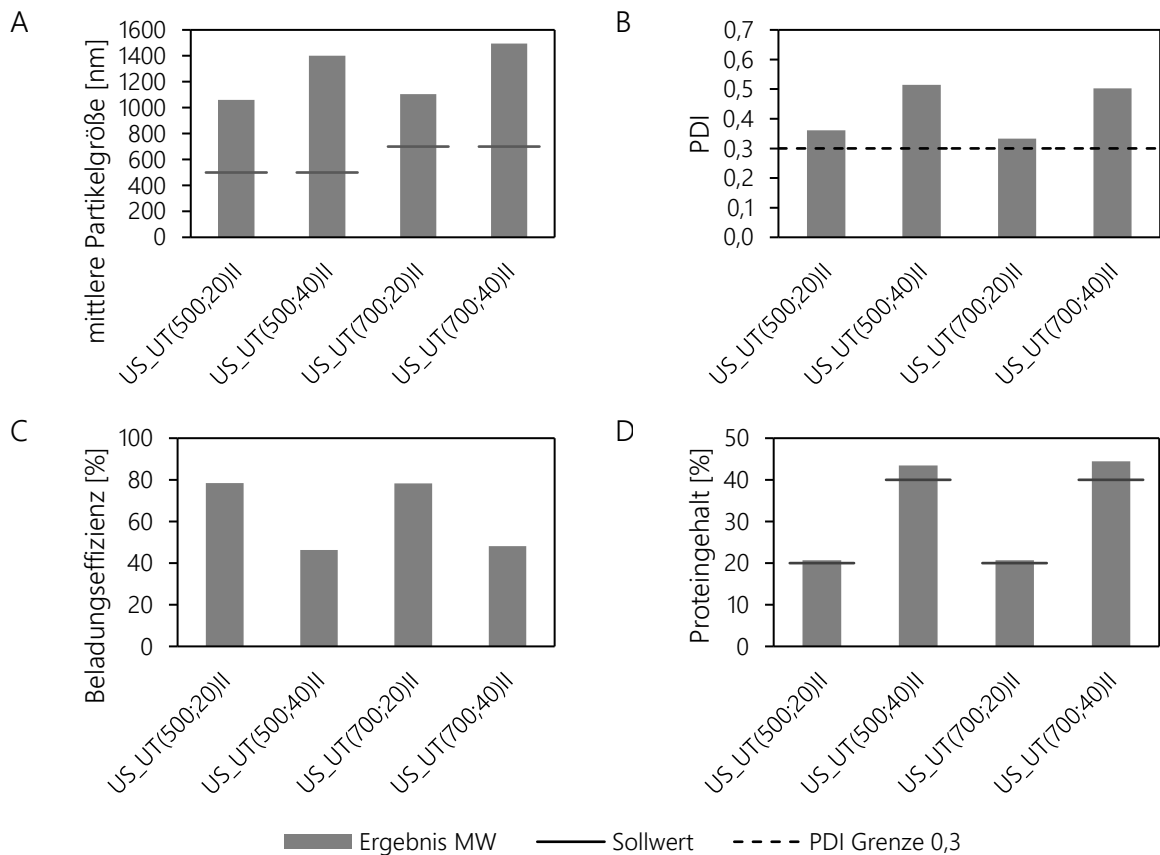


Abbildung 5-19: Ergebnisse der hergestellten Versuchspunkte der mittleren Partikelgröße (A), PDI (B), Beladungseffizienz (C) und Proteingehalt (D), inklusive Zielwerte, hergestellt durch Ultra-Turrax® und Ultraschallhomogenisator, berechnet durch Rechenvariante 2; n = 1

Die Zielproteingehalte für eine Beladung von 20 % wurden gut erreicht. Der Proteingehalt von US\_UT(500;40) II lag mit einem Wert von 43,48 % knapp innerhalb der 10 % Grenze, während der Gehalt von US\_UT(700;40) II mit einem Wert von 44,45 % um mehr als 10 % vom Zielwert abwich. Die mittleren Partikelgrößen sind deutlich größer als die Zielwerte und kein PDI ist kleiner als die Zielobergrenze von 0,3. Bei der Berechnung der mittleren Partikelgröße durch Formel 5-2 wurde von einem linearen Zusammenhang zwischen Umdrehungsgeschwindigkeit und mittlerer Partikelgröße ausgegangen, um die Einstellungen der Parameter näherungsweise zu berechnen. Eine Abweichung vom Zielwert kann darauf hinweisen, dass dieser Zusammenhang nicht linear ist.

### 5.1.6.3 Variante 3

Für diese Variante wurden die Formeln aus den Wirkungsflächen-Versuchsplänen genutzt, um die mittlere Partikelgröße (Formel 5-6) und den Proteingehalt (Formel 5-17) zu berechnen. Da bei diesen Versuchen bereits die meisten Parameter festgelegt sind, bleiben als Variablen nur noch die OVA-, PLGA- und PVA-Konzentration übrig. Angelehnt an die Parameterkombinationen aus Kapitel 5.1.5.5 wurde die OVA-Konzentration auf 7 % festgelegt, um Partikel mit einem Zielproteingehalt von 40 % herzustellen. Um Partikel mit einem Zielproteingehalt von 20 % herzustellen, wurde eine OVA-Konzentration von 4 % gewählt. Die errechneten Parameterkombinationen befinden sich in Tabelle 5-24.

*Tabelle 5-24: Parameterkombinationen zur Herstellung der berechneten Versuchspunkte nach Variante 3*

Versuchspunkt	Zielgröße		Parameter						
	D <sub>z</sub> [nm]	PG [%]	c (OVA) [%]	c (PLGA) [%]	A (W/O) [%]	t (W/O) [s]	c (PVA) [%]	v (W/O) [upm]	t (W/O/W) [s]
US_UT (500;20)III	500	20	4	3,67	35	60	5,2	13500	150
US_UT (500;40)III	500	40	7	2	35	60	3,76	13500	150
US_UT (700;20)III	700	20	4	3,67	35	60	2,52	13500	150
US_UT (700;40)III	700	40	7	2	35	60	2,11	13500	150

Die mit diesen Einstellungen hergestellten Partikel wurden analysiert und die Ergebnisse in Abbildung 5-20 zusammenfassend dargestellt. Die Zielproteingehalte wurden wieder gut erreicht, auch wenn die Abweichung etwas größer ist als bei der ersten Variante. Die mittlere Partikelgröße der hergestellten Chargen ist höher als vorhergesagt und der PDI aller Chargen, außer US\_UT(500;20)III, ist über 0,3.

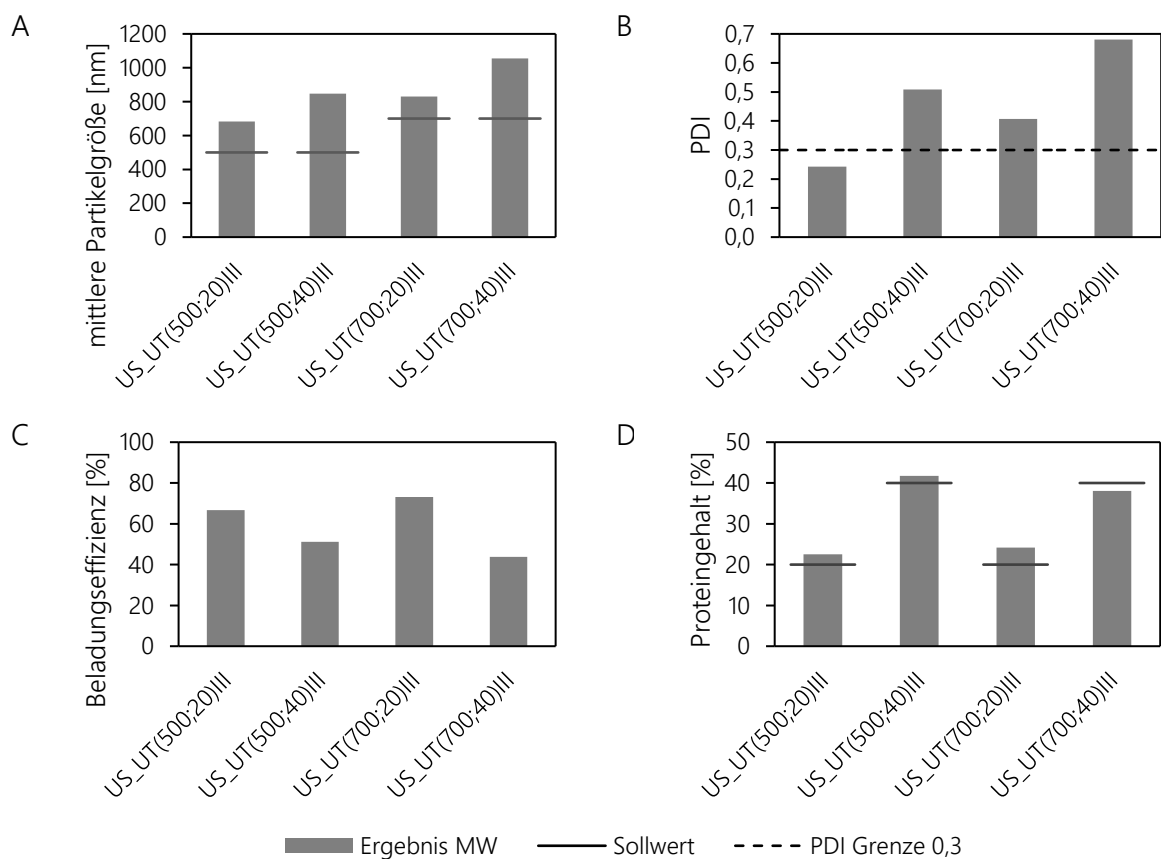


Abbildung 5-20: Ergebnisse der hergestellten Versuchspunkte der mittleren Partikelgröße (A), PDI (B), Beladungseffizienz (C) und Proteingehalt (D), inklusive Zielwerte, hergestellt durch Ultra-Turrax® und Ultraschallhomogenisator, berechnet durch Rechenvariante 3;  $n = 1$

Die Prozessparameter, die durch die Regressionsgleichungen der Wirkungsflächenversuchspläne berechnet wurden, generierten Produkte, die etwas mehr von den definierten Qualitätsmerkmalen abwichen als die durch Variante 1 hergestellten Partikel. Auch wenn der Zielproteingehalt gut erreicht wurde, zeigte sich aufgrund der großen Abweichungen der Partikelgrößen und des hohen PDI, dass auch durch diese Variante nicht die gewünschten, definierten Partikel generieren konnte. Um mittels Kombination der zwei Homogenisierungsverfahren die Zieleigenschaften zu erreichen, ist eine eigenständige Prozessoptimierung unabdingbar. Offensichtlich beeinflusst das Homogenisieren der inneren Phase mittels Ultraschalls, die Partikelgröße deutlich mehr, als es der Fall ist, wenn die innere Phase mittels Ultra-Turrax® hergestellt wird.

### 5.1.7 Weitere Untersuchungen der PLGA-Nanopartikel

Nachdem der Herstellungsprozess der Nanopartikel bzw. der Nanosuspension analysiert und so angepasst wurde, dass Nanopartikel mit definierten Eigenschaften zielsicher hergestellt werden konnten, sollten nun die restlichen Elemente des Qualitätszielproduktprofils, das in Kapitel 5.1.1 definiert wurde, untersucht werden. Diese Elemente des QTTP beziehen sich auf die Eigenschaften des stabilisierten Endproduktes, bei dem es sich um eine getrocknete Nanopartikelsuspension handelt. Die frisch hergestellten Nanopartikel mussten dementsprechend zuerst, wie in Kapitel 4.1 beschrieben, aufgereinigt und gefriergetrocknet werden. Dies wurde nicht mit allen hergestellten Partikelarten gemacht, sondern beispielhaft am Versuchspunkt „UT(700;4,5)“ aus Kapitel 5.1.5.5 gezeigt.

Um sicherzugehen, dass das Gefrieretrocknen die kritischen Eigenschaften der Nanopartikel nicht verändert hatte, wurde zuerst die Redispergierbarkeit bestimmt. Dafür wurden die mittlere Partikelgröße und der PDI vor und nach dem Gefrieretrocknen gemessen und verglichen. Zudem wurden die Partikel direkt nach der Herstellung, also vor dem Aufreinigen, vermessen.

Im QTTP ist beschrieben, dass das trockene Produkt über mindestens 30 Tage im Kühlschrank physikalisch stabil sein soll. Als Qualitätsmerkmale wurden die mittlere Partikelgröße, der PDI, das Zeta-Potential und die Gesamtproteinmenge definiert, die zu bestimmten Zeitpunkten gemessen und mit dem Ausgangswert verglichen wurde.

Für die Wirkstofffreisetzung wurde als Ziel definiert, dass die Wirkstoffmenge, die innerhalb der ersten 24 h freigesetzt wird, geringer als 10 % bzw. optimal unter 5 % sein soll. Zudem soll das Freisetzungsprofil bestimmt werden.

#### 5.1.7.1 Redispergierbarkeit

Um die Redispergierbarkeit zu bestimmen, wurde zu dem gefriergetrockneten Produkt, das aus 1 ml Suspension hergestellt wurde, 1 ml Milli-Q®-Wasser gegeben und geschüttelt. Die mittlere Partikelgröße und der PDI der entstandenen Nanopartikelsuspension wurden im Zetasizer vermessen (Abbildung 5-21). Für beide Größen konnte kein signifikanter Unterschied im Vergleich zur frisch hergestellten Suspension festgestellt werden. Die durchschnittliche mittlere Partikelgröße war mit 696,2 nm sehr nah an dem Zielwert von 700 nm. Auch wenn die Standardabweichung etwas angestiegen war, wich keiner der Einzelwerte um mehr als 10 % vom Zielwert ab.

Der PDI blieb auch nach dem Gefriertrocknen unter 0,3. Da sowohl der PDI als auch die mittlere Partikelgröße unverändert geblieben sind, kann davon ausgegangen werden, dass sich das Produkt vollständig redispersieren ließ.

Nach der Aufreinigung (beschrieben in Kapitel 4.1.3) stieg der PDI signifikant auf 0,336 an, während die Partikelgröße leicht auf 644,5 nm sank. Bei der Aufreinigung wurde neben Ovalbumin auch Stabilisator entfernt. Die Entfernung von Stabilisator kann zur Agglomeration von Partikeln führen, wodurch sich dann der PDI erhöhen würde. Falls es zu einer Agglomeration gekommen wäre, hätte sich auch die mittlere Partikelgröße erhöht, was hier jedoch nicht beobachtet wurde. Ein weiterer möglicher Einflussfaktor ist der Wechsel des Dispersionsmediums im Zuge der Aufreinigung. Dieser kann den gemessenen hydrodynamischen Durchmesser beeinflussen, auch wenn der geometrische Durchmesser der Partikel unverändert bleibt. Der hydrodynamische Durchmesser wird unter anderem durch Wechselwirkungen zwischen Partikeln und Medium beeinflusst. Änderungen der Ionenstärke oder des pH-Wertes des Mediums beeinflussen die elektrische Doppelschicht und somit den hydrodynamischen Durchmesser der Partikel. Zusätzlich beeinflusst eine mögliche veränderte Viskosität des Mediums die Teilchenbewegung. Dies hätte wiederum Einfluss auf die Auswertung der Messdaten, ohne dass sich der hydrodynamische Durchmesser ändert. Eine gleichzeitige Überlagerung der Effekte von Agglomeration und Medienwechsel ist zwar unwahrscheinlich, kann jedoch nicht vollständig ausgeschlossen werden.

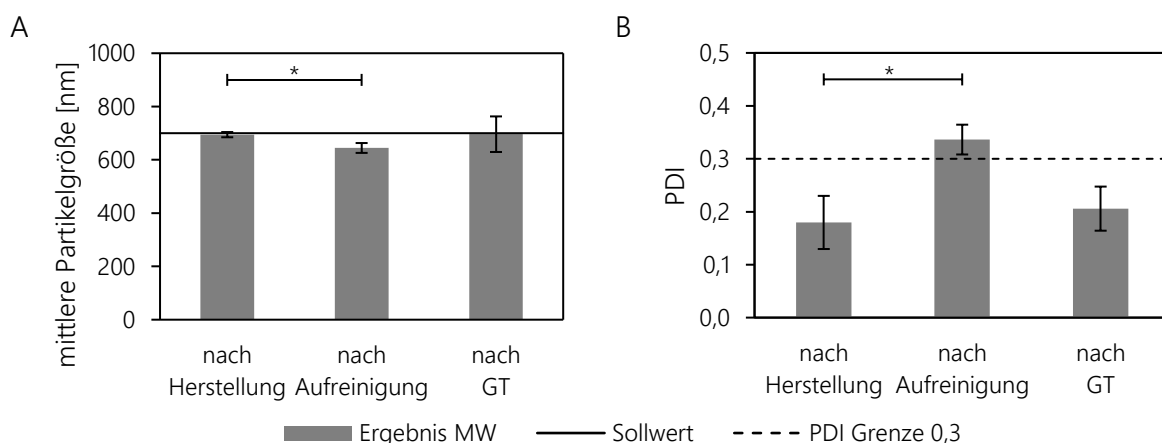


Abbildung 5-21: mittlere Partikelgröße (A) und PDI (B) des Versuchspunktes UT(700;4,5) gemessen direkt nach der Herstellung, nach der Aufreinigung und nach dem Gefriertrocknen (GT),  $n = 3$ , Fehlerbalken = SD, \* = Signifikanzniveau  $<0,05$

#### 5.1.7.2 Stabilität

Um die Stabilität zu bestimmen, wurde jede Charge auf mehrere Gefäße aufgeteilt, gefriergetrocknet und bis zum Verwenden im Kühlschrank gelagert. Direkt nach dem Gefriertrocknen, nach 30 Tagen und nach 90 Tagen wurden je drei Aliquote pro Charge redispergiert und vermessen (Abbildung 5-22). Die mittlere Partikelgröße, der PDI und das Zeta-Potential blieben über 90 Tage hinweg unverändert. Der Proteingehalt, der je Aliquot bei 1000 µg liegen soll, ist über den Zeitraum leicht angestiegen. Es fällt auf, dass dieser direkt nach dem Gefriertrocknen leicht unterhalb des Zielwertes lag. Es ist unwahrscheinlich, dass der Proteingehalt tatsächlich über den Messzeitraum angestiegen ist. Möglicherweise handelt es sich dabei um ein Artefakt, das durch die Probenreihenfolge während des Aliquotierens entstanden ist. Die Proben zur Stabilitätsanalytik wurden in der Reihenfolge entnommen, in der sie abgefüllt wurden. Wenn es während des Abfüllens zu Sedimentation der Nanopartikel gekommen ist, dann würden die Proben, die später abgefüllt wurden, mehr sedimentierte Partikel und damit mehr Protein enthalten. Die Chargen, die für die Freisetzungsuntersuchungen genutzt wurden, wurden als eine Portion gefriergetrocknet. Dort gab es keinen Hinweis auf ein Ansteigen des Proteingehaltes über den Lagerungszeitraum. Diese Proben hatten einen Proteingehalt von  $100,3 \pm 3,2$  µg/ml bei einem Zielwert von 100 µg/ml.

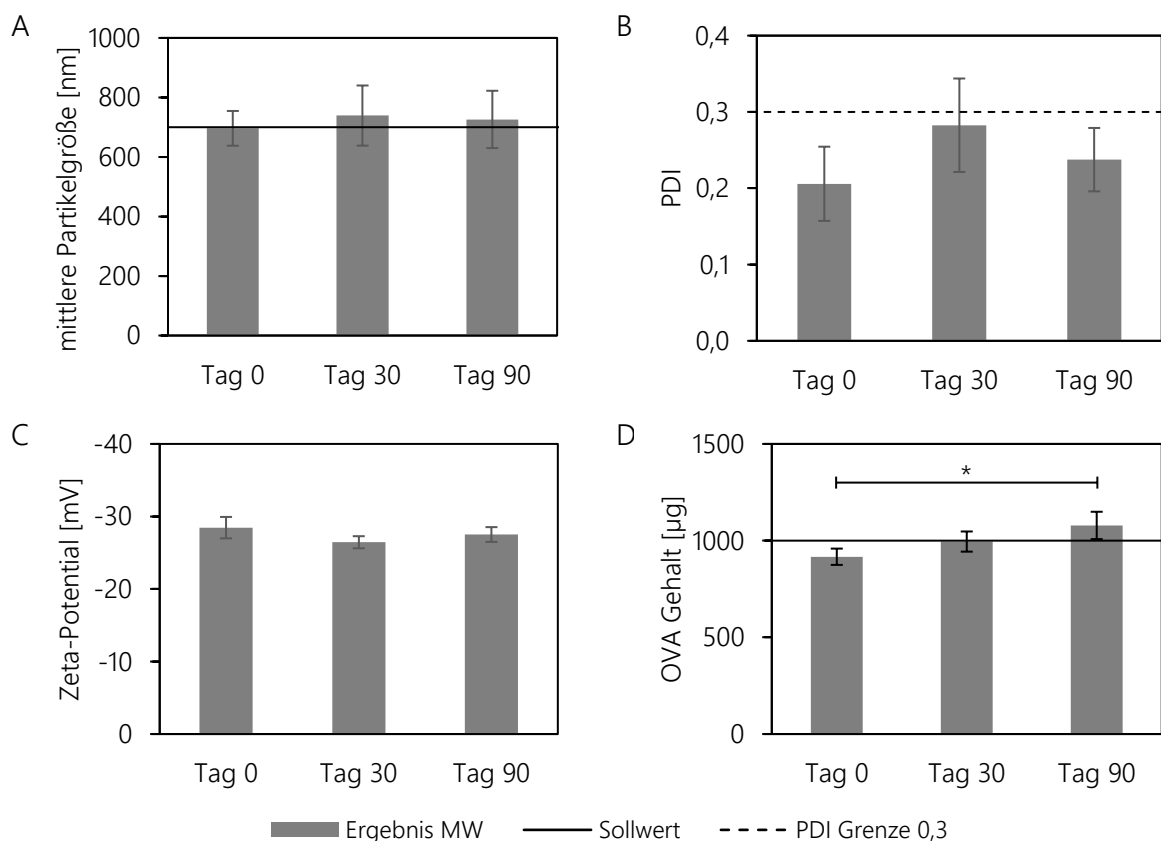


Abbildung 5-22: Mittlere Partikelgröße (A), PDI (B), Zeta-Potential (C) und Ovalbumingehalt (D) des Versuchspunktes UT(700;4,5) gemessen direkt nach dem Gefriertrocknen (Tag 0), nach 30 Tagen und nach 90 Tagen,  $n = 3$ , Fehlerbalken = SD, \* = Signifikanzniveau  $< 0,05$

Über den Zeitraum von 30 Tagen, der im QTTP definiert wurde, konnten keine Unterschiede im Produkt festgestellt werden. Daher kann davon ausgegangen werden, dass das Produkt im Kühlschrank für mindestens 30 Tage physikalisch stabil ist. Die physikalische Stabilität ist auch über einen längeren Zeitraum von 90 Tagen gegeben. Der Proteingehalt sollte für jede redispergierte Probe überprüft werden, um sicherzustellen, dass die definierte Proteinmenge enthalten ist.

### 5.1.7.3 Wirkstofffreisetzung

Die Freisetzung des verkapselten Ovalbumins wurde über einen Zeitraum von acht Wochen bestimmt. Die Proben mit einem Zielwert von 15 mg OVA wurden in je 150 ml Puffer dispergiert. Zu Beginn und Ende der Freisetzung wurde die Gesamt-OVA-Konzentration bestimmt, die sich von  $100,3 \pm 3,2 \mu\text{g/ml}$  auf  $98,7 \pm 3,8 \mu\text{g/ml}$  nicht signifikant veränderte ( $p = 0,616$ ) und weniger als 2 % vom Zielwert abwich.

Direkt nach dem Redispergieren waren bereits  $3,25 \pm 0,78$  % des Wirkstoffes freigesetzt und nach 24 Stunden waren es  $3,65 \pm 0,07$  % (Abbildung 5-23). Damit liegt die initiale Freisetzung unter den geforderten 5 %. Da auch nach 24 Stunden weniger als 5 % des Ovalbumins freigesetzt wurden, kann davon ausgegangen werden, dass das Protein gut durch die PLGA-Hülle geschützt ist und das Potential hat, fast vollständig in die Zielzelle zu gelangen.

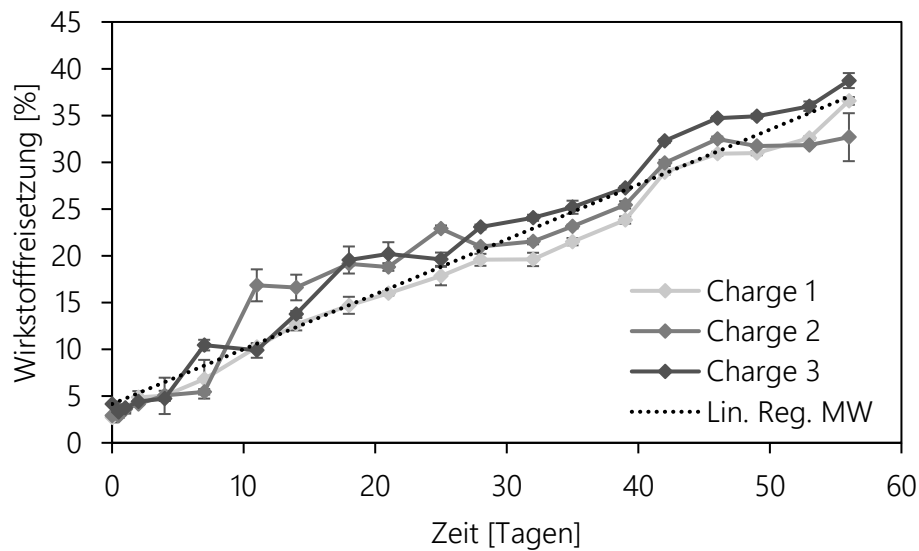


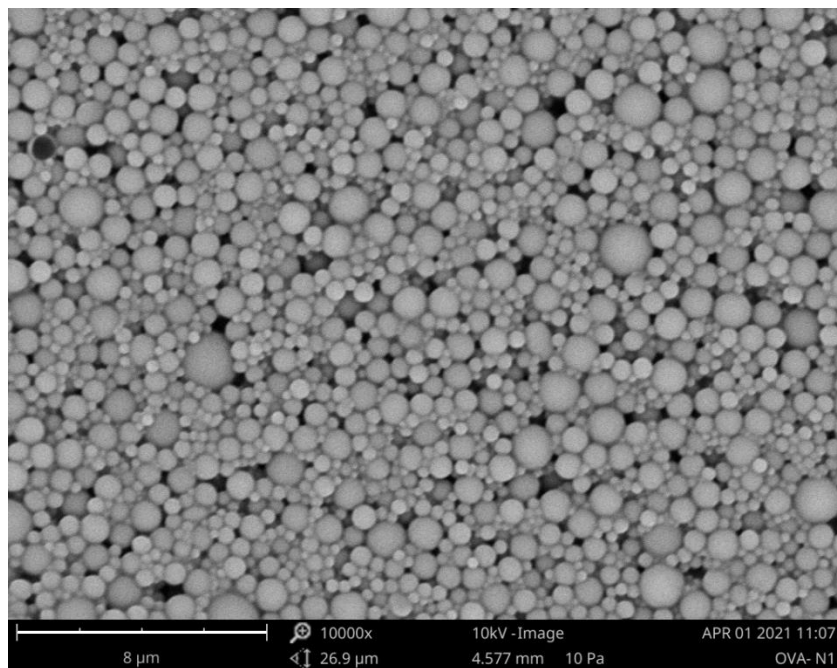
Abbildung 5-23: *In vitro* Freisetzung von Ovalbumin aus PLGA-NP, hergestellt mittels Parameter des Versuchspunktes UT(700;4,5), Beobachtungszeitraum von acht Wochen,  $n = 3$ , Fehlerbalken = SD und linearer Regression des Mittelwertes (Lin. Reg. MW)

Da nach acht Wochen erst  $36,0 \pm 3,1$  % des Ovalbumins freigesetzt waren, wurde kein vollständiges Freisetzungsprofil (bis 100 %) erstellt. Innerhalb des Beobachtungszeitraumes ist die Freisetzung linear mit einem  $R^2$  von  $0,969 \pm 0,030$ . Obwohl PLGA *in vivo* hydrolytisch abgebaut wird [113], ist diese Freisetzungsmethode keine genaue Vorhersage für eine *in vivo* Freisetzung, da nur mit einem pH-Wert von 7,4 gearbeitet wurde. Nach Aufnahme der Partikel in Makrophagen oder dendritische Zellen können die Partikel ins Lysosom gelangen, wo ein pH-Wert zwischen 4,5 bis fünf herrscht [114]. Für einen Vergleich der einzelnen Chargen untereinander ist die Freisetzung jedoch gut geeignet.

Die Freisetzungsprofile der drei Chargen haben einen sehr ähnlichen Verlauf und weisen einen Ähnlichkeitsfaktor von 77,1 für die Chargen 1 und 2, 75,1 für die Chargen 1 und 3 und 76,7 für die Chargen 2 und 3 auf (Abbildung 5-23). Dementsprechend sind die Chargen untereinander äquivalent [115].

#### 5.1.7.4 Partikelvisualisierung

Auch wenn die Partikelform nicht in den QTTP definiert ist, wurde die Charge im Rahmen der weiteren Untersuchungen zusätzlich visuell betrachtet. Dafür wurden von der aufgereinigten Nanopartikelsuspension wie in Kapitel 0 beschrieben REM-Aufnahmen gemacht. In Abbildung 5-24 erkennt man gut die runden PLGA-Partikel, die eine gewisse Größenverteilung aufweisen. Die REM-Ausnahme bestätigt die Ergebnisse der mittleren Partikelgröße und des PDI, die mittels Zetasizer erzeugt wurden.



*Abbildung 5-24: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme des Versuchspunktes UT(700;4,5) nach Aufreinigung; 10000-fache Vergrößerung, mit Gold beschichtet, vermessen bei einer Arbeitsspannung von 10 kV, Balken  $\pm 8 \mu\text{m}$*

### 5.1.8 Auswertung PLGA-Nanopartikel-Herstellung

In diesem Kapitel wurden zwei Herstellvarianten untersucht, mit denen ovalbuminhaltige PLGA-Nanopartikel hergestellt wurden. Mit der Variante, bei der der Ultra-Turrax® eingesetzt wurde, konnten Partikel mit einer mittleren Partikelgröße ab ca. 400 nm und bis zu über 1000 nm hergestellt werden. Bei der Variante, bei der mittels Ultraschalles homogenisiert wurde, entstanden Partikel mit einer mittleren Größe zwischen ungefähr 150 nm und knapp über 400 nm. Durch den Einsatz von zwei verschiedenen Homogenisatoren können dementsprechend Partikel mit mittleren Partikelgrößen zwischen 150 nm und 1000 nm generiert werden. Dies entspricht annähernd dem kompletten Größenbereich pharmazeutisch genutzter nanopartikulärer Träger. Die hergestellten Partikel können aufgrund ihrer Größe unterschiedliche Einsatzgebiete haben, da sie unterschiedliche Zellen und Gewebe erreichen und potenziell verschiedene physiologische Barrieren überwinden können. Wenn Partikel mit Proteingehalten über 4,5 % hergestellt werden sollen, ist die Ultraschallhomogenisator-Variante zu bevorzugen, durch die die Partikel mit über 40 % Protein beladen werden konnten. Die Partikelgrößenverteilung, bewertet mittels PDI, erwies sich als nicht kontrollierbar und nur in wenigen Fällen vorhersagbar. Durch die meisten Parameterkombinationen entstanden Partikel mit einem PDI kleiner 0,3, was im Allgemeinen als enge Partikelgrößenverteilung bezeichnet wird.

Die Einflussfaktoren, die in den Screening-Versuchsplänen große Effekte erzielt haben und zusätzlich gut einstellbar waren, wurden in Wirkungsflächenversuchsplänen genauer untersucht und im Anschluss dazu genutzt Partikel mit vorher definierten Eigenschaften herzustellen. Bei der Herstellung mittels Ultra-Turrax® lagen alle Zielgrößen der optimierten Parameterkombinationen innerhalb ihres 95 %-Konfidenzintervalls. Bei der Ultraschallhomogenisator-Variante lagen PDI und Beladungseffizienz außerhalb dieser Grenzen. Da für beide Zielgrößen das  $R^2(\text{prog})$  gering war, konnte nicht von einer guten Vorhersagbarkeit ausgegangen werden.

Sowohl bei der Herstellungsmethode mittels Ultra-Turrax® als auch der mittels Ultraschall führten eine höhere OVA-Konzentration und eine geringere PLGA-Konzentration zu höheren Proteingehalten im Produkt. Da sich der Proteingehalt aus der Ovalbuminmasse im Partikel pro Gesamtmasse berechnet (Formel 4-4) ergibt sich daraus, dass unterhalb der Kapazitätsgrenze mit zunehmender eingesetzter Ovalbuminmenge auch der absolute Proteingehalt in den Partikeln ansteigt. Für beide Varianten war der Einfluss dieser zwei Faktoren auf die Beladungseffizienz gegensätzlich

zu ihrem Einfluss auf den Proteingehalt. Dementsprechend gilt für beide Varianten, je mehr Protein eingesetzt wird, desto geringer ist der Anteil, der in den Nanopartikeln verbleibt. Je mehr PLGA eingesetzt wird, desto mehr Protein kann auch verkapselt werden.

Die Beladungseffizienz und der Proteingehalt wurden bei der Ultra-Turrax®-Variante durch die Rührgeschwindigkeit zur Herstellung der inneren Emulsion positiv beeinflusst und bei der Ultraschall-Variante durch die Amplitude und Beschallungszeit der inneren Emulsion. Dementsprechend gilt für beide Methoden, je höher der Energieeintrag bei der Homogenisierung der zwei inneren Phasen ist, desto höher ist die Beladungseffizienz und dementsprechend auch der Proteingehalt. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass die innere Emulsion mit steigendem Energieeintrag an Stabilität zunimmt. Diese sind im anschließenden Emulgierschritt zur Herstellung der Doppelemulsion weniger anfällig für ein mechanisches Aufbrechen. Zudem führt ein höherer Energieeintrag während der Herstellung der inneren Emulsion zu feineren Tröpfchen der inneren wässrigen Phase. Wird beim Herstellen der Doppelemulsion ein W/O-Tröpfchen, das mehrere Tröpfchen der innersten Phase in sich trägt, zerteilt, würden dadurch nicht alle dieser innersten Tröpfchen zerstört. Wird ein Tröpfchen der innersten Phase im zweiten Homogenisierungsschritt zerstört, kann das darin enthaltene Protein in die äußere wässrige Phase diffundieren, was zu einer Reduktion des Proteingehaltes führt.

Ähnliches ließ sich für den Einfluss des Energieeintrags bei der Herstellung der Doppelemulsion auf die mittlere Partikelgröße beobachten. Bei der Ultra-Turrax®-Variante führte eine höhere Umdrehungsgeschwindigkeit zu kleineren Partikeln und analog führte die Homogenisierungsdauer bei der Ultraschall-Variante ebenso zu kleineren Partikeln. Dementsprechend führt in beiden Fällen ein höherer Energieeintrag bei der Homogenisierung der Doppelemulsion dazu, dass Partikel entstanden, die im Mittel eine geringere Größe aufwiesen.

Nur bei der Homogenisierung mittels Ultra-Turrax® konnte ein signifikanter Einfluss für die Stabilisator- und PLGA-Konzentration gezeigt werden. Im Rahmen des Wirkungsflächenversuchsplans und der im Anschluss hergestellten finalen Partikel konnte zusätzlich gezeigt werden, dass allein mit diesen zwei Faktoren die Partikelgröße gesteuert werden kann. Erhöht man die Stabilisatorkonzentration, führt dies oftmals zu kleineren Tröpfchen in der Emulsion und dementsprechend zu kleineren Partikeln nach der Lösungsmittel- evaporation. Ist die Polymerkonzentration hoch, entsteht aus einem Tröpfchen ein größeres Partikel als bei einem gleichgroßen Tröpfchen

mit geringerer Polymerkonzentration. Diese Effekte konnten mit den gewählten Faktorstufen bei der Ultraschall-Variante nicht gezeigt werden. Auch wenn es sein kann, dass beide Parameter einen Effekt haben, der vom Rauschen überdeckt wird, sind sie in dieser Versuchsvariante nicht geeignet, um die Partikelgröße zu steuern. Wie wichtig es ist, für jede Methode eine eigene Optimierung durchzuführen, die den entsprechenden Versuchsraum abdeckt, wird anhand dieser Ergebnisse noch einmal deutlich.

Wenn Partikel mit einer mittleren Größe über 300 nm mit zusätzlich hoher Proteinbeladung hergestellt werden sollen, kann eine kombinierte Methode genutzt werden, bei der die innere Phase mittels Ultraschallhomogenisator und die Doppelemulsion mittels Ultra-Turrax® hergestellt werden. Um gezielt Partikel mit entsprechenden Eigenschaften herzustellen, sollte eine eigene Optimierung erfolgen. Für ein erstes Abschätzen von geeigneten Faktorstufen erwies sich das Berechnen mittels Screening-Regressionsgleichungen als nützlich. Die Parameterkombinationen, die mittels Rechenvariante 1 berechnet wurden, konnten bereits gute Ergebnisse für den Proteingehalt erzeugen. Die mittlere Partikelgröße war in allen Fällen höher als berechnet, wich aber in zwei Fällen nur um ca. 10 % ab. Das Homogenisieren der inneren Phase hat bei diesem Versuchsaufbau anscheinend einen Einfluss auf die Partikelgröße. Dies deckt sich mit den Ergebnissen des Screening-Versuchsplans der Ultraschall-Variante, bei der eine längere Beschallungszeit der inneren Phasen zu größeren Partikeln geführt hat.

In Abbildung 5-25 und Abbildung 5-26 wurden die Ergebnisse der neun Chargen, die drei unterschiedliche mittlere Partikelgrößen (250 nm; 500 nm und 700 nm) mit je drei unterschiedlichen Proteingehalten (4,5 %, 20 % und 40 %) aufweisen sollten, noch einmal zusammenfassend dargestellt. Von den Chargen der kombinierten Methode wurden die Chargen gewählt, die am nächsten an den Zielwerten lagen. Um alle neuen Kombinationen zielsicher herzustellen, müsste die kombinierte Methode optimiert werden und der Versuchspunkt US(250;4,5) neu berechnet werden.

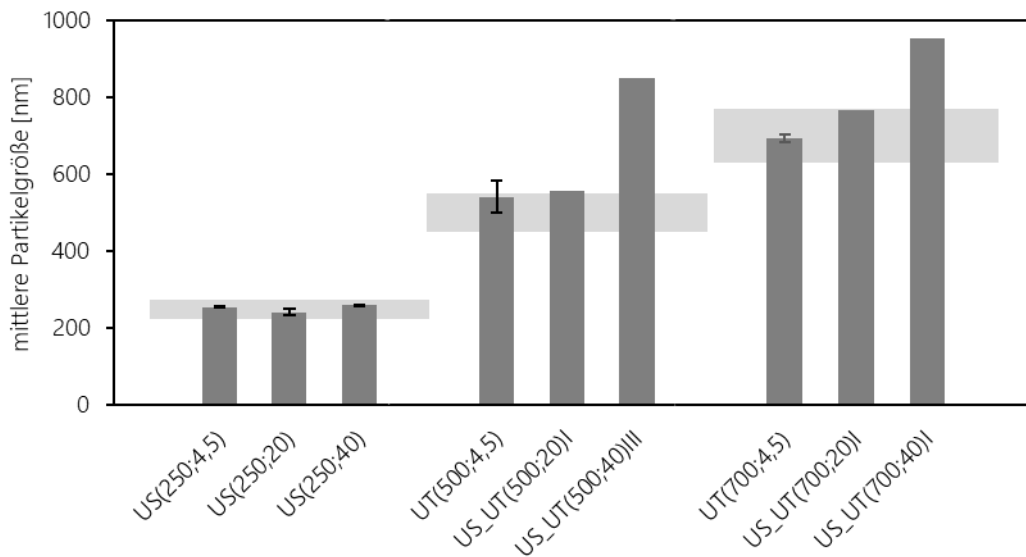


Abbildung 5-25: mittlere Partikelgrößen der neun Versuchspunkte, hergestellt mit den drei verschiedenen Herstellungsmethoden, grauer Balken = Zielwert  $\pm 10\%$ ,  $n = 3$  und  $n = 1$  (s.o.), Fehlerbalken = SD

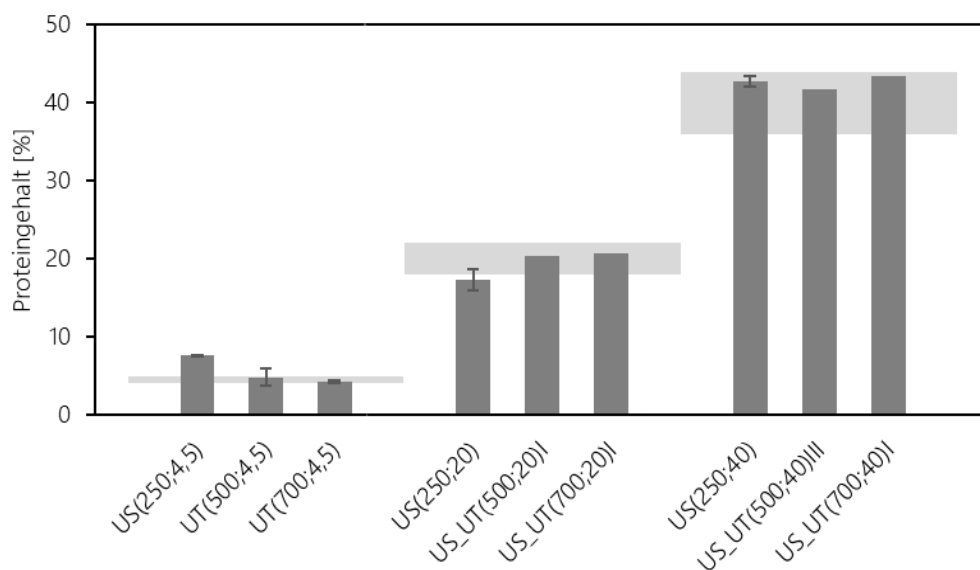


Abbildung 5-26: Proteingehalt der neun Versuchspunkte, hergestellt mit den drei verschiedenen Herstellungsmethoden, grauer Balken = Zielwert  $\pm 10\%$ ,  $n = 3$  und  $n = 1$  (s.o.), Fehlerbalken = SD

Die Anforderungen aus dem Qualitätszielproduktprofil an die Redispergierbarkeit, die Stabilität und die Freisetzung wurden von den Chargen UT(700;4,5) erfüllt.

Durch das Untersuchen dieser beide Herstellungsvarianten konnten ähnliche empirische Zusammenhänge zwischen Prozessparametern und kritischen Qualitätsmerkmalen gezeigt werden. Beide Varianten beruhen auf ähnlichen physikalischen Prinzipien, da in beiden Fällen eine Emulsion durch Energieeintrag stabilisiert wird. Trotzdem wirkt sich die Art der Homogenisierung deutlich auf die resultierende Partikelgröße und den Proteingehalt aus. Dies ist wahrscheinlich auf die unterschiedlichen Mechanismen der Energieübertragung zurückzuführen. Während bei der Rotor-Stator-Homogenisierung (Ultra-Turrax®) die Energie hauptsächlich über makroskopische Scherkräfte eingetragen wird, führt der Ultraschallhomogenisator zusätzlich zu Kavitation. Beim Kollabieren der Kavitationsbläschen entstehen lokal extrem hohe Drücke und Scherkräfte, die in diesem Ausmaß nicht durch reine mechanische Scherung verursacht werden können. Diese intensiven lokalen Effekte führen zu einer effektiven Zerkleinerung der Tröpfchen und somit zu kleineren Partikeln und einer effizienteren Proteinverkapselung.

#### 5.1.9 Fazit der PLGA-Nanopartikel Entwicklung

Die Entwicklung der ovalbuminhaltigen PLGA-Nanopartikel basierte auf einem definierten Qualitätszielproduktprofil. Um dieses QTPP zu erreichen, erwies sich die Anwendung von statistischen Versuchsplänen als vorteilhaft, da diese es als empirische Modelle ermöglichen, den Effekt einzelner Faktoren zu erkennen. Ein Nachteil dieses Vorgehens ist, dass ein kausaler Zusammenhang nicht nachgewiesen werden kann. In vielen Fällen lässt sich ein kausaler Zusammenhang jedoch herleiten. Für den Fall, dass sich die Zusammenhänge nicht durch bekannte physikalische Prinzipien erklären lässt, liefern die Erkenntnisse aus statistischen Versuchsplänen dennoch eine Vielzahl neuer Hypothesen, die in weiteren Versuchen widerlegt oder bestätigt werden können. Besonders nützlich sind statistische Versuchspläne bei der Optimierung von Produkten. Bei der Optimierung der PLGA-Partikel gelang es, die beiden wichtigsten CQA weitgehend unabhängig voneinander zu steuern, wodurch Partikel hergestellt werden konnten, die sich in ihren Eigenschaften an den Bedarf anpassen ließen.

## 5.2 Entwicklung von Chitosan-Carboxymethylcellulose-Nanopartikeln mittels ionischer Gelierung

Für die Herstellung von ovalbuminbeladenen Chitosan-Carboxymethylcellulose-Nanopartikeln wurde die Herstellungsmethode von Heidland adaptiert [85]. Die von Heidland entwickelte Herstellungsmethode wurde untersucht und optimiert, sodass Nanopartikel mit vorher definierten Eigenschaften hergestellt werden können, was in diesem Kapitel erläutert wird.

### 5.2.1 Ziel der Entwicklung und Definition des Zielproduktes

Ziel der Entwicklung ist es, OVA-beladene Chitosan-CMC-Nanopartikel mit unterschiedlichen Partikelgrößen zwischen 200 und 700 nm, sowie verschiedenen Proteingehalten zwischen 5 % und 30 % herzustellen. Dieser gewählte Partikelgrößen- und Proteingehaltsbereich soll einen Großteil der pharmazeutisch genutzten Nanopartikel abbilden. Zudem sollen die Herstellungsmethode und ausgewählte Einflussfaktoren (Prozessparameter) untersucht werden. Das dadurch gewonnene Prozessverständnis soll dabei helfen, in einem späteren Teil dieser Arbeit die verschiedenen Herstellungsmethoden miteinander vergleichen zu können.

### 5.2.2 Auswahl der Zielgrößen und der zu untersuchenden Prozessparameter

Wie bereits in Kapitel 5.1.2 beschrieben, sind die Partikelgröße, Partikelgrößenverteilung und der Proteingehalt die wichtigsten Merkmale von nanopartikulären Trägern, denn diese Eigenschaften bestimmen maßgeblich ihre Pharmakokinetik und damit die Wirksamkeit des Produktes. Die mittlere Partikelgröße und der PDI wurden mittels DLS bestimmt. Der Proteingehalt der Nanopartikel kann aus der eingesetzten Proteinmenge und der Proteinkonzentration des Überstandes nach Abzentrifugieren der Nanopartikel errechnet werden, die mittels BCA-Assay bestimmt wird. Zusätzlich wird die Beladungseffizienz nach Formel 4-5 berechnet. Nanosuspensionen, die mittels ionischer Gelierung hergestellt werden, können elektrostatisch stabilisiert werden.

Um die Herstellungsmethode genauer zu untersuchen und um die Eigenschaften des Produktes zu verändern, wurden ausgewählte Prozessparameter und die Formulierung variiert, die möglicherweise einen großen Einfluss auf das Endprodukt haben. Das Verändern der Temperatur der beiden Lösungen sollte einen Einfluss auf die Wechselwirkungshäufigkeit der einzelnen Moleküle haben, da eine höhere Temperatur zu einer gesteigerten Bewegung der Teilchen führt, was die Wahrscheinlichkeit von Kollisionen mit ausreichender Energie erhöht [116]. Dadurch, dass es zu

mehreren Kollisionen in kurzer Zeit kommt, können mehrere Keimpartikel entstehen, was zu mehr aber kleineren Nanopartikeln führen kann. Es kann aber auch sein, dass größere porösere Partikel entstehen. Zudem wird durch die Temperatur das thermodynamische Gleichgewicht beeinflusst. Ein Erhöhen der Temperatur kann dementsprechend einen Einfluss auf die Partikelgröße, die Partikelgrößenverteilung und die Proteinbeladung haben und je nach System kann dies zu einer Verbreiterung der Partikelgrößenverteilung und zu Veränderungen in der Proteinbeladung führen. Eine Erhöhung der Polymerkonzentration, also der Konzentration von Chitosan und CMC sollte ebenfalls die Wahrscheinlichkeit steigern, dass zwei Moleküle aufeinandertreffen und in Wechselwirkung treten können. Erhöht man die Konzentration des Proteins kann sich auch mehr Protein an der Reaktion beteiligen und so zu einer höheren Beladung führen. Da bei der ionischen Gelierung Partikel aufgrund von ionischen Wechselwirkungen der einzelnen Polymerstränge entstehen, sollte eine Veränderung des pH-Wertes einen großen Einfluss auf Reaktionen haben. Je nach pH-Wert sind die Polymerstränge unterschiedlich stark positiv oder negativ geladen. Auch eine Erhöhung der Chitosan-Kettenlänge kann zu größeren Partikeln führen, da eine längere Kette mehr reaktive Stellen hat, mit denen das Gegenion interagieren kann.

### 5.2.3 Ladung der Polymere in Abhängigkeit zum pH-Wert

Bei der ionischen Gelierung spielt die Ladungsdichte der Polymerstränge eine ausschlaggebende Rolle. Da beide Polymere funktionelle Gruppen enthalten, die als Säure bzw. Base fungieren, wird die Menge der positiven und negativen Ladungen der Polymere maßgeblich durch den pH-Wert der Lösung bestimmt. Nur wenn beide Polymere ausreichend geladen sind, können sie in entsprechender Menge an der Reaktion der ionischen Gelierung teilnehmen. Um einschätzen zu können, welcher pH-Wert-Bereich für die Reaktion geeignet ist, wurde ein Vorversuch durchgeführt. Ziel war es, ein Maß für die Stärke der Ladung in Abhängigkeit von dem pH-Wert zu bekommen. Dafür wurden die beiden unterschiedlichen Chitosane (90/20 und 90/200) und das verwendete Na-CMC gelöst und im Anschluss der pH-Wert der Lösungen mit Natriumhydroxid und Essigsäure eingestellt. Dann wurde das Zeta-Potential mittels Zetasizer bestimmt.

Die Zeta-Potentiale der hergestellten Lösungen sind in Abbildung 5-27 zusammenfassend dargestellt. Chitosan ist nur bis zu einem pH-Wert von ca. 5,5 löslich, weshalb die Bestimmung des Zeta-Potentials durch diesen pH-Wert limitiert wurde. In Abbildung 5-27 kann man gut erkennen, dass je höher der pH-Wert der Lösung war, desto geringer war das Zeta-Potential des Chitosans

bzw. desto weniger Aminogruppen waren positiv geladen. Im Gegensatz dazu steigt die Menge der negativ geladenen Carboxygruppen der CMC bei steigendem pH-Wert bis zu einem Wert von sieben an. Bei einem pH-Wert von drei hat sich das Zeta-Potential mit einem Wert von ca. -8 mV einem neutralen Wert angenähert. Es kann davon ausgegangen werden, dass bei geringeren pH-Werten nicht mehr viele Ladungen vorhanden sind, die in Wechselwirkung mit dem Chitosan treten können.

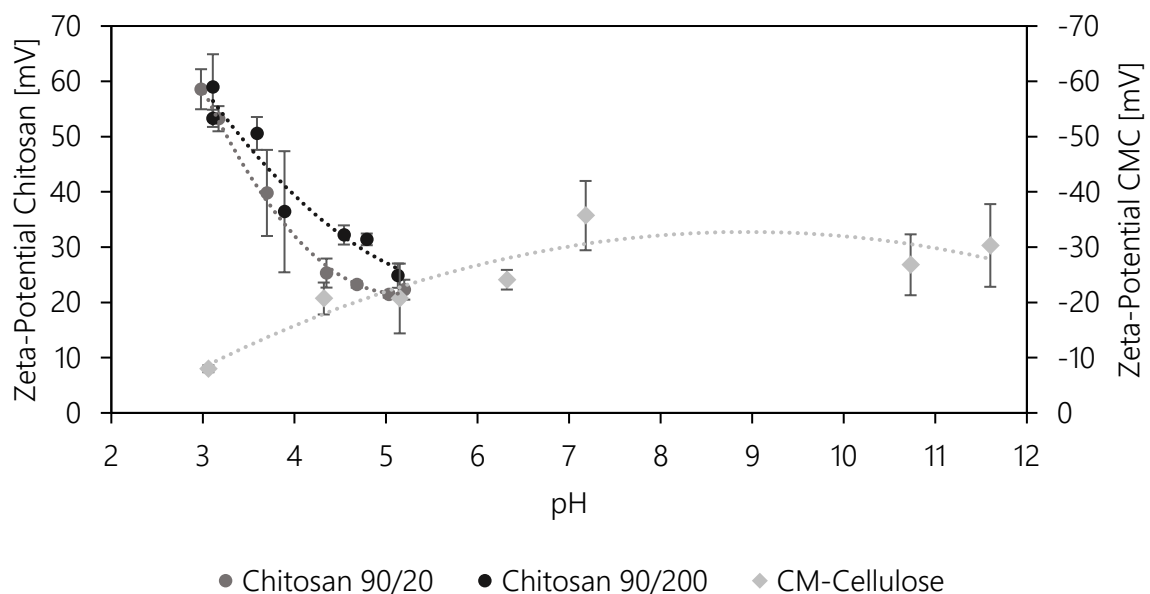


Abbildung 5-27: Zeta-Potential von Chitosan 90/20, Chitosan 90/200 und Carboxymethylcellulose (CM-Cellulose) in Abhängigkeit vom pH-Wert der Lösung;  $n = 3$ , Fehlerbalken = SD

#### 5.2.4 Identifikation der signifikanten Parameter mittels Screening-Versuchsplan

Durch einen Screening-Versuchsplan können aus einer Auswahl von Parametern diejenigen identifiziert werden, die einen signifikanten Einfluss auf die Zielgrößen haben. Zudem kann ermittelt werden, in welche Richtung jeder Parameter eine Zielgröße beeinflusst. Für die fünf Parameter, die im praktischen Versuchsteil mittels definitiven Screening-Versuchsplan untersucht werden sollen, mussten zuerst die Faktorstufen festgelegt werden (Tabelle 5-25). Um zu verhindern, dass das Protein denaturiert, wurde die Temperatur nur zwischen 15 °C und 30 °C variiert. Dieser Bereich deckt zudem mögliche Temperaturschwankungen eines Labors ab. Sollte kein Effekt vorhanden sein, müsste die Raumtemperatur nicht regelmäßig überprüft werden. Da Chitosan nur bei pH-Werten unter 5,5 löslich ist, wurde ein pH-Wert von fünf als obere Grenze gewählt. Bei einem pH-Wert unter drei ist die CM-Cellulose kaum noch geladen (Abbildung 5-27) und würde

vermutlich nicht in ausreichender Menge an einer Reaktion teilnehmen. Dieser Wert wurde dementsprechend als untere Grenze gewählt. Die Chitosan-Qualitäten wurden so ausgewählt, dass eine hohe und eine niedrige Kettenlänge untersucht wurden. Der Deacetylierungsgrad wurde nicht variiert, da die Auswahl an verfügbaren Chitosanen keine gleichzeitige Variation der Kettenlänge und des Deacetylierungsgrades zuließ, die sich zudem sinnvoll in einem statistischen Versuchsplan auswerten ließen. Alle Konzentrationen wurden im Bereich von 0,1 % bis 1,9 % variiert, was für diese Reaktionsart ein gängiges Spektrum darstellt. Höhere Konzentrationen führten teilweise zu Polymerfäden statt zu Partikeln, was möglicherweise an einer zu hohen Viskosität lag.

*Tabelle 5-25: Parametereinstellung des definitiven Screening-Versuchsplans zur Untersuchung der Herstellungsmethode von OVA-beladenen Chitosan-CMC-Nanopartikeln mittels ionischer Gelierung*

Parameter	Tief	Mittel	Hoch
Temperatur [°C]	15	22,5	30
pH	3	4	5
c (Chito;CMC) [%]	0,1	1	1,9
c (OVA) [%]	0,1	1	1,9
Chitosan-Qualität	90/20	-	90/200

Für die gewählten Parameter und zugehörigen Faktorstufen wurde mittels der Minitab 18 Software ein randomisierter definitiver Screening-Versuchsplan erstellt (Tabelle 5-26). Die Nanopartikel-Suspensionen wurden in der vorgegebenen Reihenfolge hergestellt und analysiert.

Tabelle 5-26: Parametereinstellungen und Ergebnisse der Zielgrößen des definitiven Screening-Versuchsplans zur Untersuchung der Herstellungsmethode von OVA-beladenen Chitosan-CMC-Nanopartikeln mittels ionischer Gelierung

Probe	Parameter					Zielgröße			
	T [°C]	pH	c (Chito;CMC) [%]	c (OVA) [%]	Chitosan-Qualität	DZ [nm]	PDI	LE [%]	PG [%]
1	30	5	0,1	0,1	90/200	210,6	0,187	46,67	19,55
2	15	5	0,1	1	90/20	510,9	0,362	5,94	23,63
3	22,5	4	1	1	90/20	290,1	0,118	10,05	5,02
4	22,5	3	0,1	0,1	90/20	161,7	0,258	39,43	17,34
5	30	4	1,9	0,1	90/20	383,7	0,201	55,56	1,52
6	22,5	4	1	1	90/200	498,9	0,264	11,04	5,49
7	15	4	0,1	1,9	90/200	206,1	0,283	10,30	50,75
8	30	3	1,9	1	90/200	1272,3	0,484	15,22	4,09
9	15	5	1,9	0,1	90/200	1680,7	0,889	43,89	1,19
10	30	3	0,1	1,9	90/20	302,7	0,706	11,37	53,47
11	30	5	1	1,9	90/20	232,9	0,104	3,09	2,96
12	22,5	5	1,9	1,9	90/200	1101,7	0,779	4,36	2,22
13	15	3	1,9	1,9	90/20	573,0	0,295	12,91	6,43
14	15	3	1	0,1	90/200	1610,7	0,530	23,97	1,26

Die hergestellten Partikel wiesen eine mittlere Partikelgröße zwischen 161 nm und 1680 nm auf und decken damit den pharmazeutisch genutzten Partikelgrößenbereich zum größten Teil ab. Der PDI schwankte zwischen 0,104 und 0,889, aber nur wenige Werte lagen oberhalb der 0,5-Grenze, welche auf eine sehr weite Partikelgrößenverteilung hinweist [96]. Der Proteingehalt der Produkte lag zwischen ca. 1 % und 50 % und deckte damit einen sehr breiten und gut nutzbaren Bereich ab. Die Beladungseffizienz lag zwischen 3 % und 55 %.

Der Screening-Versuchsplan wurde wie beschrieben für jede Antwortvariable analysiert und die wichtigsten Kennzahlen wurden in Tabelle 5-27 zusammengefasst. Für die mittlere Partikelgröße, die Beladungseffizienz und den Proteingehalt konnten signifikante Modelle mit einem p-Wert kleiner 0,05 berechnet werden. Für den PDI konnte kein Modell berechnet werden, da im ausgeführten Versuchsplan kein Parameter einen Einfluss auf den PDI hatte, der nicht vom Rauschen überdeckt wurde. Wie bereits bei der Herstellung der PLGA-Nanopartikel erweist sich der PDI als schlecht kontrollierbar.

*Tabelle 5-27: P-Werte der Parameter für die jeweiligen Antwortvariablen und Modellzusammenfassung des definitiven Screening-Versuchsplans zur Untersuchung der Herstellungsmethode von OVA-beladenen Chitosan-CMC-Nanopartikeln mittels ionischer Gelierung nach Rückwärtselimination;  $\alpha$  für Ausschluss = 0,1; \*\* = ohne Wert, da das Modell keine Terme enthält*

Antwort Variable \ Parameter	D <sub>z</sub>	PDI	LE	PG
Temperatur [°C]	nicht signifikant	nicht signifikant	nicht signifikant	nicht signifikant
pH	nicht signifikant	nicht signifikant	nicht signifikant	nicht signifikant
c (Chito;CMC) [%]	0,027	nicht signifikant	nicht signifikant	0,001
c (OVA) [%]	nicht signifikant	nicht signifikant	<0,001	0,052
Chitosan-Qualität	0,033	nicht signifikant	nicht signifikant	nicht signifikant
p-Wert des Modells	0,009	**	<0,001	0,002
S	379,8 nm	**	10,29 %	10,8848 &
R <sup>2</sup> [%]	57,66	**	68,84	68,17
R <sup>2</sup> (prog) [%]	32,76	**	58,09	47,08

Die Haupteffekte für die jeweiligen Antwortvariablen sind Abbildung 5-28 dargestellt.

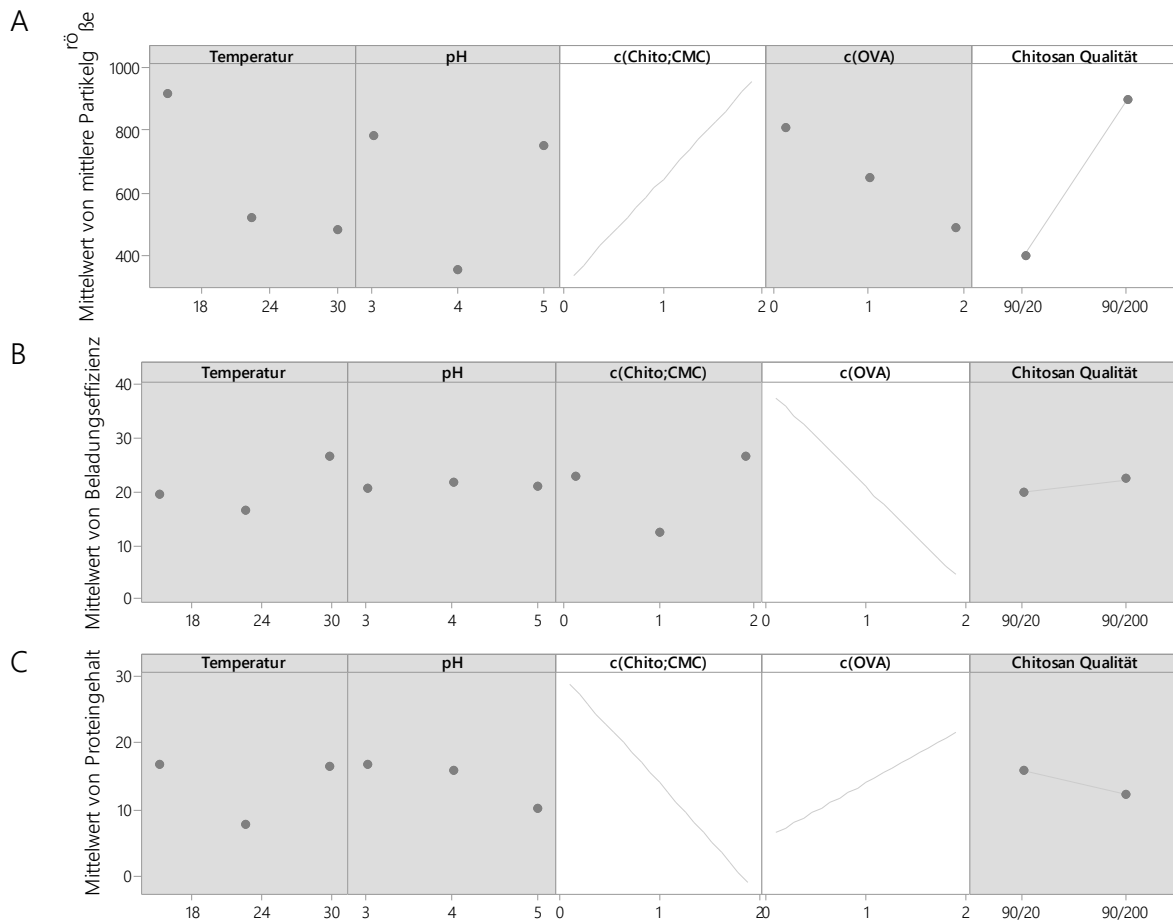


Abbildung 5-28: Haupteffektdiagramme für die mittlere Partikelgröße (A), Beladungseffizienz (B) und Proteingehalt (C) des definitiven Screening-Versuchsplan zur Untersuchung der Herstellungsmethode von OVA-beladenen Chitosan-CMC-Nanopartikeln mittels ionischer Gelierung; nicht im Modell enthaltene Terme sind grau hinterlegt

Die Konzentration der Polymere hatte einen signifikanten Einfluss auf die mittlere Partikelgröße (Tabelle 5-27). Je höher die Polymerkonzentration war, desto größer wurden die Partikel (Abbildung 5-28 A). Wenn Chitosan 90-200 eingesetzt wurde, entstanden signifikant größere Partikel als bei der Verwendung von Chitosan 90-20. Daraus kann man schließen, dass kürzere Polymerketten kleinere Partikel bilden und längere Chitosane größere Partikel bilden.

Ausschließlich die eingesetzte Ovalbumin-Konzentration hatte einen signifikanten Effekt auf die Beladungseffizienz. Je höher die OVA-Konzentration war, desto geringer war der Anteil, der in den Partikeln verblieben ist. Auffällig ist, dass eine Veränderung des pH-Wertes in diesem Versuchssetting keinen signifikanten Einfluss auf die Beladungseffizienz hatte. Alle drei getesteten

pH-Werte führten im Mittel zu einer Beladungseffizienz von ca. 20 % (Abbildung 5-28 B). Je weiter der pH-Wert der Lösung vom isoelektrischen Punkt (pH 4,7) des Ovalbumin entfernt liegt, desto mehr geladene Gruppen sollte das Ovalbumin aufweisen [117]. Daher wäre die höchste Beladung bei einem pH-Wert von drei zu erwarten. Da der pH-Wert zusätzlich Einfluss auf die Ladungen der Polymere hat, kann es sein, dass sich diese Effekte gegenseitig aufheben. Zudem kann der pH-Wert in diesem komplexen System schwer isoliert betrachtet werden, da das resultierende Ladungsmuster durch das Zusammenspiel aller beteiligten Komponenten bestimmt wird.

Wie bereits bei den PLGA-Nanopartikeln führt eine höhere Konzentration des Proteins zu einem insgesamt höheren Proteingehalt im Partikel (Abbildung 5-28 C). Wurde hingegen die Konzentration der Polymere erhöht, wurde der Anteil an Protein geringer und der Proteingehalt sank.

Da weder die Temperatur noch der pH-Wert einen signifikanten Einfluss auf eine der Zielgrößen hatten, waren sie nicht geeignet, um die Eigenschaften der Partikel zu steuern und werden daher im folgenden Versuchsplan nicht berücksichtigt. Um die Partikelgröße und den Proteingehalt unabhängig voneinander steuern zu können, müssten laut Tabelle 5-27 das Variieren des Ovalbumingehaltes und die Chitosan-Qualität ausreichen. Da es sich bei der Chitosan-Art jedoch um einen qualitativen Faktor handelt, der daher nicht stufenlos einstellbar ist, kann man mit ihm nur den Größenbereich vorgeben. Um die Partikelgröße genau einstellen zu können, sollte die Konzentration von Chitosan und CMC mit im Wirkungsflächen-Versuchsplan berücksichtigt werden.

### 5.2.5 Weitere Optimierung mittels Wirkungsflächenversuchsplan

Mit den drei Parametern (Polymerkonzentration, Ovalbumin-Konzentration und Chitosan Qualität), die einen signifikanten Einfluss auf mindestens eine der Zielgrößen hatten, wurde im Anschluss ein zentral-zusammengesetzter Versuchsplan erstellt. Die Faktorstufen orientieren sich an den Faktorstufen des Screening-Versuchsplans, da die entstandenen Partikelgrößen und Proteingehalte bereits einen passenden Bereich abgedeckt haben. Da die Konzentrationen weder negativ sein können, noch zu nah bei null liegen sollen, wurde  $\alpha'$  auf 0,5 festgelegt. Dadurch liegen die Sternpunkte zwischen den Zentral- und Eckpunkten. Alle gewählten Faktorstufen sind in Tabelle 5-28 aufgelistet. Der pH-Wert und die Temperatur wurden nicht variiert, da sie im Screening-Versuchsplan keinen Einfluss auf die Zielgrößen gezeigt haben. Um die Versuchsdurchführung einfach zu halten, wurde die Temperatur der Lösungen nahe der Raumtemperatur auf  $22,5 \pm 0,5$  °C eingestellt. Der pH-Wert der Chitosan-Lösung wurde nicht verändert und lag daher bei einem pH von  $3 \pm 0,1$ .

*Tabelle 5-28: Parametereinstellung des zentral-zusammengesetzten Versuchsplans zur Untersuchung der Herstellungsmethode von OVA-beladenen Chitosan-CMC-Nanopartikeln mittels ionischer Gelierung*

Parameter	- $\alpha'$	Tief	Mittel	Hoch	+ $\alpha'$
c (Chito;CMC) [%]	0,55	0,1	1	1,9	1,45
c (OVA) [%]	0,55	0,1	1	1,9	1,45
Chitosan Qualität	-	90/20	-	90/200	-

Durch Ausführen des Versuchsplans entstanden Partikel mit einer mittleren Partikelgröße zwischen 34,1 nm und 2096,3 nm und einem PDI zwischen 0,137 und 0,836 (Tabelle 5-29). Bei genauerem Betrachten der Werte fällt auf, dass nur die kleinsten und größten entstandenen Partikel einen PDI über 0,5 haben. Alle Partikel zwischen 96,9 nm und 1234,7 nm wiesen einen PDI geringer als 0,5 auf. Diese Partikel decken den Größenbereich von pharmazeutischen nanopartikulären Trägern von 100 bis 1000 nm komplett ab, ohne eine breite Partikelgrößenverteilung aufzuweisen. Die Beladungseffizienz betrug maximal 25 % und der Proteingehalt maximal 60 %.

*Tabelle 5-29: Einstellungen und Ergebnisse des zentral-zusammengesetzten Versuchsplans zur Untersuchung der Herstellungsmethode von OVA-beladenen Chitosan-CMC-Nanopartikeln mittels ionischer Gelierung*

Probe	Parameter			Zielgröße			
	c (Chito;CMC) [%]	c (OVA) [%]	Chitosan-Qualität	Dz [nm]	PDI	LE [%]	PG [%]
1	1	1	90/20	282,6	0,161	17,46	8,14
2	1	1	90/20	280,2	0,150	16,95	7,92
3	0,1	0,1	90/200	128,0	0,332	11,81	5,65
4	1,9	0,1	90/200	2096,3	0,539	13,93	0,37
5	1	1	90/200	600,0	0,327	25,34	11,39
6	1,45	1	90/20	410,1	0,175	19,21	6,30
7	0,55	1	90/200	330,4	0,272	17,31	13,77
8	1	1,45	90/200	572,7	0,285	11,07	7,53
9	0,1	0,1	90/20	96,9	0,382	12,27	5,86
10	1	1	90/200	623,3	0,276	9,59	4,64
11	1	0,55	90/20	294,3	0,145	17,62	4,69
12	1	1	90/200	616,0	0,292	14,27	6,75
13	1,9	0,1	90/20	693,3	0,287	1,79	0,05
14	1	1	90/20	292,1	0,137	18,01	8,37
15	0,1	1,9	90/20	180,2	0,326	15,46	59,83
16	1	1,45	90/20	283,9	0,149	11,34	7,70
17	1	1	90/20	288,0	0,161	14,60	6,89
18	1	1	90/200	620,0	0,302	20,82	9,55
19	1	1	90/200	634,9	0,324	14,79	6,98
20	1	0,55	90/200	689,4	0,294	22,52	5,91
21	0,1	1,9	90/200	34,1	0,836	10,02	49,13
22	1	1	90/20	289,6	0,137	14,68	6,93
23	1,9	1,9	90/20	444,6	0,208	9,35	4,53
24	0,55	1	90/20	200,0	0,169	23,29	17,69
25	1,45	1	90/200	965,4	0,374	16,50	5,46
26	1,9	1,9	90/200	1234,7	0,449	8,89	4,32

Der Versuchsplan wurde für alle Antwortvariablen analysiert und die wichtigsten Kennzahlen in Tabelle 5-30 zusammengefasst. Auch wenn der p-Wert aller Modelle unter 0,05 liegt, wiesen die errechneten Modelle für den PDI und die Beladungseffizienz Mängel auf. Das Modell für den PDI ist mit einem  $R^2(\text{prog})$  von 35,61 % nicht gut für Vorhersagen zukünftiger Werte geeignet. Die Beladungseffizienz weist insgesamt ein geringes  $R^2$  auf. Das bedeutet, ein Großteil der Streuung wird nicht durchs Modell erklärt, bzw. die Modellfaktoren hatten einen deutlich geringeren Einfluss auf die Beladungseffizienz als die natürliche Streuung durch z.B. unkontrollierte Einflussvariablen.

*Tabelle 5-30: P-Werte der linearen und quadratischen Terme und Wechselwirkungen für die jeweiligen Antwortvariablen sowie Modellzusammenfassung nach Rückwärtselimination;  $\alpha$  für Ausschluss = 0,1;*

Parameter \ Antwort Variable	D <sub>z</sub>	PDI	LE	PG
c (Chito;CMC)	< 0,001	0,085	nicht signifikant	< 0,001
c (OVA)	< 0,001	0,158	0,171	< 0,001
Chitosan Qualität	< 0,001	0,000	nicht signifikant	nicht signifikant
c (Chito;CMC) * c (Chito;CMC)	< 0,001	0,000	nicht signifikant	< 0,001
c (OVA) * c (OVA)	nicht signifikant	nicht signifikant	0,005	< 0,001
c (Chito;CMC) * c (OVA)	< 0,001	0,002	nicht signifikant	< 0,001
c (Chito;CMC) * Chitosan Qualität	< 0,001	nicht signifikant	nicht signifikant	nicht signifikant
c (OVA) * Chitosan Qualität	0,001	0,009	nicht signifikant	nicht signifikant
p-Wert des Modells	< 0,001	< 0,001	0,006	< 0,001
S	70,75 nm	0,063	3,73 %	3,28 %
R <sup>2</sup> [%]	98,01	87,22	36,78	95,02
R <sup>2</sup> (prog) [%]	81,57	35,61	22,98	90,41

Die mittlere Partikelgröße war stark von der Konzentration der Polymere Chitosan und CMC abhängig (Abbildung 5-29 A). Bei hohen Konzentrationen entstanden größere Partikel, als wenn geringere Konzentrationen verwendet wurden. Dieser Zusammenhang ist nicht linear und steht in Wechselwirkung mit den anderen zwei Faktoren. Der Einfluss (die Steigung) der Polymerkonzentration ist bei Verwendung des langen Chitosan größer, als wenn das kurze Chitosan verwendet wurde (Abbildung 5-29 B). Bei hohen OVA-Konzentrationen ist dieser Einfluss geringer als bei niedrigeren Konzentrationen.

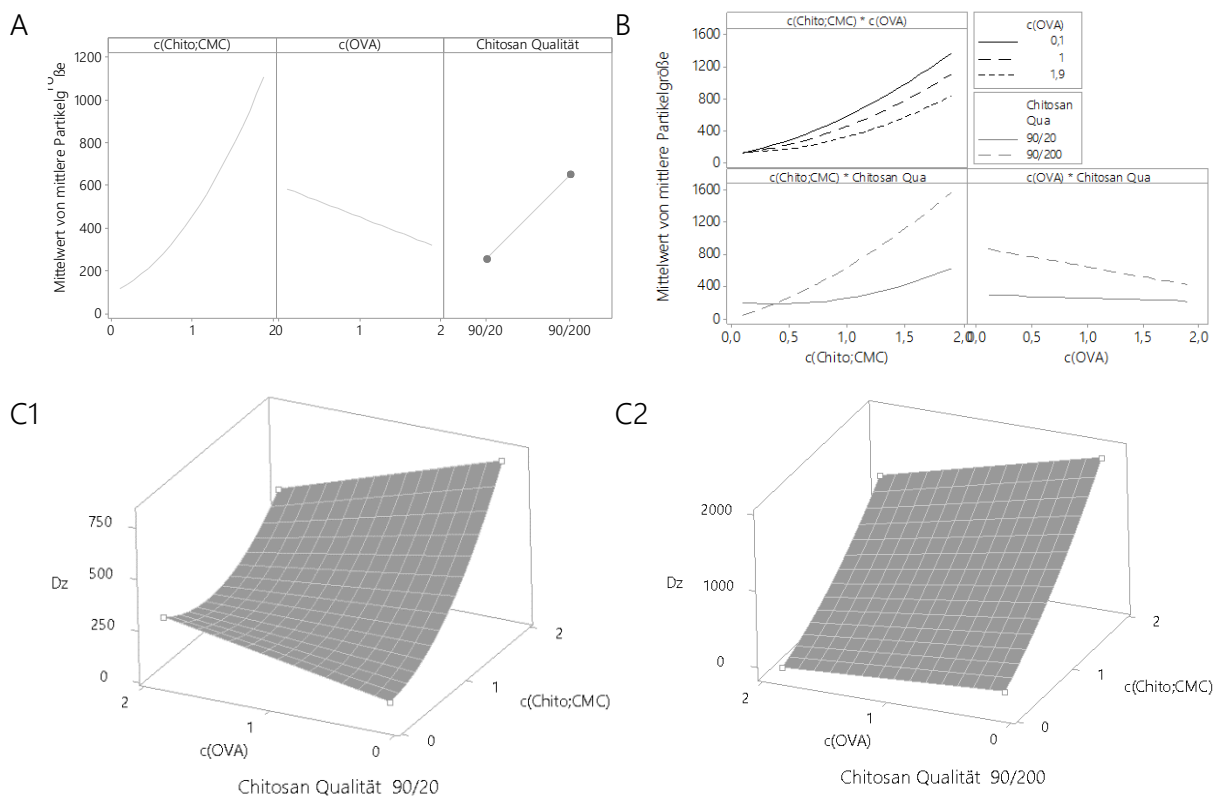


Abbildung 5-29: Einfluss der untersuchten Parameter auf die mittlere Partikelgröße ( $D_z$ ), dargestellt als Haupteffektdiagramm (A), Wechselwirkungsdiagramm (B) und Wirkungsfächendiagramme für Chitosan 90/20 (C1) und Chitosan 90/200 (C2)

Für den Einfluss der Ovalbumin-Konzentration auf die Partikelgröße konnte bereits im Screening-Design ein leichter Trend erkannt werden, der jedoch nicht signifikant war (Abbildung 5-28 A). Durch die höhere Auflösung des Wirkungsfächerversuchsplans konnte mit der Wahrscheinlichkeit des Konfidenzniveaus die Signifikanz dieses Effekts sowie von Wechselwirkungen mit der Chitosan-Qualität und der Polymerkonzentration nachgewiesen werden (Abbildung 5-29 A und B). Bei Verwendung des kurzketigen Chitosans verändert die OVA-Konzentration die Partikelgröße

kaum, während die Erhöhung der OVA-Konzentration beim Herstellen von NP aus dem langkettigen Chitosan zu kleineren Partikeln führt (Abbildung 5-29 B). Die Wechselwirkungen der OVA-Konzentration mit den anderen beiden Faktoren können ein Hinweis darauf sein, dass das Ovalbumin durch seine Ladungen in Konkurrenz zu der Reaktion zwischen Chitosan und CMC steht.

Wie bereits im Screening-Design gezeigt, bildete das kurze Chitosan kleinere Partikel und das längere Chitosan größere Partikel. Dieses Ergebnis deckt sich mit dem bereits von Heidland gezeigten Zusammenhang von Chitosan-Kettenlänge und Partikelgröße, der durch eine OFAT-Versuchsreihe mit Chitosanen mit Viskositäten von 10 mPas, 20 mPas, 50 mPas und 200 mPas gezeigt wurde [85]. Für das kurz-kettige Chitosan sind die bereits beschriebenen Wechselwirkungen deutlich geringer. Bei Verwendung des langkettigen Chitosans kann durch das Variieren der Polymerkonzentration eine Partikelgröße von unter 100 nm bis knapp 2000 nm erreicht werden.

Den größten Einfluss auf den PDI hat die Chitosan-Qualität. Nanopartikel aus dem längeren Chitosan hatten eine breitere Partikelgrößenverteilung als die Partikel, die aus Chitosan 90/20 hergestellt wurden. Möglicherweise hat das Chitosan 90/200 eine hohe Verteilung der Kettenlängen der einzelnen Polymereketten, die dann wiederum zu einer höheren Verteilung der Partikelgröße führt. Die mittlere Kettenlänge des Chitosans wird stellvertretend durch die Viskosität einer 1 %-igen Lösung angegeben. Einen Hinweis auf die Kettenlängenverteilung liefert dieser Wert jedoch nicht.

Im Mittel führte eine höhere OVA-Konzentration zu einer breiteren Partikelgrößenverteilung. Dieser Zusammenhang war von der Chitosan-Qualität und von der Polymerkonzentration abhängig, weist also zwei Wechselwirkungen auf. In Abbildung 5-30 C1 kann man die Wechselwirkung zwischen der OVA-Konzentration und der Polymerkonzentration gut erkennen. An der linken Kante des Diagramms sieht man eine positive Steigung, sprich bei geringer Polymerkonzentration führt eine Erhöhung der OVA-Konzentration zu einer Erhöhung des PDI. An der rechten Kante des Diagramms ist die Steigung negativ. Der Effekt auf den PDI, den die OVA-Konzentration bei hohen Polymerkonzentrationen hatte, ist umgekehrt. Möglicherweise ist dieses komplexe Zusammenspiel der verschiedenen Einflussfaktoren der Grund, warum sich der PDI für zukünftige Herstellungen schwer vorhersagen lässt. In allen Fällen wiesen Partikel, die bei einer 1 %-igen Polymerkonzentration hergestellt wurden, den geringsten PDI auf.

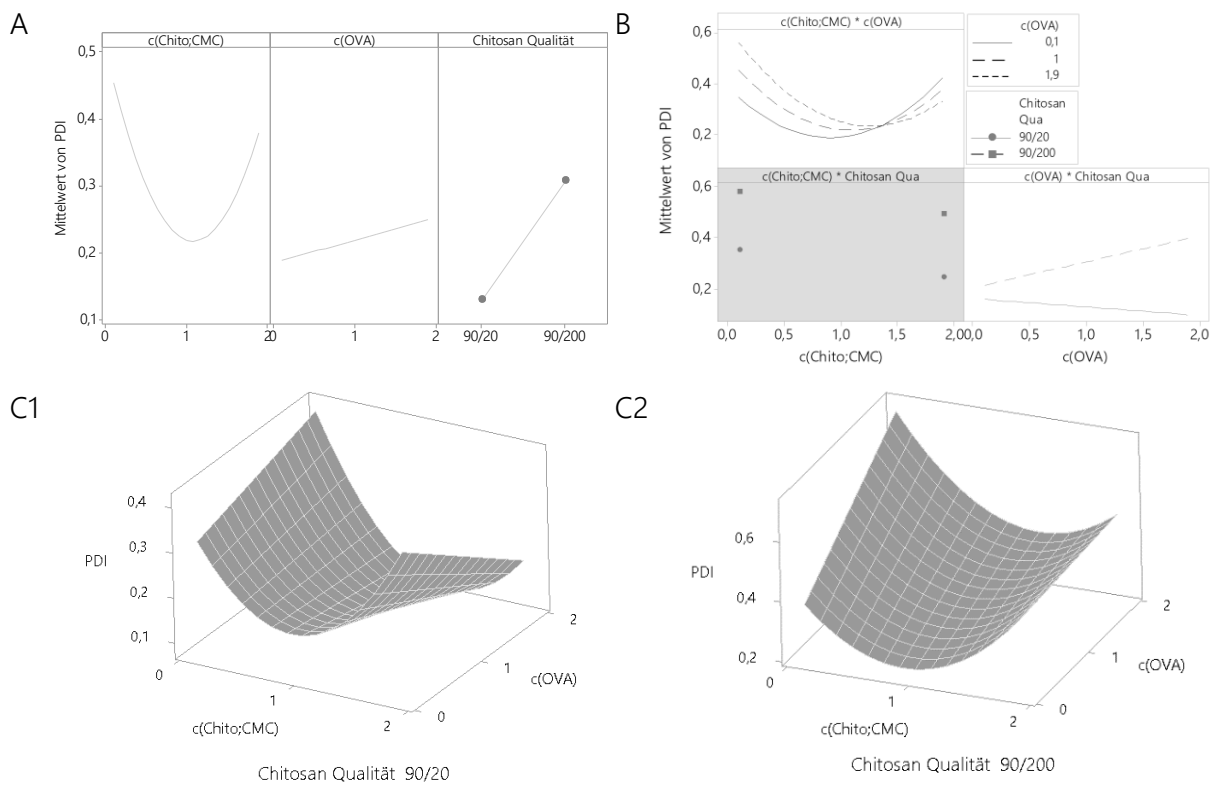


Abbildung 5-30: Einfluss der untersuchten Parameter auf den PDI, dargestellt als Haupteffektdiagramm (A), Wechselwirkungsdiagramm (B) und Wirkungsflächendiagramme für Chitosan 90/20 (C1) und Chitosan 90/200 (C2)

Wie bereits im Screening-Design gezeigt, hat nur die OVA-Konzentration einen Einfluss auf die Beladungseffizienz (Abbildung 5-31). Durch den Wirkungsflächenversuchsplan konnte gezeigt werden, dass dieser Zusammenhang eine deutliche Krümmung aufweist. Ein Proteingehalt von 1 % führte zur höchsten Beladungseffizienz und wird daher als Optimum angesehen.

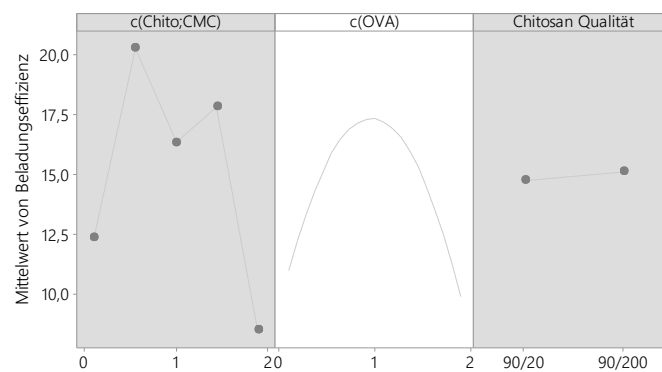


Abbildung 5-31: Einfluss der untersuchten Parameter auf die Beladungseffizienz dargestellt als Haupteffektdiagramm

Die Kettenlänge des eingesetzten Chitosans hatte keinen signifikanten Einfluss auf den Proteingehalt des Produktes (Abbildung 5-32 A). Wenn mehr OVA eingesetzt wurde, erhöhte das auch den Proteinanteil in den Partikeln. Wurde mehr Polymer eingesetzt, erniedrigte sich der Proteinanteil der Partikel. Dementsprechend wiesen Partikel, die mit einer hohen OVA-Konzentration und geringen Polymerkonzentration hergestellt wurden, den höchsten Proteingehalt auf (Abbildung 5-32 B)

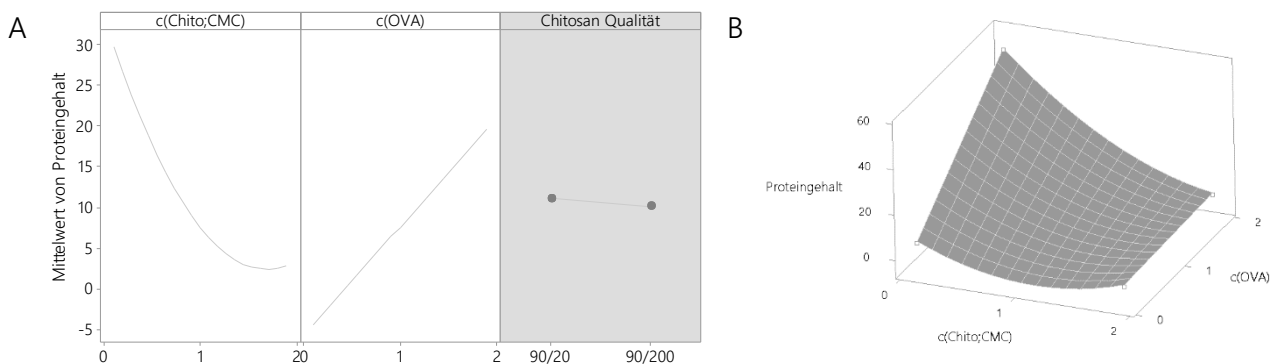


Abbildung 5-32: Einfluss der untersuchten Parameter auf den Proteingehalt, dargestellt als Haupteffektdiagramm (A) und Wirkungsflächendiagramm (B)

### 5.2.6 Herstellung und Charakterisierung der finalen Partikel

Durch die aus dem Wirkungsflächenversuchsplan gewonnenen Korrelationen konnten im nächsten Schritt die Herstellungsparameter ermittelt werden, die zu Partikeln mit einer definierten Größe und definiertem Proteingehalt führen sollen. Der im Ziel definierte Partikelgrößenbereich sollte durch die Größen 200 nm, 400 nm und 700 nm abgedeckt werden. Der Proteingehalt der Partikel sollte ebenso drei verschiedene Stufen von 5 %, 15 % und 30 % aufweisen. Mittels des ausgewerteten Versuchsplans und der Zielgrößenoptimierung von Minitab® wurden die Parameterkombinationen ermittelt, mit denen Zielpartikel der genannten Größen und Proteingehalte hergestellt werden sollten. Die errechneten Parameter sind in Tabelle 5-31 zusammengefasst. Bei der Berechnung der Parameterkombinationen ist bereits aufgefallen, dass es keine Möglichkeit innerhalb des Versuchsraumes gibt, Partikel mit einer Größe von 700 nm und hohem (30 %) und mittlerem Proteingehalt (15 %) herzustellen. Um dennoch Nanopartikel mit 15 % Proteingehalt herzustellen, wurde die Zielpartikelgröße auf 560 nm reduziert.

Tabelle 5-31: Parameterkombinationen, die zur Herstellung von Partikeln mit definierten Zielgrößen genutzt wurden; \*durch Modell vorhergesagte mittlere Partikelgröße 560 nm

Versuchspunkt	Zielgröße		Parameter				T [°C]	pH
	D <sub>z</sub> [nm]	PG [%]	c (Chito;CMC) [%]	c (OVA) [%]	Chitosan-Qualität			
Chito-CMC (200;5)	200	5	0,71	0,55	90/20	22,5 ± 0,5	3 ± 0,1	
Chito-CMC (200;15)	200	15	0,94	1,46	90/20			
Chito-CMC (200;30)	200	30	0,10	1,01	90/20			
Chito-CMC (400;5)	400	5	1,60	1,49	90/20			
Chito-CMC (400;15)	400	15	1,19	1,90	90/200			
Chito-CMC (400;30)	400	30	0,97	1,90	90/200			
Chito-CMC (700;5)	700	5	1,00	0,81	90/200			
Chito-CMC (700;15)	700*	15	1,18	1,90	90/200			
Chito-CMC (700;30)	700	30	keine Parameterkombination ermittelbar					

Je drei Chargen der Zielpartikel wurden entsprechend Tabelle 5-31 hergestellt. Im Anschluss wurden die Partikelgröße (Abbildung 5-33), der PDI (Abbildung 5-34), die Beladungseffizienz (Abbildung 5-35) und der Proteingehalt (Abbildung 5-36) analysiert.

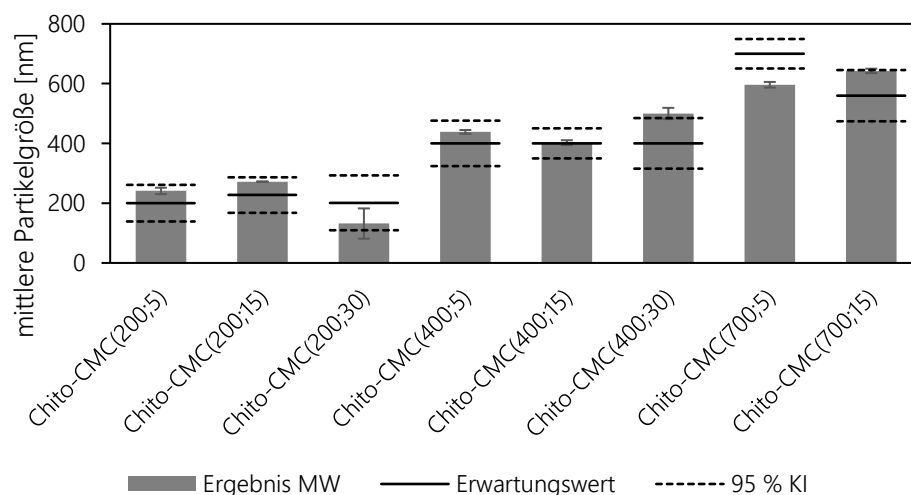


Abbildung 5-33: Mittlere Partikelgröße der final hergestellten Chitosan-CMC-Partikel mit Erwartungswert und 95 %-Konfidenzintervall; n = 3, Fehlerbalken = SD

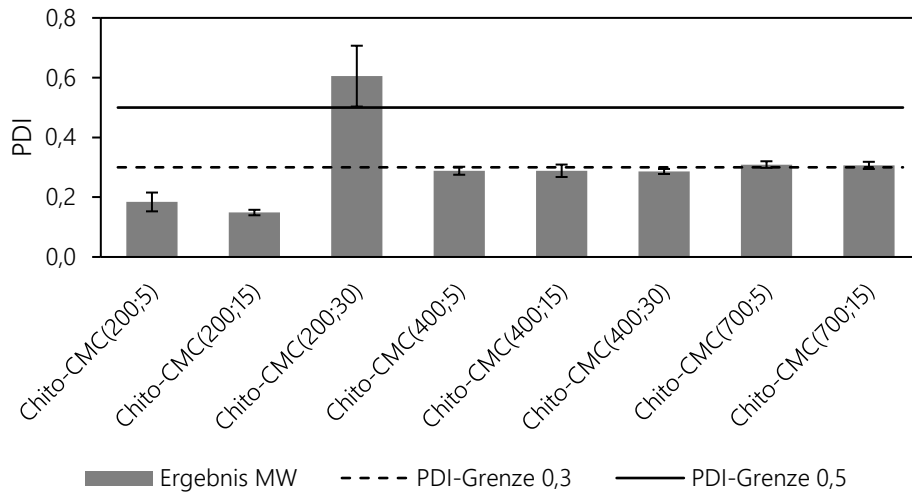


Abbildung 5-34: PDI der final hergestellten Chitosan-CMC-Partikel mit Grenzen und 95 %-Konfidenzintervall;  $n = 3$ , Fehlerbalken = SD

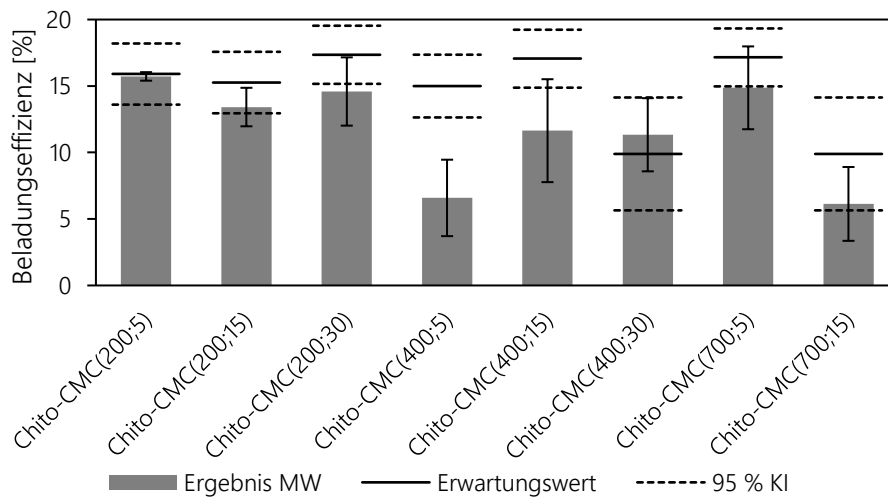


Abbildung 5-35: Beladungseffizienz der final hergestellten Chitosan-CMC-Partikel mit Erwartungswert und 95 %-Konfidenzintervall;  $n = 3$ , Fehlerbalken = SD

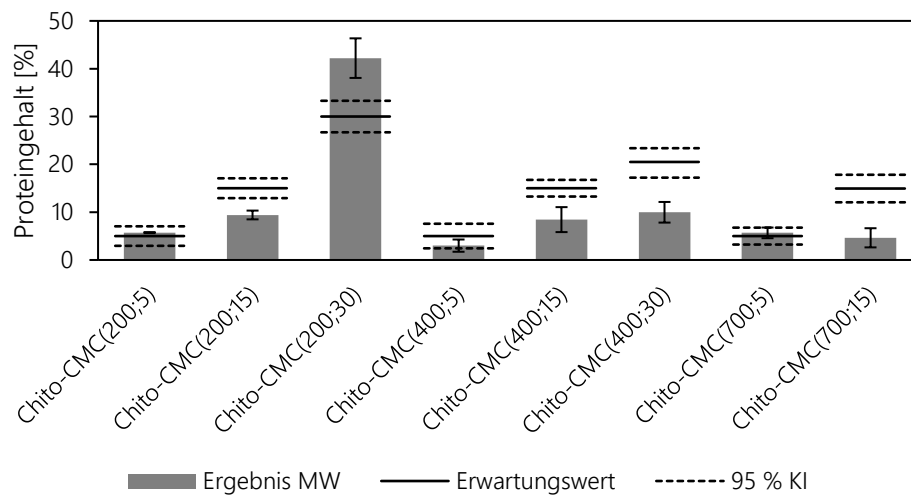


Abbildung 5-36: Proteingehalt der final hergestellten Chitosan-CMC-Partikel mit Erwartungswert und 95 %-Konfidenzintervall;  $n = 3$ , Fehlerbalken = SD

Besonders bei einem Zielproteingehalt von 30 % wich die tatsächliche mittlere Partikelgröße stark vom Erwartungswert ab. In beiden Fällen wurde keine Partikelgröße erreicht, die innerhalb des Konfidenzintervalls lagen. Die Partikel mit einer Zielgröße von 700 nm waren zwischen 600 und 650 nm groß und damit etwas kleiner als die Zielgröße.

Bis auf die Partikel Chito-CMC(200;30) wiesen alle Zielpartikel PDI-Werte auf, die auf eine geringe Partikelgrößenverteilung hinweisen. Für den Versuchspunkt Chito-CMC(200;30) wurde eine sehr geringe Polymerkonzentration verwendet (0,1 %) bei einer OVA-Konzentration von 1,01 %. Der PDI von ca. 0,6 könnte ein Hinweis darauf sein, dass die ionische Gelierung in diesen Konzentrationsbereichen nicht gut funktioniert. Möglicherweise ist nicht genügend Polymer vorhanden, um die im Verhältnis große Menge Protein zu verkapseln. Es könnte sein, dass viel freies Protein die Größenmessung beeinflusst oder es zu einer weiteren Reaktion kommt, die zu einer zweiten Partikelart führt.

Das Kontrollieren und Vorhersagen der Beladungseffizienz und des Proteingehaltes stellten sich als besonders schwierig heraus. Bei der Beladungseffizienz fällt die sehr hohe Standardabweichung auf (Abbildung 5-35). Nur die Versuchspunkte (200;5) und (200;15) lagen innerhalb des Konfidenzintervalls. Alle anderen Werte lagen deutlich unterhalb des zu erwartenden Bereiches. Die Proteingehalte der final hergestellten Partikel lagen nur für den Zielwert von 5 % im erwarteten Bereich (Abbildung 5-36). Für alle anderen Partikel lagen die Gehalte deutlich unter bzw. über dem Zielwert. Besonders auffallend ist es, dass in einem Fall (Chito-CMC(200;30)) der

Proteingehalt deutlich über dem Erwartungswert lag, während die Beladungseffizienz im Mittel tiefer als der Erwartungswert war. Da beide Werte aus der Proteinkonzentration berechnet werden, ist dies ein Hinweis dafür, dass bereits das mathematische Modell nicht genau war und daher der Erwartungswert für mindestens eine der Zielgrößen nicht zuverlässig berechnet werden konnte.

Ein Grund für die schwer einstellbaren Proteingehalte kann die Genauigkeit der analytischen Methode sein. Da es sich um eine indirekte Gehaltsbestimmung handelt, bei der die OVA-Konzentration nach Zentrifugieren im Überstand bestimmt wird, wirken sich Messungenauigkeiten besonders stark auf das Ergebnis aus, wenn sich deutlich mehr Protein im Überstand befindet als im Produkt.

### 5.2.7 Visualisierung von Chitosan-Carboxymethylcellulose Nanopartikeln

Das Darstellen von Chitosan-CMC Nanopartikeln mittels REM ist aufgrund ihrer gelartigen Struktur und ihrem hohen Wassergehalt eine große Herausforderung und konnte nicht für alle Partikelarten erfolgreich ausgeführt werden. Aufgrund dessen werden an dieser Stelle beispielhaft Chitosan-CMC Partikel ohne Ovalbumin dargestellt. Diese Partikel wurden aus einer 0,1 %-igen Chitosan 90/20-Lösung und einer 1,1 %-igen CMC-Lösung bei einem pH-Wert von drei und Raumtemperatur hergestellt. Die Partikel wurden auf den REM-Trägern gefriergetrocknet, um so ihre Struktur zu bewahren. Zuvor wurden die Nanopartikel nach der in Kapitel 4.1.3 beschriebene Methode gewaschen, damit beim Trocknen keine Matrix entsteht, die die Partikel überlagert. Da es sich bei dem Produkt der ionischen Gelierung um Gelpartikel handelt, die einen hohen Wassergehalt aufweisen, würde eine andere Trocknungsart dazu führen, dass die Partikel beim Trocknen ein Großteil ihres Volumens verlieren. In Abbildung 5-37 sind 200 nm bis 300 nm große Partikel erkennbar.

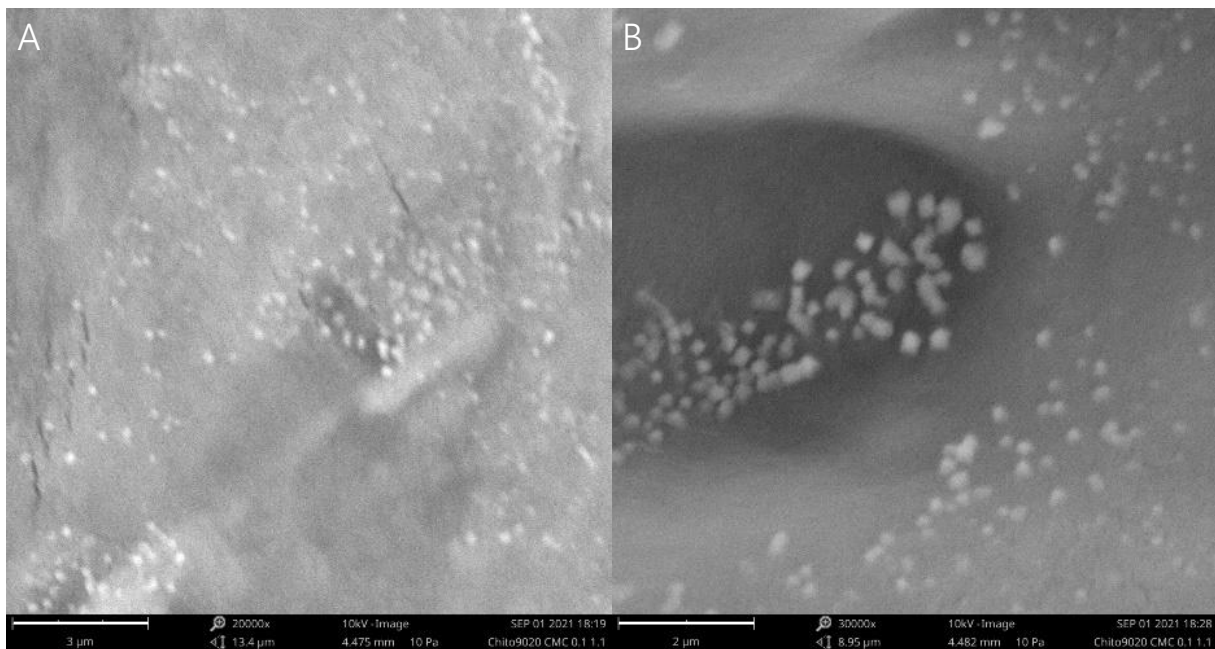


Abbildung 5-37: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von Chitosan-CMC Nanopartikeln; A: 20000 fache Vergrößerung, Balken  $\pm 3 \mu\text{m}$ ; B: 30000-fache Vergrößerung, Balken  $\pm 2 \mu\text{m}$ ; mit Gold beschichtet, vermessen bei einer Arbeitsspannung von 10 kV

Die Auflösung ist nicht gut genug, um eine Aussage über die Partikelform oder Oberflächenbeschaffung zu treffen. Dies ist jedoch bei so kleinen Partikeln nicht ungewöhnlich.

### 5.2.8 Fazit

Bei der Untersuchung der ionischen Gelierung zwischen Chitosan und Carboxymethylcellulose, bei der Ovalbumin als Modellwirkstoff in den nanopartikulären Träger eingebracht werden sollte, ist aufgefallen, wie komplex das Zusammenspiel der einzelnen Herstellungsparameter ist. Nachdem in Kapitel 5.2.3 gezeigt werden konnte, welchen eindeutigen Einfluss der pH-Wert auf die Ladung von Chitosan und CMC hat, könnte man davon ausgehen, dass der pH-Wert ein guter Parameter ist, mit dem die hier untersuchte ionische Gelierung gesteuert werden kann. Diese Annahme konnte durch weitere Untersuchungen mittels Screening-Versuchsplan nicht bestätigt werden. Da der pH-Wert Einfluss auf die Ladung aller drei Edukte hat, heben sich die erwarteten Effekte möglicherweise gegenseitig auf. Die Ladungsänderung bei einem Edukt kann dazu führen, dass es besser an der Reaktion teilnehmen kann, während ein oder auch die anderen beiden Edukte schlechter an der Reaktion teilnehmen können. Der dadurch bedingte sehr sensible Zusammenhang aus pH-Wert, Ladung und Reaktivität scheint so komplex zu sein, dass er mit den verwendeten Methoden nicht dargestellt werden konnte. Was jedoch gezeigt werden konnte, ist,

dass eine Änderung des pH-Wertes wenig geeignet ist, um die Partikelgröße oder die Proteinbeladung gezielt zu steuern.

Durch die angewendete statistische Versuchsplanung konnte zudem gezeigt werden, dass sich auch die anderen untersuchten Prozessparameter stark gegenseitig beeinflussen. Da bei der ionischen Gelierung verfügbare Ladungen genutzt werden, um Protein in den Partikeln zu binden, erscheint es sinnhaft, dass eine Erhöhung der OVA-Konzentration zu einer schlechteren Beladungseffizienz führt, da die OVA-Moleküle untereinander um die freien Ladungen konkurrieren. Eine Erhöhung der Polymerkonzentration führte zwar zu größeren Partikeln, anscheinend jedoch nicht zu mehr verfügbaren Ladungen, an denen das Protein binden kann. Möglicherweise beeinflussen die Ladungen des Ovalbumins auch die Reaktion zwischen Chitosan und CMC, was die im Wirkungsflächenversuchsplan gezeigten Wechselwirkungen erklären würde.

Die Partikelgrößenverteilung der untersuchten ionischen Gelierung ist im Verhältnis zu anderen untersuchten Methoden etwas breiter. Dies lässt sich dadurch erklären, dass es sich bei Chitosan, um ein halbsynthetisches Polymer mit natürlichem Ursprung handelt, bei dem sich die einzelnen Moleküle in ihrer Zusammensetzung, Größe und Deacetylierungsgrad unterscheiden [66].

Insgesamt erwies sich die Herstellung von ovalbuminbeladenen Chitosan-CMC-Nanopartikeln als schwer steuerbar und vorhersagbar. Die final hergestellten Partikel entsprachen in nur wenigen Fällen den vorher definierten Eigenschaften. Die Partikelgröße und der PDI waren etwas besser vorhersagbar als der Proteingehalt und die Beladungseffizienz. Letztere entsprachen für die final definierten Partikel selten dem Erwartungswert, sodass der Prozess nicht als kontrolliert angesehen werden kann. Dies liegt möglicherweise nicht nur an dem Optimierungsprozess, sondern auch an der indirekten Gehaltsbestimmung des Ovalbumins, die an sich großen Schwankungen unterliegt. Bei geringer Proteinbeladung wäre eine direkte Gehaltsbestimmung einer Indirekten überlegen, da bei niedrigen Konzentrationen Messfehler durch Differenzbildung stärker ins Gewicht fallen. Ein Optimierungsprozess, der auf enger definierte Produkteigenschaften abzielt, könnte möglicherweise zu einem Herstellungsprozess führen, der deutlich besser steuerbar ist. Alternativ kann ein Versuchsaufbau unter Einsatz der Mikrofluidtechnologie gewählt werden, bei dem die zwei Polymerlösungen durch einen Mikromischer fließen. Durch die rasche und intensive Durchmischung bleiben die Reaktionsbedingungen in der Mischzone konstant, was wiederum zu einer engeren Partikelgrößenverteilung und einem geringeren PDI führen könnte.

### 5.3 Herstellung von Chitosan-Carboxymethylcurdlan Partikeln mittels ionischer Gelierung

In diesem Abschnitt meiner Arbeit sollten curdlanhaltige Partikel hergestellt werden, die nicht nur als Träger einer pharmazeutisch aktiven Substanz dienen, sondern zusätzlich auch einen eigenen pharmakologischen Effekt haben. Dazu sollte die bereits verwendete Methode der ionischen Gelierung auf eine Reaktion zwischen Chitosan und Carboxymethylcurdlan angewendet werden. Carboxymethylcurdlan hat im Gegensatz zum Curdlan den Vorteil, dass es auch bei pH-Werten kleiner zehn gut in wässrigen Medien löslich ist und daher an einer ionischen Gelierung mit Chitosan teilnehmen kann.

#### 5.3.1 Ladungen der Ausgangssubstanzen bei verschiedenen pH-Werten

Wie bereits im vorherigen Kapitel diskutiert, spielt die Ladungsdichte der Polymerstränge eine ausschlaggebende Rolle bei der ionischen Gelierung. Um einen ersten Anhaltspunkt zu bekommen, in welchem pH-Wert-Bereich eine Reaktion zwischen Chitosan 90/20 und Carboxymethylcurdlan stattfinden kann, wurde das Zeta-Potential einer Chitosan 90/20-Lösung und CM-Curdlan-Lösung bestimmt, nachdem der pH-Wert mittels Natriumhydroxid und Essigsäure eingestellt wurde (Abbildung 5-38).

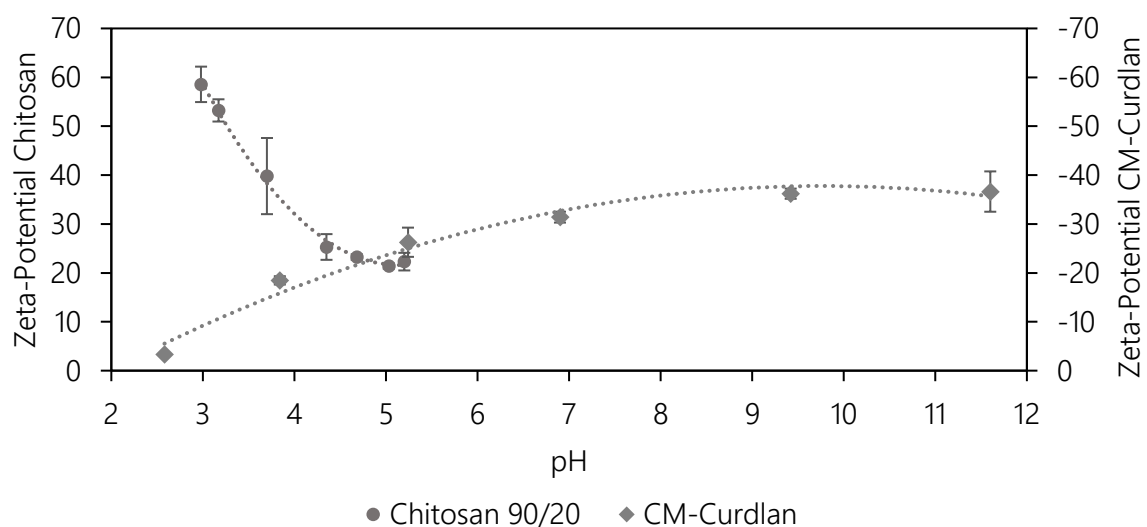


Abbildung 5-38: Zeta-Potential von Chitosan 90/20 und Carboxymethylcurdlan (CM-Curdlan) in Abhängigkeit vom pH-Wert der Lösung;  $n = 3$ , Fehlerbalken = SD

In einem pH-Wert-Bereich zwischen vier und fünf sind beide Polymere geladen und besitzen ein Zeta-Potential größer bzw. kleiner als  $\pm 20$  mV. Bei der ionischen Gelierung ist entscheidend, dass

die elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen den zwei gegensätzlich geladenen Polymeren groß genug sind, um stabile Ionen-Brücken zu bilden. Daher ist es am wahrscheinlichsten, dass in einem pH-Bereich zwischen vier und fünf eine ionische Gelierung stattfinden kann. Bei einem pH-Wert unter drei ist das CM-Curdlan vermutlich nicht stark genug geladen, um an der Interaktion teilzunehmen. Bei pH-Werten über 5,5 ist Chitosan 90/20 nicht mehr löslich und kann daher auch nicht an der Reaktion teilnehmen.

### 5.3.2 Variation des pH-Wertes der Ionischen Gelierung

Durch das Messen des Zeta-Potentials der Ausgangslösungen bei unterschiedlichen pH-Werten konnte eine erste Vermutung aufgestellt werden, bei welchen pH-Werten eine ionische Gelierung zwischen Chitosan 90/20 und CM-Curdlan stattfinden kann. Um diese Vermutung zu überprüfen, sollte die Reaktion bei unterschiedlichen pH-Werten ausgeführt werden. Dazu wurden jeweils 5 ml Chitosan 90/20-Lösung (1 µg/ml in 2 % Essigsäure) vorgelegt und mittels Magnetrührer gerührt, während 2,5 ml CM-Curdlan-Lösung (1 µg/ml in Wasser) hinzugegeben wurden. Der pH-Wert der Chitosan-Lösung wurde mittels NaOH-Lösung eingestellt. Im Anschluss wurde optisch überprüft, ob das Produkt getrübt, opaleszierend oder klar ist und ob es andere Auffälligkeiten gibt (Tabelle 5-32). Eine Trübung weist darauf hin, dass eine Reaktion stattgefunden hat und eine Opaleszenz, dass es zudem wahrscheinlich ist, dass die Größe der entstandenen Partikel im Nanometerbereich liegt.

*Tabelle 5-32: Aussehen des Produktes nach ionischer Gelierung aus Chitosan 90/20 und CM-Curdlan bei unterschiedlichen pH-Werten*

pH	V (1 M NaOH) [µl]	Aussehen des Produktes
2,40	0	klare Lösung
3,49	100	klare Lösung
3,96	300	trüb + Fäden
4,28	500	trüb + Fäden
4,96	1000	trüb
5,47	1200	trüb + viele Fäden

Bei pH-Werten kleiner 3,5 konnte keine Trübung erkannt werden. Erst bei einem pH-Wert von knapp vier entstand eine trübe Suspension, die zudem kleine weiße Fäden enthielt. Nur bei einem pH-Wert von ca. fünf waren keine Fäden zu erkennen und bei einem pH-Wert von ca. 5,5 waren die meisten Fäden vorhanden. Dies ist ein Hinweis darauf, dass nur bei pH-Werten über 3,5 bis

vier das CM-Curdlan ausreichend stark geladen ist, um an der Fällungsreaktion teilzunehmen. Dies deckt sich sehr gut mit den Ergebnissen aus Kapitel 5.3.1. Eine Größenmessung der entstandenen Partikel mittels DLS war bei keinem Produkt erfolgreich, da entweder keine Partikel oder zu große Partikel entstanden sind.

### 5.3.3 Variation des Massenverhältnisses

Für weitere Untersuchungen der Reaktion wurde das Verhältnis zwischen Chitosan und CM-Curdlan bei einem pH-Wert von fünf variiert. Dabei wurden Verhältnisse zwischen 10:1 und 1:10 ausprobiert. Da eine Größenmessung mittels DLS weiterhin keine Ergebnisse hervorbrachte, wurde nur das Zeta-Potential des Produktes ermittelt (Abbildung 5-39). Zudem wurde ein Foto der Produkte aufgenommen um diese visuell bewerten zu können (Abbildung 5-40).

Ein deutlicher Überschuss von CM-Curdlan ab einem Massenverhältnis von 1:4 (Chitosan : CM-Curdlan) scheint einen leichten Einfluss auf das Zeta-Potential des Produktes zu haben. Ansonsten ist kein Einfluss des Reaktionsverhältnisses auf das Zeta-Potential zu beobachten (Abbildung 5-39). Die Trübung des Produktes nimmt zu, je mehr CM-Curdlan eingesetzt wurde und scheint ab einem Verhältnis von 1:6 (Chitosan : CM-Curdlan) wieder abzunehmen (Abbildung 5-40). Bei keinem Reaktionsverhältnis sind erkennbare Fäden entstanden.

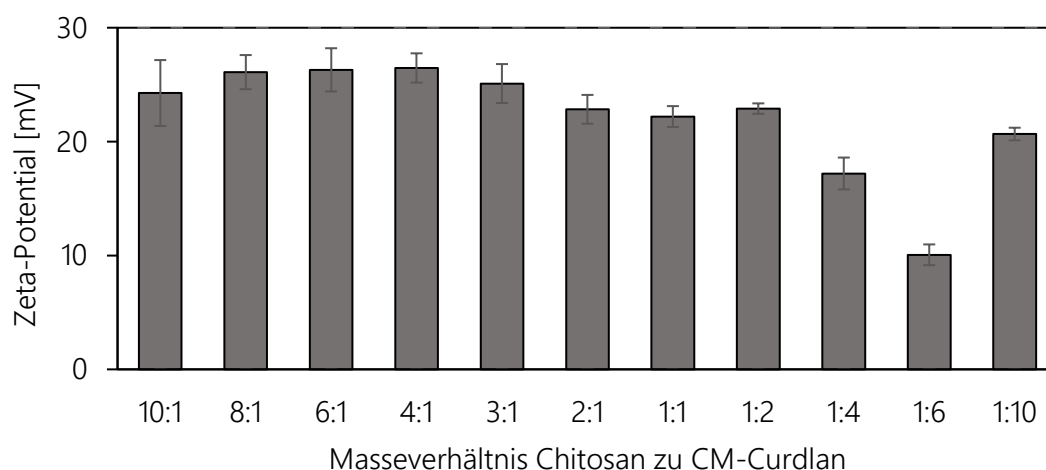


Abbildung 5-39: Zeta-Potential des Produktes von unterschiedlichen Reaktionsverhältnissen zwischen Chitosan 90/20 und Carboxymethylcurdlan (CM-Curdlan)

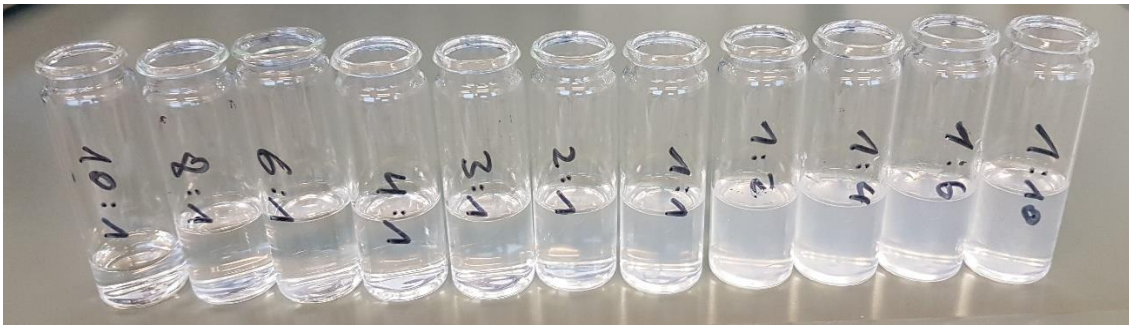


Abbildung 5-40: Foto der Produkte der ionischen Gelierung von unterschiedlichen Reaktionsverhältnissen zwischen Chitosan 90/20 und Carboxymethylcurdlan.

#### 5.3.4 Fazit

Im Rahmen dieser Arbeit konnten Reaktionsbedingungen gefunden werden, bei denen eine ionische Gelierung zwischen Chitosan 90/20 und CM-Curdlan stattfindet und Partikel ausfallen. Dabei entstanden jeweils Partikel mit einer Partikelgröße außerhalb des Messbereiches des Zetasieters ( $> 10 \mu\text{m}$ ). Leider konnten weder durch das Variieren des pH-Wertes noch des Massenverhältnisses Reaktionsbedingungen gefunden werden, bei denen Partikel kleiner 1000 nm ausfallen oder ein Weg gefunden werden, um das Partikelwachstum zu stoppen.

#### 5.3.5 Ausblick

Möglicherweise ist die Kettenlänge des verwendeten CM-Curdlans mit einem Molekulargewicht von 1650 kDa zu lang, um als Partikel im Nanometerbereich auszufallen. Im Vergleich hatte die in Kapitel 5.2 verwendete Carboxymethylcellulose ein Molekulargewicht von ca. 90 kDa. Da kein CM-Curdlan mit geringerem Molekulargewicht kommerziell erhältlich war, müsste ein solches für weitere Versuche eigenständig synthetisiert werden. Das Verwenden eines CM-Curdlans mit einem Molekulargewicht um die 90 kDa könnte zum gewünschten Ergebnis führen.

#### 5.4 Herstellung von Chitosan Mikro- und Nanopartikeln mittels Sprühtrocknung

Aufgrund der besonderen Lösungseigenschaften des Chitosans können durch Sprühtrocknung einer essigsauren Lösung Chitosan-Partikel hergestellt werden, die in physiologischem Medium unlöslich sind. Während des Trocknungsprozesses verdampft ein Großteil der enthaltenen Essigsäure. Beim Dispergieren der Partikel in einem physiologischen Medium mit einem pH-Wert von ca. 7,4 wird die verbleibende Essigsäure abgepuffert. Die Chitosan-Partikel sind im neutralen pH-Bereich unlöslich und verbleiben daher intakt.

Unter Verwendung von zwei verschiedenen Sprühtrockner-Arten, dem Mini Sprühtrockner B-290 und dem Nano Sprühtrockner B-90 HP, wurden Chitosan-Partikel unterschiedlicher Größe hergestellt. Während durch den Mini Sprühtrockner Partikel im Größenbereich von 1  $\mu\text{m}$  bis 25  $\mu\text{m}$  hergestellt werden können, soll der Nano Sprühtrockner Partikel im Größenbereich von 200 nm bis 5  $\mu\text{m}$  generieren. Ziel ist es, mit beiden Sprühtrockner Partikel kleiner 1  $\mu\text{m}$  herzustellen. Dies ist vor allem für die Herstellung mittels Mini Sprühtrockners eine Herausforderung. Wenn dies jedoch gelingt, könnten auf diesen Weg Partikel mit deutlich höherem Durchsatz hergestellt werden. Vergleichend soll gezeigt werden, wie die Partikelgröße und Partikelgrößenverteilung durch die unterschiedlichen Sprühtrocknungsprinzipien beeinflusst werden. Da Lösungen mit hoher Viskosität zum Verstopfen der Membran des Nano-Sprühtrockners führen können, wurde für beide Versuchsreihen eine Chitosanqualität mit geringer Viskosität gewählt (Chitoscience 90/10).

Die Sprühtrocknung ist ein kontinuierlicher Prozess, bei dem mehrere Prozessparameter die Eigenschaften des Endproduktes beeinflussen. Durch das Versprühen einer Lösung entstehen kleine Tröpfchen, die zu festen Partikeln eingetrocknet werden. Dementsprechend beeinflussen vor allem die Tröpfchengröße und der Feststoffanteil in den Tröpfchen, der der Chitosankonzentration der Lösung entspricht, die spätere Partikelgröße. Die Tröpfchengröße wird bei der im Mini-Sprühtrockner eingesetzten Zweistoffdüse vor allem durch den Sprühdruk und den Innendurchmesser beeinflusst. Bei dem Nano-Sprühtrockner entstehen die Tröpfchen durch das Schwingen einer Membran, weshalb die Größe der Löcher in der Membran die Tröpfchengröße definiert. Zudem beeinflusst das Zusammenspiel aus Evaporationsgeschwindigkeit des Lösungsmittels und der Geschwindigkeit mit dem die Moleküle während des Trocknens im Lösungsmittel diffundieren, die Partikelgröße und -form [118]. Wird schneller getrocknet, als die Moleküle in das noch vorhandene Lösungsmittel diffundieren, entstehen große Hohlkugeln, die je nach Stabilität der

Wand auch eingefallene Strukturen aufweisen können. Trocknet ein Tröpfchen langsam, entstehen kleine solide Partikel. Die Diffusionsgeschwindigkeit ist von der Substanz, der Viskosität des Mediums und der Temperatur abhängig und dementsprechend nicht unabhängig steuerbar. Die Trocknungsgeschwindigkeit steigt, je höher die Einlass- und Auslasstemperatur sind. Die Auslasstemperatur ist zudem ein Indiz für die Restfeuchte des Produktes, da während der Trocknung Verdampfungsenthalpie die Auslasstemperatur niedrig hält. Sinkt der Wassergehalt im Produkt, wird weniger Energie für die Verdunstung benötigt, wodurch die Auslasstemperatur ansteigt. Der letzte Schritt der Sprühtrocknung ist das Abtrennen der hergestellten Partikel aus dem Luftstrom. Es gibt verschiedenen Abscheideprinzipien, die unterschiedlich effizient sind. Führt eine Abscheidetechnik dazu, dass die Wiederfindungsrate für bestimmte Partikelgrößen geringer ist als für andere, hat dies Einfluss auf die mittlere Partikelgröße und die Partikelgrößenverteilung des Produktes. Der beim Mini-Sprühtrockner verwendete Hochleistungszyklon hat laut Hersteller eine höherer Wiederfindungsrate für kleine Partikel [87]. Im Nano Sprühtrockner ist ein elektrostatischer Partikelsammler verbaut, der für hohe Ausbeuten sorgen soll und eine effiziente Gewinnung kleinster Partikel ermöglicht [89].

### 5.4.1 Herstellung von Chitosan-Partikeln mittels Mini-Sprühtrockner

Wie in Kapitel 5.5 noch gezeigt wird, hat die Feststoffkonzentration den mit Abstand größten Einfluss auf die Partikelgröße. Daher wurde bei der Herstellung der sprühgetrockneten Chitosanpartikel ausschließlich die Feststoffkonzentration variiert, um die Partikelgröße gezielt zu steuern.

Zur Herstellung der Chitosan-Partikel wurde Chitoscience 90/10 in 1 %-iger Essigsäurelösung gelöst. Es wurden fünf Lösungen mit verschiedener Chitosan-Konzentration hergestellt: 1,00 %; 0,75 %; 0,50 %; 0,25 % und 0,10 %. Die Einlasstemperatur wurde auf 120 °C eingestellt und die Pumpengeschwindigkeit so variiert, dass eine Auslasstemperatur von 50 °C erreicht wurde. Die hergestellten Partikel wurden mittels Laserlichtbeugung und Rasterelektronenmikroskop hinsichtlich Partikelgrößenverteilung und Morphologie analysiert.

Keine der mit dem Mini-Sprühtrockner hergestellten Partikelarten wies eine mittlere Partikelgröße ( $x_{50}$ ) von  $<1 \mu\text{m}$  auf. Der  $x_{50}$  der 0,10 %-igen Chitosanlösung war mit  $1,06 \mu\text{m}$  nur knapp größer als diese Grenze. In der Summenverteilung (Abbildung 5-41) kann man sehr gut erkennen, dass die Partikelgröße mit steigender Chitosankonzentration stetig zunahm. Für Partikel, die aus einer 0,25 % bis 1,00 %-igen Chitosanlösung hergestellt wurden, erkennt man in der Verteilungsdichte

(Abbildung 5-42), dass es einen Peak bei knapp 2  $\mu\text{m}$  gab und für die Partikel aus 0,50 % bis 1,00 %-iger Chitosanlösung einen zweiten Peak bei 3  $\mu\text{m}$  bis 5  $\mu\text{m}$ . Der zweite Peak kann Anzeichen für einen zu geringen Dispergierdruck während der Laserdiffraktometriemessung sein, wodurch Agglomerate nicht zerstört wurden. Eine weitere Möglichkeit ist, dass beim Sprühtrocknen von Lösungen mit höherer Chitosankonzentration zwei Partikelarten mit unterschiedlicher mittleren Partikelgröße entstanden sind. Möglicherweise entstehen beim Versprühen von höher viskosen Lösungen Tröpfchen mit sehr unterschiedlicher Tröpfchengröße. Alternativ könnte der Chitosangehalt in den einzelnen Tröpfchen variieren, was z.B. durch Verdunsten des Lösungsmittels der Ausgangslösung entstehen sein könnte, was jedoch unwahrscheinlicher ist.

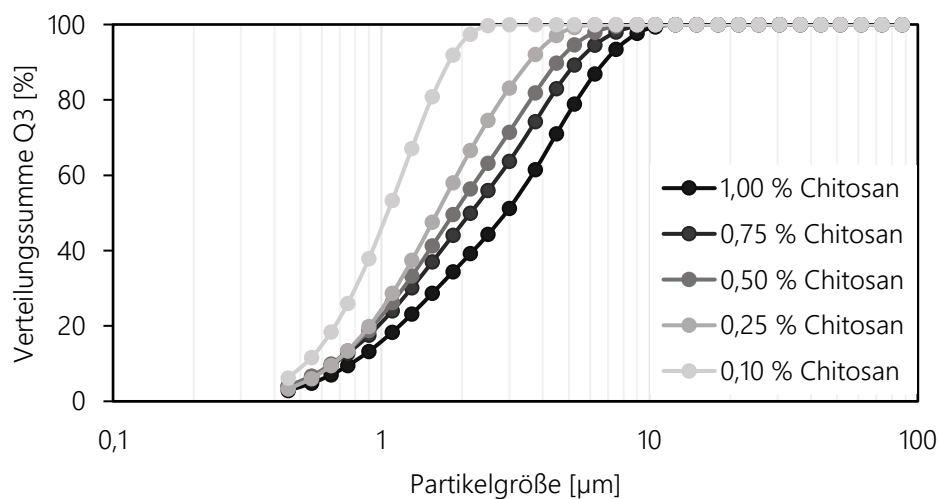


Abbildung 5-41: Partikelgrößenverteilungssumme der Chitosan-Mikropartikel, die mittels Mini-Sprühtrockner hergestellt wurden.

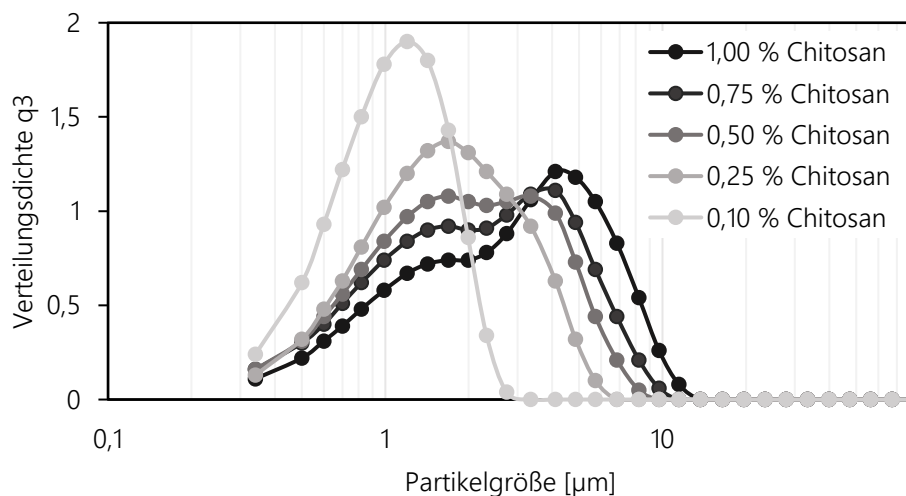


Abbildung 5-42: Partikelgrößenverteilungsdichte der Chitosan-Mikropartikel, die mittels Mini-Sprühtrockner hergestellt wurden.

Abbildung 5-43 zeigt, dass bei steigender Chitosankonzentration vor allem der  $x_{90}$ -Wert anstieg, während der  $x_{10}$ -Wert nahezu konstant blieb. Der Span stieg bis zu einer Konzentration von 0,50 % an und schien dann zu stagnieren.

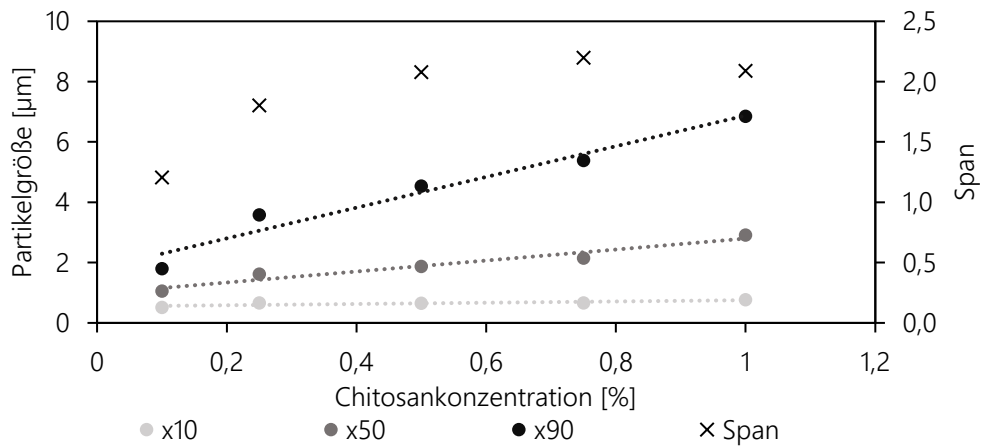


Abbildung 5-43:  $x_{10}$ ,  $x_{50}$  und  $x_{90}$  der Chitosan-Mikropartikel, die mittels Mini-Sprüh Trockner hergestellt wurden.

Die aufgenommenen REM-Bilder in 10000-facher und 30000-facher Vergrößerung (Abbildung 5-44 und Abbildung 5-45) bestätigen, dass Partikel, mit der für die Sprühtrocknung typischen runden Form, entstanden sind.

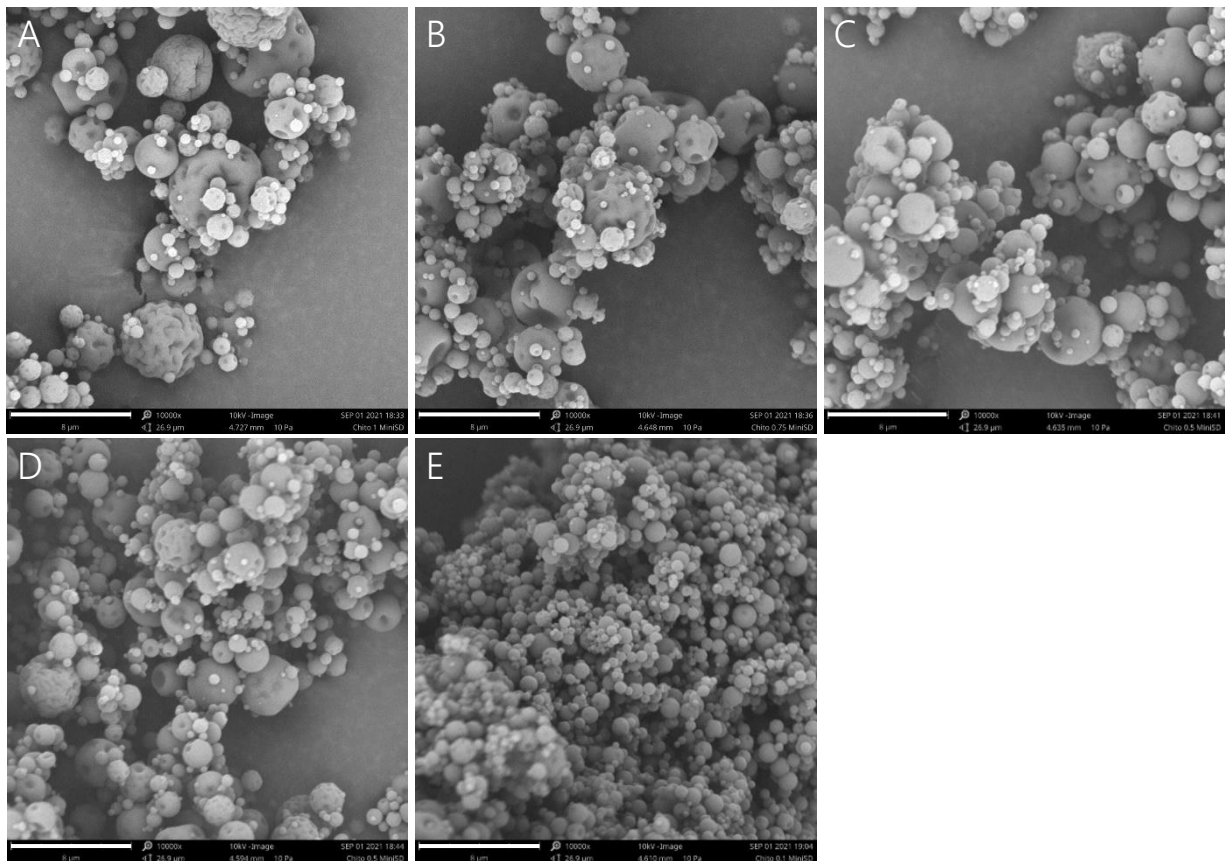


Abbildung 5-44: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der mittels Mini-Sprühtrockner hergestellten Chitosanpartikel aus unterschiedlich konzentrierten Lösungen: 1,00 % (A), 0,75 % (B), 0,50 % (C), 0,25 % (D) und 0,10 % (E); 10000-fache Vergrößerung, mit Gold beschichtet, vermessen bei einer Arbeitsspannung von 10 kV, Balken  $\pm 8 \mu\text{m}$

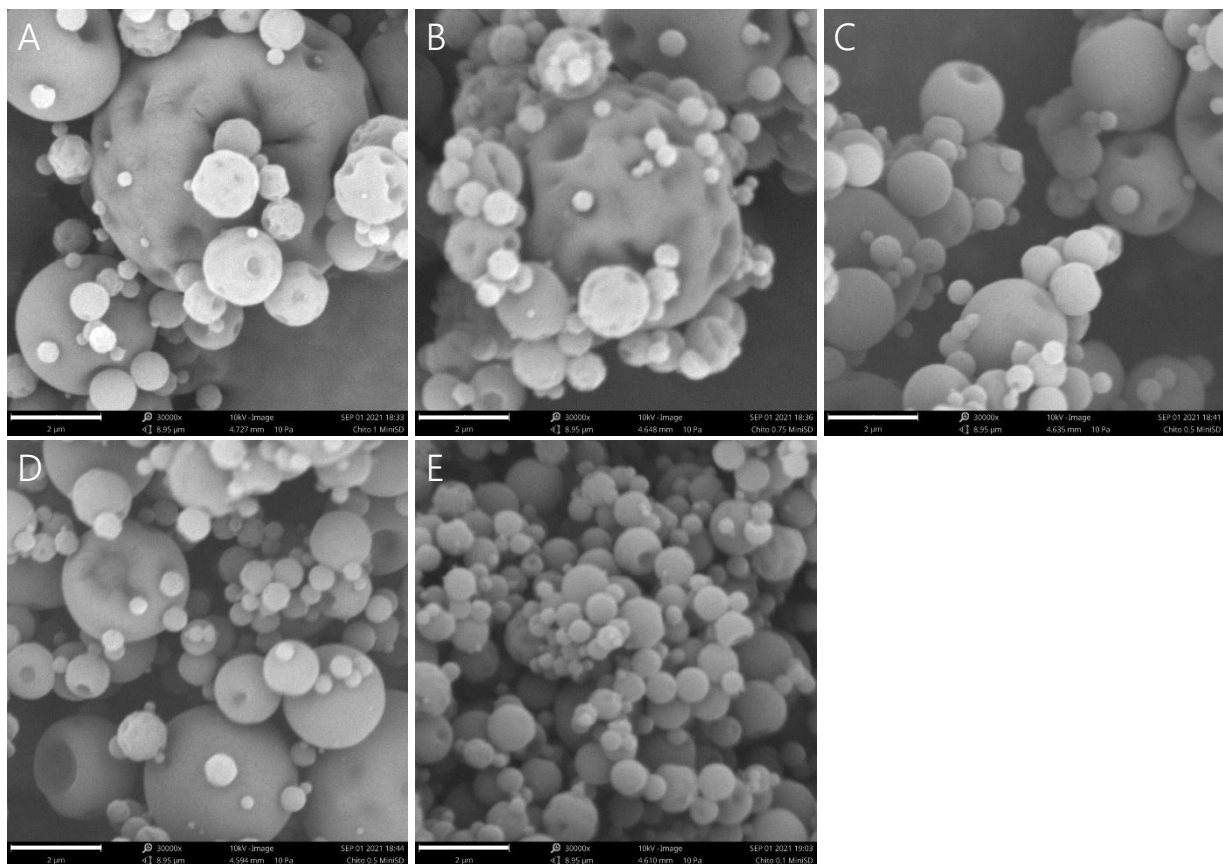


Abbildung 5-45: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der mittels Mini-Sprühtrockner hergestellten Chitosanpartikel aus unterschiedlich konzentrierten Lösungen: 1,00 % (A), 0,75 % (B), 0,50 % (C), 0,25 % (D) und 0,10 % (E); 30000-fache Vergrößerung, vermessen bei einer Arbeitsspannung von 10 kV, Balken  $\pm$  2  $\mu$ m

In allen fünf Produkten sind sehr kleine Partikel ( $<1 \mu$ m) vorhanden. Bei steigender Chitosankonzentration (ab 0,25 %) entstehen zusätzlich größere Partikel. Wenn im Produkt große Partikel von vielen kleinen Partikeln umgeben sind, werden diese auch als Satelliten bzw. „satellites“ bezeichnet [119]. Die Oberfläche der größeren Partikel ist unregelmäßig eingefallen und eingedellt. Je größer ein Partikel ist, desto mehr Dellen sind vorhanden. Die Partikel, die aus der 0,10 %-igen Chitosanlösung hergestellt wurden, haben im Gegensatz zu den anderen Partikelarten eine gleichmäßige Oberfläche. Nur vereinzelt sieht man Partikel, die an einer Stelle eingedellt sind. Die Partikelgrößenverteilung ist deutlich geringer als bei den anderen Produkten und es gibt keine deutlich größeren Partikel. Die REM-Bilder bestätigen die mittels Laserlichtbeugung gemessenen und in Abbildung 5-42 dargestellten Partikelgrößenverteilungen.

Eine Möglichkeit für die große Partikelgrößenverteilung der Produkte, die aus höher konzentrierten Chitosanlösungen hergestellt wurden, ist die mit steigender Konzentration gleichzeitig

steigende Viskosität der Lösung. Eine hohe Viskosität resultiert unter anderem aus der Kohäsion der Lösung, sprich der nach innen gerichteten Kräften bzw. der Anziehungskräfte zwischen den Teilchen. Der angelegte Sprühdruk zerreißt die Lösung beim Verlassen der Düse in kleine Tröpfchen. Die Atomisierungskrfte, die in dem Moment auf die Lösung wirken, sind der Kohäsion entgegengerichtet. Dies führt dazu, dass in der Regel Flüssigkeit mit höherer Oberflächenspannung und höherer Viskosität beim Zerstäuben größere Tröpfchen bilden [120]. Eine Hypothese wäre, dass eine größere Partikelgrößenverteilung das Resultat daraus ist, dass während des Versprühens zu einer Sekundrpartikelbildung kommt, bei der ein Teil der größeren Tröpfchen weiter zu kleineren Tröpfchen zerfällt. Der Ausgangstropfen wird dann zu einem größeren Partikel, während die Satellitentrpfchen die kleineren Partikel bilden [121]. Es könnte auch sein, dass bei einem Teil der Tröpfchen die Kohäsionskräfte die Atomisierungskrfte übersteigt und die Tröpfchen intakt bleiben. Ein zusätzliches Trpfchenwachstum durch Koaleszenz könnte ein weiterer Faktor sein, der eine hohe Partikelgrößenverteilung bedingt. Auch wenn die Viskosität ein kritischer Parameter im Zerstubungsprozess ist und nachweislich einen Einfluss auf die Partikelgröße haben kann, ist nicht eindeutig, ob auch die Partikelgrößenverteilung beeinflusst ist [122].

#### 5.4.2 Herstellung von Chitosan-Partikeln mittels Nano-Sprühtrockner

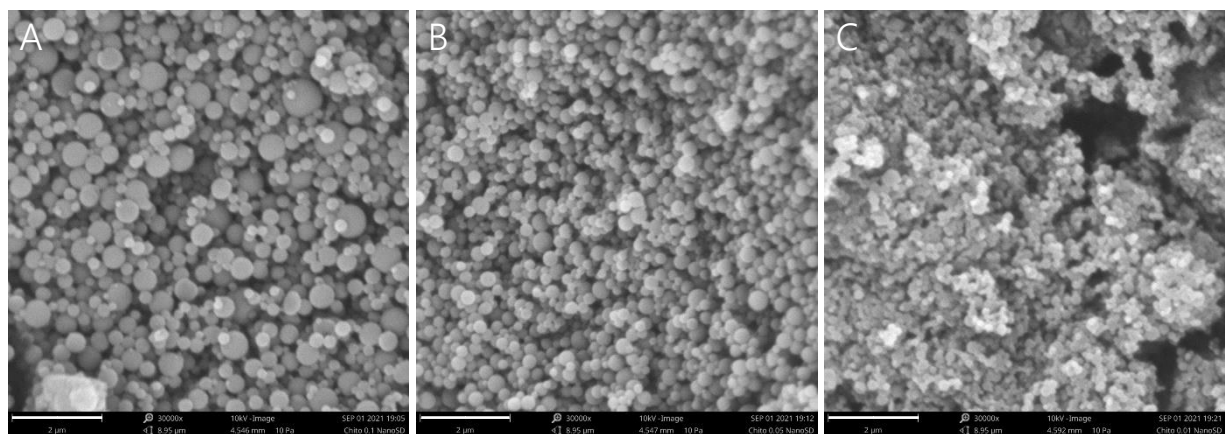
Wie bereits beim Mini-Sprühtrockner wurde bei der Herstellung mittels Nano-Sprühtrockner nur die Chitosankonzentration der Lösung variiert. Um möglichst kleine Partikel herzustellen, wurde die kleinste Membran verwendet. Da Lösungen mit einem Chitosangehalt über 0,1 % zu viskos waren, um über die Membran versprüht zu werden, wurden Chitosankonzentrationen von 0,10 %; 0,05 % und 0,01 % gewählt. Versprht wurde mit einer Frequenz von 105 Hz und einem relativen Sprhkopfdurchsatz von 50 %. Die Pumpe wurde auf 20 % und die Einlasstemperatur auf 90 °C eingestellt. Die Auslasstemperatur betrug dann ca. 30 °C.

Aufgrund der zu geringen Partikelgröße des Produktes konnten keine auswertbaren Laserdiffraktometriemessungen durchgeführt werden. Eine Partikelgrößenbestimmung durch DLS ergab ebenfalls keine auswertbaren Messungen, da sich die Partikel in keinem der untersuchten Medien (Milli-Q®-Wasser, 0,9 %-ige Natriumchloridlösung, PBS-Puffer, 0,1 %-ige PBST-Puffer, 1 %-ige PVA-Lösung) dispergieren ließen. Daher wurde die Partikelgröße mittels REM und der zugehörigen Phenom ProSuite Software bildanalytisch ausgewertet. Das Sprühtrocknen aller drei Lösungen ergab Partikel mit Durchmessern deutlich kleiner 1  $\mu\text{m}$  (Tabelle 5-33). Der ausgemessene

Partikeldurchmesser sank deutlich bei kleiner werdender Chitosankonzentration. Dieser deutliche Unterschied wird durch eine visuelle Auswertung der REM-Aufnahme bestätigt (Abbildung 5-46). Die Partikel erscheinen rund ohne sichtbaren Eindrücken an der Oberfläche. In Abbildung 5-46 A sieht man sowohl größere als auch sehr kleine Partikel. Die in Abbildung 5-46 B gezeigten Partikel wirken im Vergleich dazu deutlich gleichmäßiger in der Partikelgrößenverteilung. Um die Partikelgrößenverteilung des Produktes mit der kleinsten Partikelgröße zu beurteilen, ist die Auflösung der REM-Aufnahme (Abbildung 5-46 C) zu gering.

*Tabelle 5-33: Partikeldurchmesser der sprühtrockneten Chitosan-Nanopartikel, gemessen aus den rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen*

Chitosan-Konzentration [%]	Durchmesser kleiner Partikel [nm]	Durchmesser mittlerer Partikel [nm]	Durchmesser großer Partikel [nm]
0,10	206	405	776
0,05	94,9	253	495
0,01	90,5	206	383



*Abbildung 5-46: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der mittels Nano-Sprühtrockner hergestellten Chitosanpartikel aus unterschiedlich konzentrierten Lösungen: 0,10 % (A), 0,05 % (B) und 0,01 % (C); 30000-fache Vergrößerung, mit Gold beschichtet, vermessen bei einer Arbeitsspannung von 10 kV, Balken  $\pm 2 \mu\text{m}$*

Die Dauer der Sprühtrocknung betrug für die 100 ml der 0,10 %-igen Chitosanlösung ca. 2,5 h. Die Sprühtrocknung der 0,01 %-igen Chitosanlösung wurde nach ca. 12 h beendet, obwohl noch Chitosanlösung übrig war. Der zeitliche Aufwand dieser Herstellungsmethode macht eine kommerzielle Nutzung unwahrscheinlich, es lassen sich aber Partikel für Forschungszwecke herstellen.

### 5.4.3 Fazit

Sowohl durch Einsatz des Mini- als auch des Nano-Sprühtrockners konnten Chitosan-Partikel hergestellt werden. Beide Sprühtrocknungsverfahren haben Vor- und Nachteile. Der Mini-Sprühtrockner zeichnet sich durch einen deutlich höheren Durchsatz aus, wodurch schnell und effizient runde Chitosanpartikel hergestellt werden konnten. Aus Lösungen mit einer Chitosankonzentration von 0,10 % bis 1,00 % wurden Partikel hergestellt, die im Mittel größer als 1  $\mu\text{m}$  waren. Die Partikelgrößenverteilung der mit dem Mini-Sprühtrockner hergestellten Produkte war deutlich größer als derer, die mittels Nano-Sprühtrockner hergestellt wurden. Bei gleicher Konzentration produziert der Nanosprühtrockner mit der kleinsten Membran deutlich kleinere Partikel als der Mini-Sprühtrockner (405 nm vs. 1,06  $\mu\text{m}$ ). Ein Vergleich der Produkte beider Sprühtrocknungsverfahren, die aus einer 0,10 %-igen Chitosanlösung hergestellt wurden, ist in Abbildung 5-47 dargestellt. Der Nano-Sprühtrockner produzierte aus Lösungen mit einer Chitosankonzentration von 0,01 % bis 0,10 % Partikel, die mit einem mittleren Partikeldurchmesser von 200 nm bis 400 nm deutlich kleiner waren als 1  $\mu\text{m}$ . Jedoch hat der Nano-Sprühtrockner einen deutlich geringeren Durchsatz und Lösungen mit leicht erhöhter Viskosität können nicht zu Partikeln verarbeitet werden.

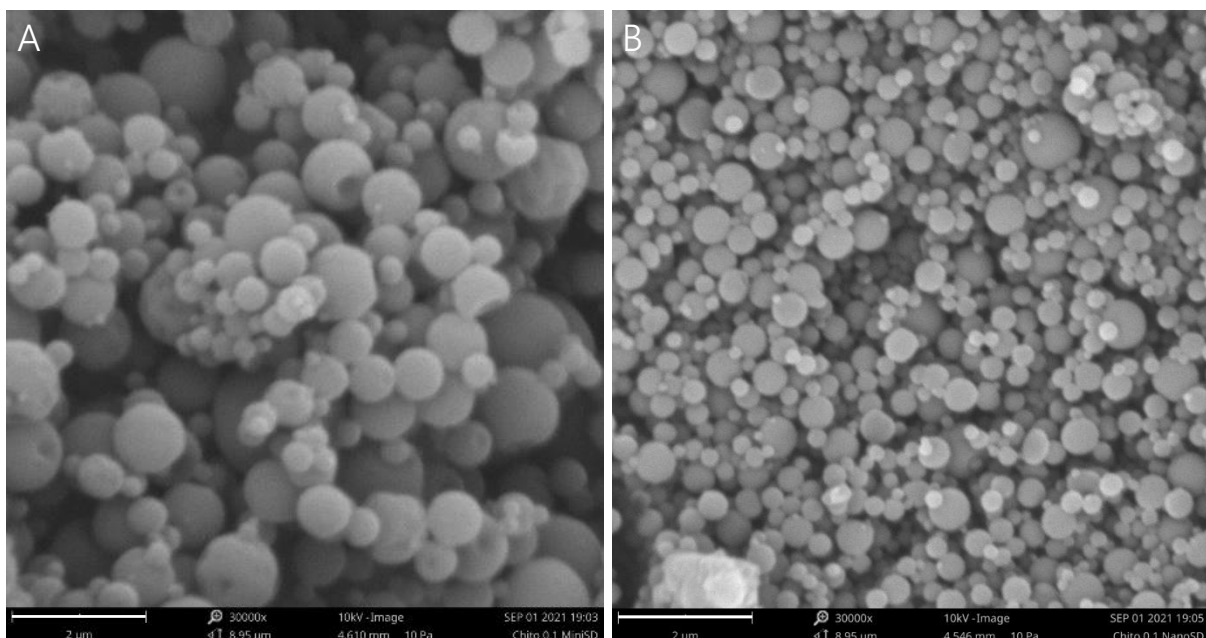


Abbildung 5-47: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der Chitosanpartikel, die aus einer 0,10 %-igen Chitosanlösung mittels Mini-Sprühtrockner (A) und Nano-Sprühtrockner (B) hergestellt wurden; 30000-fache Vergrößerung, mit Gold beschichtet, vermessen bei einer Arbeitsspannung von 10 kV, Balken  $\pm$  2  $\mu\text{m}$

Insgesamt ließen sich die hergestellten Partikel nicht oder nur schwer in Wasser oder PBS-Puffer dispergieren. Ein Grund für die schlechte Dispergierbarkeit kann sein, dass bei der Sprühtrocknung keine Emulgatoren oder andere oberflächenaktive Substanzen eingesetzt wurden. Möglicherweise führt dies dazu, dass sich die hydrophileren Gruppen des Chitosans zum Inneren der Tröpfchen ausrichten und hydrophobere Gruppen zur Grenzfläche hin. Der Zusatz von Emulgatoren zum Dispergiermittel könnte die Dispergierbarkeit der Partikel verbessern, da die Grenzflächenspannung erniedrigt wird. Ohne geeignetes Dispergiermittel ist die Einsetzbarkeit der Produkte jedoch stark eingeschränkt.

## 5.5 Herstellung von Beta-Glucan Partikeln mittels Sprühtrocknung

In diesem Kapitel soll die Herstellung von Partikeln mittels Sprühtrocknung durch den Mini Sprühtrockner B-290 untersucht werden. Ziel ist es, mittels Mini Sprühtrockner Partikel kleiner 1  $\mu\text{m}$  herzustellen. Dafür wurde ein wasserlösliches Beta-Glucan aus *Saccharomyces cerevisiae* (Bäckerhefe) als natürliches Polymer gewählt. Aufgrund seiner Lösungseigenschaften kann dieses Beta-Glucan als einfacher Modellrohstoff verwendet werden, um den Sprühtrocknungsprozess aus einer Lösung zu untersuchen. Da die hergestellten Partikel in physiologischem Medium löslich sind, können sie nicht ohne weitere Modifizierung einen physiologischen Zielort als intakte Partikel erreichen und sind daher ohne Modifikation nicht als Wirkstoffträger fürs Drug Targeting geeignet.

### 5.5.1 Untersuchen des Herstellungsprozesses mittels vollfaktoriellen Versuchsplan

Durch einen vollfaktoriellen Versuchsplan können je nach Anzahl der Faktoren mit wenigen Versuchen schnell die wichtigsten Parameter untersucht werden und eine optimale Parametereinstellung gefunden werden. Der Vorteil eines solchen Versuchsplanes ist, dass durch Einfügen eines Zentralpunktes nicht lineare Zusammenhänge erkannt werden können, ohne den Versuchsaufwand stark zu erhöhen. Beim Sprühtrocknen mit dem Mini Sprühtrockner B-290 gibt es diverse Prozessparameter, die unterschiedliche Effekte auf den Sprühtrocknungsprozess und aufeinander haben. Der Durchfluss der Trocknungsluft wird durch die Aspirator-Leistung eingestellt. Je größer das Luftvolumen ist, das in einem bestimmten Zeitraum durch den Sprühturm fließt, desto mehr Feuchtigkeit kann in der kurzen Trocknungszeit aufgenommen werden. Jedoch sinkt auch die Verweildauer eines Partikels im Trockenzylinder, wodurch dieser evtl. weniger gut getrocknet werden kann. Hat die zugeführte Luft schon zu Beginn der Trocknung eine hohe Feuchtigkeit, kann sie weniger Lösungsmittel aufnehmen. Der Durchfluss der Trocknungsluft beeinflusst auch die Abscheidung im Zyklon [123]. Bei hoher Aspirator-Leistung sollte die Abscheidung im Zyklon steigen [88]. Auch eine hohe Einlasstemperatur begünstigt eine schnelle Trocknung, da pro Kubikmeter Luft absolut mehr Feuchtigkeit aufgenommen werden kann. Eine hohe Auslasstemperatur ist ein Indikator für eine geringe Restfeuchte des Produktes. Je langsamer das Lösungsmittel verdunstet, desto eher entstehen kleine, solide Partikel, da die Substanz genügend Zeit hat sich durch Diffusion gleichmäßig zu verteilen und vollständig zu trocknen, sodass kompakte Partikel entstehen. Schnelles Verdunsten kann hingegen zu porösen, unregelmäßigen Partikeln führen, wenn

die Verdunstungsrate höher ist als die Diffusionsrate. Die Auslasstemperatur wird über die Pump-  
rate bzw. die Verdunstungskälte gesteuert. Je höher der Sprühdruck ist, desto kleiner werden die  
Tröpfchen, die im nächsten Schritt zu Partikeln eintrocknen. Auch die Eigenschaften des Eduktes,  
also der zu trocknenden Lösung, Suspension oder Emulsion, haben Einfluss auf die spätere Parti-  
kelgröße und Form, z.B. entstehen bei einem geringen Feststoffanteil kleine Partikel.

Um eine gute Abscheidung der Partikel zu erzielen, wurde für diese Versuchsreihe eine Aspirator-  
Leistung von 100 % gewählt. Der Sprühdruck wurde auf 60 mm eingestellt, um kleine Partikel zu  
erhalten und um zu verhindern, dass der Sprühkegel bis an den Rand des Sprühturmes reicht.  
Variiert wurden die Einlasstemperatur, die Feststoffkonzentration der Lösung und die Auslasstem-  
peratur, die über die Pumprate eingestellt wurde. Die gewählten Faktorstufen sind in Tabelle 5-33  
zusammengefasst.

*Tabelle 5-34: Parametereinstellung des vollfaktoriellen Versuchsplans zur Untersuchung der Her-  
stellungsmethode von wasserlöslichen Beta-Glucan-Partikeln mittels Sprühtrocknung*

Parameter	Tief	Mittel	Hoch
Einlasstemperatur [°C]	90	100	110
Auslasstemperatur [°C]	40	50	45
Konzentration [% (m/V)]	0,1	0,55	1,0

Für die oben genannten Parameter und Faktorstufen wurde ein randomisierter vollfaktorieller  
Versuchsplan erstellt, die Partikel nach Versuchsplan hergestellt und die Ausbeute sowie die Parti-  
kelgrößenverteilung bestimmt (Tabelle 5-35). Im Anschluss wurde der Versuchsplan mittels Mi-  
nitab 18 Software nach  $x_{50}$ , Span und Ausbeute analysiert.

Tabelle 5-35: Parametereinstellungen und Ergebnisse des vollfaktoriellen Versuchsplans zur Untersuchung der Herstellungsmethode von wasserlöslichen Beta-Glucan-Partikel mittels Sprühtrocknung

Probe	Konzentration [%]	Einlass-temperatur [°C]	Auslass-temperatur [°C]	Pump-rate [%]	X <sub>10</sub> [µm]	X <sub>50</sub> [µm]	X <sub>90</sub> [µm]	Span	Ausbeute [%]
N9	0,55	100	45	20	0,37	1,17	2,32	1,75	71,1
N2	1	90	40	28	0,22	1,40	2,86	1,89	69,0
N5	0,1	90	50	14	0,30	0,93	1,91	1,74	35,3
N8	1	110	50	25	0,25	1,31	2,71	1,88	77,7
N1	0,1	90	40	23-26	0,30	0,90	1,67	1,52	37,7
N11	0,55	100	45	20	0,32	1,15	2,30	1,72	71,4
N7	0,1	110	50	29-34	0,31	0,98	1,86	1,59	39,6
N10	0,55	100	45	29	0,35	1,14	2,31	1,72	72,2
N4	1	110	40	44	0,42	1,49	3,11	1,80	63,6
N6	1	90	50	14-15	0,39	1,37	2,66	1,66	69,9
N3	0,1	110	40	43	0,31	0,97	2,26	2,01	36,7

Der  $x_{50}$  der hergestellten Partikel liegt zwischen 0,90 µm und 1,49 µm. Die Ausbeute schwankt stark zwischen 35 % und 78 %, wobei auffällt, dass die Ausbeute der Produkte mit einem  $x_{50} < 1$  µm mit unter 40 % besonders gering ist. Dies ist wahrscheinlich auf die Abscheidetechnik des Sprühtrockners zurückzuführen. Sehr kleine Partikel können nicht durch den Hochleistungszyklon abgetrennt werden. Ist der Anteil dieser kleinen Partikel, die nicht als Produkt abgeschieden werden, sehr hoch, führt dies zu einer geringen Ausbeute.

Tabelle 5-36 fasst die wichtigsten Kennzahlen des ausgewerteten Versuchsplanes zusammen. Für den Span konnte kein signifikanter Einflussfaktor identifiziert werden. Dies liegt möglicherweise auch daran, dass die Span-Werte dicht beieinander liegen. Ist der Effekt gering, kann oft keine signifikante Einflussgröße ermittelt werden, da dieser nicht vom Rauschen unterschieden werden kann. Von den untersuchten Prozessparametern hat die Einlasstemperatur den größten Einfluss auf die Ausbeute. Jedoch ist das Modell mit einem p-Wert von 0,089 und einem prognostizierten  $R^2$  von 0 nicht aussagekräftig. Während die Einlass- und Auslasstemperatur keinen signifikanten Einfluss auf die mittlere Partikelgröße haben, ist der Einfluss der Feststoffkonzentration sehr signifikant. Das Modell weist eine geringe Standardabweichung auf sowie eine gute

Vorhersagbarkeit für den  $x_{50}$ -Wert von zukünftigen Produkten, der mittels Formel 5-18 berechnet werden kann. Im Haupteffektdiagramm (Abbildung 5-48) des  $x_{50}$ -Wertes kann man leicht erkennen, dass bei steigender Beta-Glucan-Konzentration die mittlere Partikelgröße ansteigt.

Tabelle 5-36: P-Werte der Parameter für die jeweiligen Antwortvariablen und Modellzusammenfassung des vollfaktoriellen Versuchsplans zur Untersuchung der Herstellungsmethode von wasserlöslichen Beta-Glucan-Partikel mittels Sprühtrocknung nach Rückwärtselimination;  $\alpha$  für Abschluss = 0,1; \*\* = ohne Wert, da das Modell keine Terme enthält

Parameter	Antwort Variable		
	$X_{50}$	Span	Ausbeute
Konzentration [%]	0,000	**	nicht signifikant
Einlasstemperatur [°C]	nicht signifikant	**	0,089
Auslasstemperatur [°C]	nicht signifikant	**	nicht signifikant
p-Wert des Modells	0,000	**	0,089
S	0,0493966 $\mu\text{m}$	**	15,2836 %
R <sup>2</sup> [%]	94,80	**	28,76
R <sup>2</sup> (prog) [%]	91,63	**	0,00

$$X_{50} = 0,8911 + 0,4972 \text{ Konzentration} \quad \text{Formel 5-18}$$

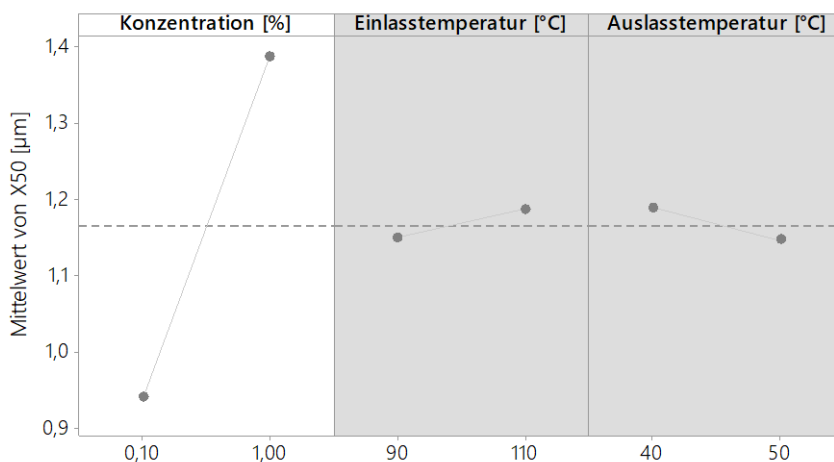


Abbildung 5-48: Haupteffektdiagramm für  $x_{50}$  des vollfaktoriellen Versuchsplans zur Untersuchung der Herstellungsmethode von wasserlöslichen Beta-Glucan-Partikel mittels Sprühtrocknung; nicht im Modell enthaltene Terme sind grau hinterlegt

Bei der Herstellung der Beta-Glucan Partikel mittels Sprühtrocknung entstanden gut fließende feine Pulver, die wenige größere, leicht zerstörbare Agglomerate enthielten. Die Partikel der Probe

N1 wurden mittels Elektronenmikroskop visualisiert (Abbildung 5-49). Die Partikel weisen überwiegend eine runde Form auf. Ein Großteil der Partikel ist an ein oder mehreren Stellen eingedellt.

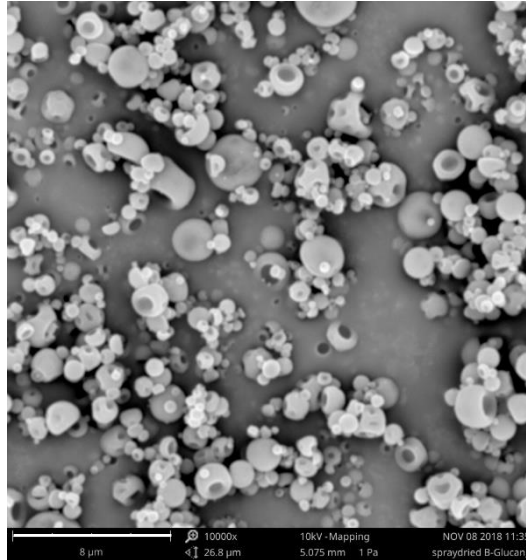


Abbildung 5-49: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der mittels Sprühtrocknung hergestellten Beta-Glucan-Partikel 10000-fache Vergrößerung, vermessen bei einer Arbeitsspannung von 10 kV, Balken  $\cong 8 \mu\text{m}$

### 5.5.2 Fazit

Sprühtrocknung ist ein geeignetes Verfahren, um runde Partikel definierter Größe aus einer Lösung, Suspension oder Emulsion herzustellen. Betrachtet man den Sprühtrocknungsprozess genauer, gibt es einige Herstellungsparameter mit denen sich die Partikelgröße, Form, Ausbeute und Restfeuchte einstellen lassen. Bei dem in diesem Kapitel betrachteten Herstellungsprozess lässt sich die Partikelgröße ausschließlich mittels Feststoffkonzentration steuern. Dass andere Prozessparameter einen nicht signifikanten Einfluss auf die Partikelgröße haben, kann unter anderem daran liegen, dass sich diese nicht so weit variieren lassen, wie die Feststoffkonzentration einer gut löslichen Substanz und daher der Effekt nicht größer als das Rauschen ist. Werden sehr kleine Partikel hergestellt, ist die Ausbeute gering, da ein Großteil der Partikel nicht vom Luftstrom getrennt werden kann. Mit dem Minisprühtrockner B-290 der Firma Büchi lassen sich Partikel kleiner 1  $\mu\text{m}$  herstellen, wenn auch mit einer geringen Ausbeute von unter 40 %.

## 5.6 Vergleich der verschiedenen Herstellungsmethoden

Bevor nanopartikuläre Wirkstoffträger hergestellt werden können, muss eine geeignete Herstellungsmethode ausgewählt oder entwickelt werden. Diese Herstellungsmethode sollte die Eigenschaften des Wirkstoffes und der Hilfsstoffe berücksichtigen und geeignet sein, um Polymerpartikel herzustellen, die dem Zielproduktprofil entsprechen. Die Herstellungsmethode muss zu Beginn noch keine Partikel generieren, die allen definierten Qualitätsmerkmalen entsprechen, da eine Anpassung der Methode in der späteren Optimierungsphase möglich ist.

Um die Auswahl einer geeigneten Herstellungsmethode zu vereinfachen, wurden in dieser Arbeit verschiedene Methoden zur Herstellung von Polymernanopartikeln vorgestellt. Um ein umfangreiches Prozessverständnis zu gewinnen, wurden ausgewählte Methoden angewendet, genauer untersucht und im Hinblick auf das Erreichen des Zielproduktprofils optimiert.

In diesem Kapitel meiner Arbeit soll zusammengefasst werden, welche Methoden bei bestimmten Wirkstoff- und Polymereigenschaften zur Herstellung von nanopartikulären Trägern geeignet sind, welche wesentlichen Unterschiede es gibt und welche Vor- und Nachteile die jeweiligen Methoden bieten.

Wirkstoffeigenschaften, die einen wesentlichen Einfluss auf ihre Verarbeitbarkeit in oder an nanopartikulären Träger haben, sind in erster Linie die Löslichkeit, die Ladung bzw. Polarität des Wirkstoffes sowie das Molekulargewicht. Die ersten beiden sollten bei der Auswahl einer geeigneten Herstellungsmethode berücksichtigt werden, da sie Einfluss darauf haben, in welcher Phase der Wirkstoff gelöst werden kann und ob eine direkte Interaktion mit dem Polymer, z.B. durch ionische Wechselwirkungen, möglich ist. Das Molekulargewicht kann, je nach Herstellungsmethode, einen Einfluss auf die Beladungseffizienz haben. Dies wurde z.B. von Diedrich und Valentin für Proteine gezeigt, die mittels ionischer Gelierung verkapselt wurden [124,125]. Es gibt auch Wirkstoffeigenschaften, die zwar keinen direkten Einfluss auf den Herstellungsprozess haben, die dennoch vor Auswahl der Herstellungsmethode berücksichtigt werden sollten. Dazu gehören vor allem die Potenz des Wirkstoffes und die daraus resultierende benötigte Konzentration des Wirkstoffes am Wirkort. Bei hochpotenten Wirkstoffen reicht eine geringe Wirkstoffbeladung bereits aus, um ein funktionelles Drug Delivery System zu bilden. Wirkstoffe mit geringerer Potenz müssen in weit höheren Konzentrationen im Vehikel vorliegen. Daher sind für diese nur Methoden mit einer hohen Beladungskapazität geeignet. Für das genaue Design des Drug Delivery Systems

sollte im Vorfeld bekannt sein, wie der Wirkmechanismus des Wirkstoffes ist, welcher Wirkort angesteuert werden soll und welche Gewebe und Zellen aufgrund seiner Toxizität und seines Nebenwirkungsspektrums umgangen werden sollen. Da dies für jedes Drug Delivery System sehr individuelle Aspekte sind, sollten sie im Zielproduktprofil berücksichtigt werden und beim Designen des Drug Delivery Systems und der Auswahl des Polymers besonders berücksichtigt werden.

Die Auswahl des Polymers und die Auswahl einer Herstellungsmethode bedingen sich gegenseitig. Nach genauerer Betrachtung des Wirkstoffes können mehrere Polymere wie auch Herstellungsmethoden im Fokus stehen. Es sollten nur Polymere in Betracht gezogen werden, die mit dem Wirkstoff kompatibel sind. Treten ungewollte Wechselwirkungen zwischen Wirk- und Hilfsstoffen auf, kann dies zu einem Versagen des Drug Delivery Systems führen. Im Zielproduktprofil sollte definiert werden, welcher Anspruch an die Freisetzung des Wirkstoffes besteht und welche Eigenschaften das Polymer dementsprechend mit sich bringen muss. Polymere, die physiologisch schnell zersetzt werden, setzen Wirkstoffe potenziell schneller frei als stabilere Polymere. Polymereigenschaften, die einen direkten Einfluss auf die Verarbeitbarkeit mit einer bestimmten Herstellungsmethode haben, sind wie beim Wirkstoff die Löslichkeit, die Ladung bzw. Polarität des Polymers sowie das Molekulargewicht. Diese Eigenschaften beeinflussen, ob das Polymer in derselben Phase wie der Wirkstoff gelöst wird und welche Wechselwirkungen das Polymer eingehen kann. Ist ein Polymer schwer oder gar nicht löslich, stehen nur die Top Down Methoden zur Auswahl. In dem Fall müsste der Wirkstoff nach Partikelherstellung in das System eingebracht werden.

Aus Abbildung 5-50 kann entnommen werden, welche Herstellungsmethoden potenziell verwendet werden können, wenn Wirkstoff und Polymer bestimmte Lösungseigenschaften besitzen oder geladen sind. Werden die zur Auswahl stehenden Herstellungsmethoden im Anschluss gegen das Zielproduktprofil abgeglichen, sollte sich bereits herauskristallisieren, welche Methoden zielführend sein können.

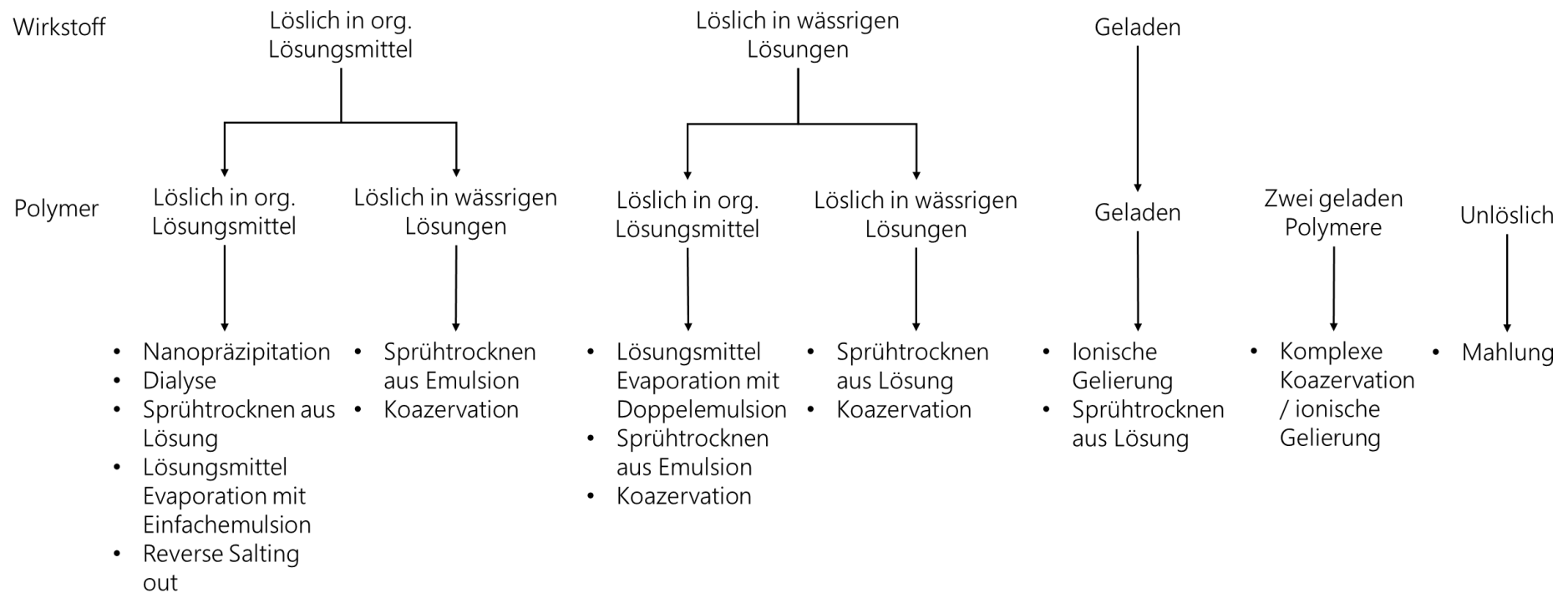


Abbildung 5-50: Auflistung potenzieller Herstellungsmethoden für nanopartikuläre Wirkstoffträger aus Polymeren in Abhängigkeit von Löslichkeit und Ladung von Wirkstoff und Polymer, Erläuterungen im Text

Neben bestimmten Eigenschaften des Wirkstoffes und des Polymers sollten auch gewünschte Eigenschaften des Drug Delivery Systems in die Methodenauswahl einfließen. Die Position des Wirkstoffes bzw. seine Verteilung im Drug Delivery System hat großen Einfluss auf seine Freisetzung [126]. Bei Nanokapseln und Nanosphären wird die Freisetzung durch die Zersetzung des Polymers oder die Diffusion des Wirkstoffes durch die Matrix bestimmt [127]. Ist der Wirkstoff an der Oberfläche adsorbiert, bestimmt die Desorption den Freisetzungsprozess [127]. Auch die Stabilität des Wirkstoffes und sein in vivo Abbau kann durch den Aufbau des Drug Delivery Systems beeinflusst werden. Oberflächennahe Strukturen reagieren zuerst mit dem umgebenden Medium [127]. Ist der Wirkstoff an der Oberfläche des nanopartikulären Trägers adsorbiert, könne dieser schneller abgebaut werden, als wenn der Wirkstoff in einem stabilen Polymer verkapselt ist. Um das Drug Delivery System in Hinblick auf die gewünschte Pharmakokinetik zu optimieren, sollte klar definiert sein, welches Zielgewebe bzw. welche Zielzelle erreicht werden soll, in welchen Zell- oder Gewebetypen sich der Wirkstoff nicht oder nur in geringen Konzentrationen verteilen soll und ob es bestimmte Anforderungen an die Metabolisierung oder Elimination gibt.

Bei der Auswahl einer Herstellungsmethode ist nicht nur wichtig, ob sich durch sie Partikel generieren lassen, sondern auch, ob diese Partikel dem Zielproduktprofil entsprechen können. Jede Herstellungsmethode hat Vor- und Nachteile und vor allem ihre Grenzen. Selbst durch eine ausführliche Optimierungsphase kann nicht mit jeder Herstellungsmethode ein Drug Delivery System hergestellt werden, das den Anforderungen entspricht. Anforderungen, die eine Herstellungsmethode ausschließen, sind zum Beispiel eine hohe Beladungskapazität, eine enge Partikelgrößenverteilung, der Einsatz von bestimmten Lösungsmitteln, die evtl. nicht vollständig entfernt werden können oder das Risiko den Wirkstoff durch Einsatz von Hitze, Säure, Scherkräften oder anderen physikalischen oder chemischen Stress zu zerstören.

Bei der Nanopräzipitation werden Polymer und Wirkstoff in einem Lösungsmittel gelöst, das mit einem Nichtlösungsmittel, meist Wasser, mischbar ist. Durch das Zugabe des Nichtlösungsmittels fallen Polymer und Wirkstoff als Partikel aus [29]. Die Partikelgröße wird hauptsächlich über die Stabilisatorart und -konzentration gesteuert, sowie über die Polymerkonzentration und die Löslichkeit des Polymers im Lösungsmittelgemisch [30,128]. Diese Einflussparameter sind gut und reproduzierbar einstellbar. Auch die Partikel, die dabei entstehen, weisen eine gut definierte Partikelgröße mit enger Partikelgrößenverteilung auf [30]. Die Partikelgrößenverteilung und

Skalierbarkeit lässt sich verbessern, indem man die Methode mit der Mikrofluidtechnologie kombiniert. Neben all diesen Vorteilen handelt es sich bei der Nanopräzipitation zudem um eine Herstellungsmethode, für die man nur einfaches Equipment benötigt und die einen geringen Zeitaufwand erfordert. Schwächen dieser Methode sind die begrenzte Beladungseffizienz und -kapazität. Besonders die Beladung mit hydrophilen Wirkstoffen fällt aufgrund der schnellen Diffusion in die wässrige Phase gering aus, kann jedoch durch Änderung des pH-Wertes oder Salzzugabe verbessert werden [128]. Ein weiterer Nachteil ist die eingeschränkte Auswahl der Lösungsmittel, da Lösungsmittel und Nichtlösungsmittel miteinander mischbar sein müssen und beide zudem biokompatibel sein müssen.

Die Dialysemethode unterscheidet sich von der Nanopräzipitation hauptsächlich dadurch, dass Lösungsmittel und Nichtlösungsmittel durch eine Membran mit definiertem Cut-Off getrennt werden. Vorteil der Membran ist, dass durch den passiven Transport von Lösungsmitteln die Partikelgröße besser gesteuert werden kann [30]. Zudem ist die Partikelgrößenverteilung des Produktes gering [30]. Die Methode ist jedoch deutlich langsamer, erfordert mehr Equipment und ist nicht skalierbar, im Gegensatz zur Nanopräzipitation.

Bei Methoden, bei denen zuerst Tröpfchen hergestellt werden, sei es als Emulsion oder Nebel, wird die Partikelgröße und Partikelgrößenverteilung von der Tröpfchengröße bzw. Tröpfchengrößenverteilung mitbestimmt. Entweder bildet sich aus einem Tröpfchen ein Nanopartikel, oder für den Fall, dass es zu Koaleszenz kommt, entsteht ein Nanopartikel aus mehreren Tröpfchen [129]. Ein Nanopartikel besteht dementsprechend aus ähnlich viel Polymer, wie vorher in dem Tröpfchen bzw. den Tröpfchen vorhanden war. Entstehen keine hohlen oder porösen Partikel, müsste die Partikelgröße direkt von der Polymerkonzentration im Tröpfchen abhängen. Daraus ergibt sich der Vorteil, dass die Partikelgröße über die Tröpfchengröße gut gesteuert werden kann und zugleich der Nachteil, dass die Partikelgrößenverteilung oft sehr weit ist, da bei den meisten Herstellungsmethoden die Tröpfchengröße sehr ungleichmäßig ist und es zudem zu Koaleszenz kommen kann. Um eine engere Tröpfchengrößenverteilung zu erhalten, könnte eine Emulsion oder ein Nebel wie beim Nanosprühtrockner mithilfe einer Membran hergestellt werden. Die Tröpfchengröße ist dann durch die Porengröße der Membran vordefiniert. Durch diese Technik lassen sich unter bestimmten Bedingungen monodisperse Emulsionen herstellen [130]. Dies wäre

eine Möglichkeit, um auch bei der Einfach- und Doppelemulsion-Lösungsmittelveaporationsmethode und der Reverse Salting-Out Methode eine engere Partikelgrößenverteilung zu erzielen.

Die Herstellung von Nano- und Mikropartikeln mittels Sprühtrocknung hat außerdem den Vorteil, dass dies auch ohne Einsatz eines organischen Lösungsmittels geschehen kann [131]. Zudem handelt es sich um ein kontinuierliches und reproduzierbares Verfahren [132]. Das Produkt ist ein trockenes Pulver, das physikalisch, chemisch und mikrobiologisch stabiler ist als eine Suspension. Durch das Versprühen einer Lösung, Suspension oder Emulsion kann ein komplexer Partikelaufbau erreicht werden, wie dies zum Beispiel bei der Herstellung von Nano- in Mikropartikeln der Fall ist [85]. Da das Lösungsmittel oft durch Wärme evaporiert wird, ist diese Methode nur bedingt für wärmelabile Wirkstoffe oder Polymere mit geringem Schmelzpunkt geeignet. In jedem Fall sollte die Auslasstemperatur entsprechend gewählt werden. Nachteil dieser Methode ist, dass die trockenen Pulverpartikel vom Luftstrom getrennt werden müssen. Wie in Kapitel 5.4 gezeigt, ist eine effiziente und vollständige Abscheidung für Partikel im Nanometerbereich eine Herausforderung. Werden die Partikel über einen Zyklon abgeschieden, kann man zwar einen großen Durchsatz erzielen, verliert jedoch einen Großteil der Partikel unter einem Mikrometer. Die Sammelelektrode des Nanosprühtrockners ist bei der Abscheidung kleiner Partikel deutlich effizienter, dieses Verfahren ist jedoch zu zeitaufwändig, um große Mengen Nanopartikel herzustellen. Sprühtrocknungsverfahren, bei denen eine Tröpfchenherstellung mittels Vernebler mit der Abscheidetechnik einer Sammelelektrode kombiniert wird, birgt meiner Meinung nach dennoch ein großes Potential. Ein Kompressor- oder Ultraschallvernebler oder eine größere Membranfläche könnten zu einem höheren Durchsatz führen, wobei bei Verwendung von Kompressor- oder Ultraschallverneblern auch mit einer breiteren Partikelgrößenverteilung zu rechnen ist.

Die Lösungsmittelveaporation bietet den Vorteil, dass sowohl lipophile als auch hydrophile Wirkstoffe in nanopartikuläre Träger eingebracht werden können, je nachdem, ob zuvor eine Einfach- oder eine Doppelemulsion hergestellt wurde [133]. Zudem ist es möglich eine hohe Beladungseffizienz zu erzielen wie in Kapitel 5.1 gezeigt wurde. Nachteilhaft ist es, dass flüchtige organische Lösungsmittel eingesetzt werden, wovon einige, wie zum Beispiel Dichlormethan, toxisch sind [133]. Vor Einsatz am Menschen muss auf Lösungsmittelrückstände geprüft werden. Das Evaporieren des Lösungsmittels ist meist zeitaufwändig, kann aber durch Einsatz eines Rotationsverdampfers beschleunigt werden.

Wird die Reverse Salting-Out Methode angewendet, können auch mit Wasser mischbare Lösungsmittel verwendet werden [30]. Diese weisen oft eine geringere Toxizität auf als Lösungsmittel, die nicht mit Wasser mischbar sind. Aufgrund der Lösungsmittelauswahl ist diese Methode besonders praktisch, wenn Wirkstoff und Polymer in polaren Lösungsmitteln löslich sind. Dadurch, dass der wässrigen Phase eine große Salzmenge hinzugefügt wird, bilden sich die zwei Phasen der Emulsion aus [30]. Die hohe Salzkonzentration der kontinuierlichen Phase kann jedoch die Stabilität einiger Wirkstoffe beeinflussen. Zudem kann es eine Herausforderung darstellen, das restliche Salz aus dem Endprodukt zu entfernen.

Damit sich aus Polymeren Nanopartikel mittels Koazervation herstellen lassen, sollten die Polymerstränge eine gewisse Affinität zueinander haben und durch Änderung des pH-Wertes, Temperatur, Ionenstärke oder des Lösungsmittels zur Phasenseparation neigen [35]. Bei der einfachen Koazervation kommt es aufgrund einer Dehydratisierung des Polymers zur Ausbildung des Koazervats [35]. Bei der komplexen Koazervation wird dieser Prozess durch elektrostatische oder hydrophobe Wechselwirkungen, Van-der-Waals-Kräfte oder dem Ausbilden intermolekularer Wasserstoffbrückenbindungen ausgelöst [35]. Damit sich wirkstoffhaltige Partikel bilden, sollte die Grenzflächenspannung zwischen partikulärem Wirkstoff und Koazervat sehr gering sein, sodass das Polymer den Wirkstoffpartikel komplett umhüllt [34]. Bei gelöstem Wirkstoff sollte sich der Wirkstoff in der Koazervatphase anreichern. Dementsprechend ist diese Methode nur geeignet, wenn Wirkstoff, Polymer bzw. Polymere und Solvent in einem bestimmten Affinitätsverhältnis zueinanderstehen. Wenn die Edukte zu dieser Herstellungsmethode passen, bietet sie den Vorteil, dass es sich um ein schonendes Verfahren handelt, das auch für empfindliche Substanzen geeignet ist. Zudem kann teilweise oder komplett auf organische Lösungsmittel verzichtet werden.

Bei der ionischen Gelierung entstehen Gelpartikel aus einem geladenen Polymer, das elektrostatische Wechselwirkungen mit einem mehrfach geladenen Gegenion oder einem mehrfach geladenen anderen Polymer eingeht. Diese Methode ist dementsprechend auf geladene Polymere beschränkt. In Kapitel 5.2 wurde gezeigt, dass es sich um ein sehr empfindliches System handelt, das nicht leicht steuerbar ist. Die in Kapitel 5.3 durchgeführten Versuche zeigen, dass, selbst wenn Polymere in der Lage sind, Gelpartikel auszubilden, es immer noch eine große Herausforderung ist, dass sich diese im Nanometerbereich befinden. Wenn passende Reaktionsbedingungen gefunden wurden, bietet diese Methode milde Reaktionsbedingungen, die auch für empfindliche

Wirkstoffe geeignet sind. Zudem ist sie einfach und mit wenig Equipment durchführbar. Eine bessere Skalierbarkeit kann durch das Einsetzen eines Mikromischers erreicht werden.

Sind Polymere komplett unlöslich, stehen die bislang genannten Methoden zur Herstellung von Nanopartikeln nicht zur Auswahl. Möchte man dennoch Partikel aus diesen Polymeren gewinnen, können Top Down Methoden gewählt werden. Eine oft verwendete Top Down Methode ist die Mahlung, insbesondere Nassmahlungen sind für die Herstellung von Nanopartikeln geeignet. Die Mahlung bietet den großen Vorteil, dass sie anwendbar für die unterschiedlichsten Materialien ist. Um elastisch verformbare Polymere zu zerkleinern, kann die Herstellungstemperatur gesenkt werden [134]. Eine Mahlung birgt die Gefahr, dass es zum Bruch von kovalenten Bindungen kommt und das Polymer zerstört bzw. verändert wird [134]. Zudem kann es zu einer Kontamination des Produktes durch das Mahlmedium oder Mahlkugeln kommen.

## 6 Gesamtfazit

Auch wenn Nanopharmazeutika ein großes Potential in vielen Bereichen der Therapie, Diagnostik und Prävention von Krankheiten bieten, haben bislang nur eine kleine Anzahl ihren Weg in die therapeutische Anwendung gefunden. Dies liegt unter anderem daran, dass die gezielte Herstellung und die herstellbegleitende Analytik zur Sicherstellung der Qualität dieser Nanopharmazeutika immer noch eine Herausforderung darstellt. In der frühen Phase der Formulierungs- und Methodenentwicklung steht das Finden und Optimieren einer Herstellungsmethode im Fokus, die zielsicher und reproduzierbar zu einem Produkt mit definierter Qualität führt.

Um zukünftige Entwicklungen einfacher zu gestalten, war es Ziel dieser Arbeit, eine Strategie zu entwickeln, wie Methoden zur Herstellung von nanopartikulären Wirkstoffträgern untersucht und optimiert werden können, so dass zielsicher Partikel mit konstanter Qualität entstehen. Die Herstellungsmethoden sollen durch dieses strategische Vorgehen besser verstanden werden und der Prozess kontrollierbar und steuerbar gemacht werden. Zusätzlich sollten verschiedene Herstellungsmethoden miteinander verglichen werden, um leichter zu verstehen, mit welchen Methoden nanopartikuläre Wirkstoffträger mit den gewünschten Eigenschaften hergestellt werden können und welche für bestimmte Fälle nicht oder weniger gut geeignet sind.

Um dieses Ziel umzusetzen, wurden in dieser Arbeit verschiedene Herstellungsmethoden durchgeführt und untersucht, während weitere Herstellungsmethoden im Methodenvergleich theoretisch behandelt wurden. Im praktischen Teil wurden zwei Varianten der Doppalemulsion-Lösungsmittelveaporationsmethode zur Herstellung von PLGA-Nanopartikeln unter Anwendung des Prinzipes Quality by Design ausführlich untersucht, optimiert und miteinander verglichen. Im Anschluss wurden beide Varianten kombiniert, um eine möglichst große Vielfalt an Nanopartikeln mit unterschiedlichen, aber definierten Eigenschaften herzustellen.

Ein ähnlicher, etwas verkürzter Ansatz wurde für die Herstellung von Chitosan-Carboxymethylcellulose-Nanopartikeln mittels ionischer Gelierung gewählt. Nachdem die Methode ausführlich mittels Screening- und Wirkungsflächenversuchsplan untersucht und optimiert wurde, sollten im Anschluss die finalen Partikel hergestellt werden. Dies gelang nur mäßig, was möglicherweise auf den weiten Bereich und die Höhe der Zielproteinbeladung zurückzuführen ist, die gewählt wurden.

Für die Optimierung der sprühgetrockneten Beta-Glucan Partikel wurde statt einer Kombination aus Screening- und Wirkungsflächenversuchsplan eine einschrittige Optimierung mittels vollfaktoriellen Versuchsplan gewählt. Durch diesen Ansatz kann mit wenig Aufwand eine Methode gut untersucht und optimiert werden, wenn nur wenige Parameter untersucht werden sollen. Da kein Wirkungsflächenversuchsplan durchgeführt wird, können oftmals keine Aussagen über Krümmungen und Wechselwirkungen getroffen werden. Wenn der Einfluss der Parameter im gewählten Bereich weitestgehend linear ist, kann die Optimierung eines Produktes mit weniger Aufwand genauso genau und erfolgreich sein.

Nachdem drei Herstellungsmethoden nach dem Prinzip von Quality by Design und mittels statistischer Versuchsplanung optimiert wurden, konnte ich mir ein ausführliches Bild über den Nutzen dieses Ansatzes machen. Zudem wurde dadurch besser verständlich welches Vorgehen für eine gezielte Optimierung gewählt werden sollte und worauf bei einer solchen Optimierung geachtet werden sollte.

Bei der Entwicklung von neuen Arzneimitteln nach dem Prinzip von Quality by Design ist ein gut und klar definiertes Zielproduktprofil der Schlüssel für eine gezielte Methodenentwicklung und Methodenoptimierung. Dies ist wichtig, da auf diesem QTPP die Auswahl der kritischen Qualitätsmerkmale basiert. Wird zu Beginn einer Entwicklung ein Produktmerkmal nicht untersucht, das aber relevant für die Qualität des Endproduktes ist, entsteht möglicherweise eine Lücke in der Entwicklung, die nur mit hohem Aufwand wieder geschlossen werden kann. Eventuell muss ein kompletter Abschnitt der Entwicklung wiederholt werden. Die Zielwerte der CQA bzw. die Spezifikationen sollten zudem so gewählt werden, dass sie das Erreichen des QTPP sicherstellen. Dies erfordert bereits ein gewisses Vorwissen über den klinischen Effekt eines Produktes, das in einer sehr frühen Phase der Entwicklung möglicherweise noch nicht vorhanden ist. Die Zielwerte können sich daher im Laufe einer Entwicklung verändern. Wird ein neu definierter Zielwert von den Ergebnissen der statistischer Versuchsplanung und dem multidimensionalen Versuchsraum abgedeckt, bedarf es keiner neuen Optimierung der Methode. Im besten Fall weiß man zu diesem Zeitpunkt der Entwicklung bereits, welche Parameterkombination zu dem spezifizierten Zielwert führt.

Bei der Optimierung einer Herstellungsmethode erwies es sich als sehr hilfreich diese in bestimmte Phasen einzuteilen. Jede Methodenoptimierung sollte mit einem praktischen

Ausprobieren der Herstellungsmethode anfangen. Bei diesen Vorversuchen sollte genau beobachtet werden, welche Herstellungsparameter es gibt, die potenziell die Eigenschaften des Endproduktes beeinflussen können. Diese Erkenntnisse sind für die Planungsphase der Optimierung wichtig. In der Planungsphase sollten möglichst alle Prozessparameter gesammelt werden, die Einfluss auf das Endprodukt und die CQA haben können. Für die Herstellung der PLGA-NP hatte ich mich für einen systematischen Ansatz mittels Ursachen-Wirkungsdiagramm entschieden. Dies hat sich als sehr nützlich erwiesen, um systematisch Einflussfaktoren zu sammeln. Ein wesentlicher Teil der Planungsphase ist das Auswählen der Einflussfaktoren, die untersucht werden sollen. Dabei sollten neben dem erwarteten Effekt auch der Aufwand und damit verbundene Kosten berücksichtigt werden. Fundiertes Wissen über die Methode ist bei der Auswahl sehr nützlich. Eine ausführliche Recherche ist insbesondere bei komplexen Methoden äußerst hilfreich, jedoch auch mit einem hohen Zeitaufwand verbunden. Bei weniger komplexen Herstellungsprozessen oder bei Prozessen, die in ähnlicher Form bereits häufiger durchgeführt wurden, lässt sich dank des vorhandenen allgemeinen Prozessverständnisses oft auch in kurzer Zeit eine fundierte Auswahl treffen. Handelt es sich um besonders aufwendige Methoden, große Chargen oder kostspielige Materialien, rechnet sich eine intensivere Planungsphase meistens. Um den Aufwand nicht unnötig groß zu gestalten, sollte berücksichtigt werden, dass nicht alle Einflussfaktoren untersucht werden müssen, um den Prozess und die CQA gut steuern zu können.

Sollen mehrere Parameter untersucht werden, sprich je nach Aufwand der Methode mehr als drei oder vier, empfiehlt es sich die Methodenoptimierung in eine Screening Phase und eine Optimierungsphase einzuteilen. Besteht bereits ein gutes allgemeines Wissen über die Herstellungsmethode und ist der Effekt der unterschiedlichen Prozessparameter bekannt, können diese zwei Phasen zusammengefasst werden oder nur eine Optimierungsphase durchgeführt werden. Durch Screening-Versuchspläne können viele Parameter gleichzeitig untersucht werden und jene identifiziert werden, die den größten Effekt auf die CQA haben. Zudem erfährt man, welche der untersuchten Prozessparameter unkritisch für die CQA sind. Diese Phase ist dementsprechend kein einfacher Vorversuch der Optimierungsphase, sondern eine komplett eigenständige, wertvolle Phase der Entwicklung. Erkenntnisse dieser Phase können bis zum Ende einer Entwicklung zur Entscheidungsfindung beitragen. Wie der Name schon sagt, ist die Optimierungsphase der Kern einer jeden Optimierung. Auch wenn nur wenige Parameter untersucht werden, können die Erkenntnisse dieser Phase ausreichen, um ein Produkt nach Wunsch anzupassen und zu

modellieren. Durch Wirkungsflächenversuchspläne können Wechselwirkungen zwischen den Parametern und Krümmungen der einzelnen Parameter gleichzeitig aufgedeckt werden. Sind bei einer Methode Wechselwirkungen und Krümmungen in relevantem Maß vorhanden, ist die Vorhersagbarkeit von Screening und vollfaktoriellen Versuchsplänen nicht mehr ausreichend, um die spezifizierten CQA durch gezieltes Anpassen der Prozessparameter zu treffen. In solchen Fällen sind Wirkungsflächenversuchspläne unverzichtbar, um komplexe Zusammenhänge adäquat abzubilden und um die CQA zu erreichen.

Um die Optimierung und die daraus gewonnenen Erkenntnisse zu bestätigen, sollte zum Abschluss eine Verifizierungsphase angeschlossen werden. In dieser Phase werden zuerst aus gewählten Prozessparametern die theoretischen Werte der CQA bestimmt und dann das Produkt hergestellt. Die tatsächlichen Ergebnisse sollten dann innerhalb des Konfidenzintervalls liegen. Das Herstellen der finalen Partikel kann auch als Verifizierungsphase angesehen werden. Je nach Aufwand einer Methode, empfiehlt es sich zunächst, eine Charge herzustellen und vollständig zu analysieren, bevor weitere Chargen hergestellt werden. Wenn man es für angemessen hält, kann man auch direkt nach einem Screening-Versuchsplan einen Verifizierungsschritt einbauen. Treffen die Ergebnisse die Erwartungen, ist dies ein Indiz dafür, dass Zusammenhänge linear sind. In diesem Fall kann man sich überlegen, ob man die Methodenoptimierung damit abschließt, ohne eine zusätzliche Optimierungsphase anzuschließen. Dies empfiehlt sich vor allem bei begrenztem Budget oder näher rückender Deadline und wenn bereits ein Produkt hergestellt werden kann, das innerhalb der Spezifikationen liegt.

Werden statistische Versuchspläne zur Methodenoptimierung eingesetzt, sollten ein paar Dinge beachtet werden, damit keine voreiligen Schlüsse gezogen werden. Die Signifikanz eines Parameters ist von den gewählten Faktorstufen abhängig. Daher sollten Faktorstufen angemessen ausgewählt werden. Werden die Faktorstufen zu eng gewählt, können wesentliche Effekte im Rauschen untergehen. Dies passiert vor allem, wenn andere Faktorstufen im Verhältnis deutlich weiter gewählt wurden. So kann es sein, dass ein Parameter fälschlicherweise als nicht signifikant eingestuft wird. Werden die Faktorstufen zu weit gewählt, kann es sein, dass die Methode nicht mehr funktioniert oder Randeffekte auftreten, die nicht den wesentlichen Teil der Methode darstellen. Durch das Rauschen kann es sein, dass der Effekt eines Parameters überdeckt wird. Dieser Parameter ist dann nicht signifikant und man würde ihn nicht nutzen, um die Zieleigenschaften

zu steuern. Alternativ kann man versuchen das Rauschen zu verringern indem man alle Parameter, die nicht variiert werden, so konstant wie möglich hält. Gelingt dies nicht oder ist das Rauschen so groß, dass kein oder zu wenige signifikante Faktoren identifiziert werden können, sollte man noch einmal in die Planungsphase zurückkehren, um mögliche Ursachen zu finden. Möglicherweise muss eine eigenständige Untersuchung angeschlossen werden, um herauszufinden, wie das Rauschen eingegrenzt werden kann. Daher ist es auch wichtig, dass die angewendeten analytischen Methoden zur Bestimmung der CQA eine gute Präzision aufweisen, wenn sie im Rahmen der statistischen Versuchsplanung angewendet werden. Schwanken die Ergebnisse zu sehr, erhöht dies auch das Rauschen des DoE und begünstigt uneindeutige Ergebnisse. Im Optimalfall ist die analytische Methode eigens für die Anwendung in der statistischen Versuchsplanung validiert worden mit entsprechend hohen Ansprüchen an die Präzision. Einen statistischen Versuchsplan für die Auswertung von Zellversuchen oder in-vivo-Versuche zu nutzen, ist besonders herausfordernd, da sie auch bei korrekter Umsetzung eine hohe Streuung aufweisen und oft eine geringere Präzision haben als chemisch-physikalische Messmethoden. Eine Erhöhung der Replikationen eines Versuchsplanes hilft dabei zufällige Streuungen rauszurechnen und das Rauschen zu verringern.

Bei der Herstellung der Chitosan-Carboxymethylcurdlan-Partikel hat sich gezeigt, dass das Entwickeln einer funktionierenden Herstellungsmethode in einigen Fällen bereits eine große Herausforderung darstellt. Können die ausgewählten Produkteigenschaften eindeutig analysiert werden, kann die statistische Versuchsplanung dabei helfen, erste Zusammenhänge aufzudecken. Diese Erkenntnisse können für die weitere Methodenentwicklung genutzt werden. Wenn die Ergebnisse jedoch nicht eindeutig quantifizierbar sind oder schlichtweg kein Produkt entsteht, muss die Methode vorerst in wesentlichen Punkten angepasst werden. Auch ein Ausweichen auf eine andere Herstellungsmethode sollte in Betracht gezogen werden.

Das gleiche gilt für das verwendete Equipment. Wie durch den Vergleich der zwei Sprühtrockner und der zwei Varianten der PLGA-NP-Herstellung gezeigt werden konnte, kann es sein, dass eine Methode zwar generell geeignet ist, um das gewünschte Produkt herzustellen, das Equipment jedoch angepasst werden muss.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Methodenentwicklungen und -optimierungen zeigen das große Potential, aber auch die Grenzen der statistischen Versuchsplanung bei der Herstellung

von Nanopartikeln. Der sehr systematische Ansatz von Quality by Design und von den Methoden, die innerhalb dieses Prinzipes beschrieben sind, erwiesen sich als äußerst hilfreich für die strukturierten Methodenentwicklung. Die in dieser Arbeit entwickelte Strategie zur systematischen Untersuchung und Optimierung von Herstellungsmethoden bietet einen klaren Rahmen, um neue nanopartikeläre Formulierungen effizient zu entwickeln. Zudem wurde eine strukturierte Vorgehensweise erarbeitet, die als Leitfaden für zukünftige Entwicklungen und Optimierungen dienen kann. Durch die Anwendung von Quality by Design und statistischer Versuchsplanung können Herstellprozesse von Nanopartikeln besser verstanden, gezielt gesteuert und reproduzierbar gemacht werden. Durch den Vergleich verschiedener Herstellungsverfahren können gezielt Methoden für spezifische Anforderungen ausgewählt und angepasst werden.

## 7 Zusammenfassung

Diese Arbeit beschäftigt sich mit dem Auswählen, Untersuchen und Optimieren von Methoden zur Herstellung von Polymernanopartikel als Wirkstoffträger unter Einsatz des Konzeptes „Quality by Design“ und der statistischen Versuchsplanung. Dazu sollten unterschiedliche Methoden systematisch untersucht werden, um ein umfangreiches Prozessverständnis zu erlangen. Dieses sollte dann genutzt werden, um Partikel herzustellen, die reproduzierbar eine klar definierte Qualität aufweisen. Zudem sollten unterschiedliche Herstellungsmethoden untersucht werden, um herauszufinden, welche Methode für welche Partikelart geeignet ist. Im praktischen Teil dieser Arbeit wurde ein vollständiger Optimierungsprozess zur Herstellung von PLGA-Nanopartikeln durch die Doppelemulsions-Lösungsmittelveaporationsmethode durchlaufen, bei dem zuerst das Zielproduktprofil und die kritischen Qualitätsmerkmale ausgearbeitet wurden. Um alle Partikel mit den definierten Eigenschaften herzustellen, wurden zwei Varianten dieser Herstellungsmethode mittels statistischer Versuchsplanung untersucht und die optimierten Methoden, sowie eine Kombination aus beiden Varianten genutzt, um die definierten Partikel herzustellen. Im Anschluss wurde eine hergestellte Partikelart auf ihre Redispergierbarkeit, Stabilität und Wirkstofffreisetzung untersucht und die Partikel mittels Elektronenmikroskop visualisiert, um alle im Zielproduktprofil definierte Eigenschaften zu erfassen. Durch den Optimierungsprozess konnten viele wichtige Erkenntnisse über die Methode gewonnen werden und die definierten Partikel zielsicher und reproduzierbar hergestellt werden. Ein ähnlicher Optimierungsprozess wurde auf die ionische Gelierung zur Herstellung von Chitosan-Carboxymethylcellulose-Nanopartikel angewendet. Auch wenn viele wichtige Erkenntnisse gewonnen wurden, war das Herstellen der finalen Partikel weiterhin eine Herausforderung. Ein Erfolg war, dass Partikel mit sehr hohem Proteingehalt hergestellt werden konnten und es gelang, Partikel mittels Elektronenmikroskop zu visualisieren. Die ionische Gelierung wurde auch zur Herstellung von Chitosan-Carboxymethylcurdlan-Partikeln eingesetzt. Auch wenn nach einigen Anpassungen Partikel ausgefällt werden konnten, wies das verwendete Carboxymethylcurdlan möglicherweise eine zu hohe Kettenlänge auf, um Partikel kleiner 1000  $\mu\text{m}$  zu generieren. Des Weiteren wurden Chitosan-Partikel mittels Mini- und Nano-sprührockner hergestellt und die Herstellung von Beta-Glucan-Partikeln mittels Minisprührockner untersucht. Zum Abschluss wurden die durchgeführten sowie nur theoretisch behandelten Herstellungsmethoden miteinander verglichen und herausgearbeitet welche Methoden für

welche Edukteigenschaften geeignet sind. Dies, sowie das systematische Optimieren der durchgeführten Herstellungsmethoden sollen dabei helfen, zukünftige Entwicklungen zu vereinfachen.

## 8 Abstract (english version)

Subject of this thesis is the selection, investigation and optimisation of preparation methods for polymer nanoparticles as drug carriers using the concept of 'quality by design' and design of experiment. For this purpose, different methods should be analysed systematically in order to gain a comprehensive understanding of the process. The gained knowledge shall then be used to produce particles reproducibly with defined quality. In addition, different preparation methods were investigated to find out which method is suitable for different particle types. The practical section of this work involved a comprehensive optimisation process for the production of PLGA nanoparticles using the double emulsion solvent evaporation method. This process entailed the initial delineation of the target product profile and critical quality attributes. To produce nanoparticles with defined properties, two variations of the preparation method were investigated utilising design of experiment. The two optimised methods as well as a combination of both methods were performed, to produce the defined particles. Then the redispersibility, stability and drug release of one particle type were analysed and the particles were visualised using electron microscopy to cover all properties defined in the target product profile. The optimisation process yielded valuable understanding of the preparation method. Finally, the defined particles were produced accurately and reproducibly. A similar optimisation process was applied to the ionic gelation to produce chitosan-carboxymethylcellulose nanoparticles. Even though important knowledge of the method was gained, the production of the final particles was still challenging but particles with a very high protein content could be produced successfully and it was possible to visualise nanoparticles using an electron microscope. The ionic gelation was also utilised to produce chitosan-carboxymethylcurdlan particles. After some adjustments particles precipitated successfully, but not in a size range smaller than 1000  $\mu\text{m}$ . One reason for that could be, that the carboxymethylcurdlan that was used, had a too high molecular weight to produce smaller particles. Furthermore, chitosan particles were produced using mini and nano spray dryers and the production of beta-glucan particles using mini spray dryers was also investigated. The final stage of the study involved a comparison of the various preparation methods, both those that had been carried out and those that had been the subject of theoretical investigation. This comparison

enabled the identification of the most suitable methods for the specific properties of the raw materials. This, as well as the systematic optimisation of the production methods used, should facilitate the simplification of future developments.

## 9 Anhang

Teile der Informationen in dieser Dissertation werden mit Genehmigung von Minitab, LLC abgedruckt. Alle Eigentums- und Urheberrechte dieser Materialien verbleiben ausschließlich bei Minitab, LLC. Alle Rechte vorbehalten.

### 9.1 Verwendete Abkürzungen

A	Amplitude
BCA-Assay	Bicinchoninsäure-Assay
BE	Beladungseffizienz
c (OVA)	Ovalbumin-Konzentration
c (PLGA)	Poly(lactid-co-glycolid)-Konzentration
c (PVA)	Polyvinylalkohol-Konzentration
ca.	Circa
CMA	Critical Material Attributes / Kritische Materialeigenschaften
CMC	Carboxymethylcellulose
CM-Cellulose	Carboxymethylcellulose
CM-Curdlan	Carboxymethylcurdlan
CPP	Critical Process Parameter / kritische Prozessparameter
CQA	Critical Quality Attributes / Kritische Qualitätsmerkmale
Cu	Kupfer
DLS	dynamische Lichtstreuung
DoE	Design of Experiment / Statistische Versuchsplanung
DSD	Definitive Screening Design / Definitiver Screening-Versuchsplan
Dz	mittlerer hydrodynamischer Durchmesser / z-Average
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EMA	European Medicine Agency
EPR-Effektes	Enhanced Permeability and Retention Effect

f <sub>2</sub>	Ähnlichkeitsfaktor
FDA	Food and Drug Administration
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
HPLC-grade	Reinheitsgrad geeignet für Hochleistungsflüssigchromatographie
ICH	International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use
k	Anzahl der Faktoren
KBE	Koloniebildende Einheiten
KI	Konfidenzintervall
LD	Laserdiffraktometrie
LE	Beladungseffizienz
Lin. Reg.	Lineare Regression
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
MW	Mittelwert
N	Anzahl der Versuche
n	Stichprobenumfang / Anzahl der Wiederholungen
N <sub>0</sub>	Anzahl der Zentralpunkt
Na-CMC	Carboxymethylcellulose-Natrium
NP	Nanopartikel
O	organische Phase der Doppelemulsion
o. l.	oben links
o. r.	oben rechts
OFAT	One-Factor-at-the-Time
OVA	Ovalbumin
PBS-Puffer	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PBST-Puffer	Phosphat-gepufferte Salzlösung mit Tween
PDI	Polydispersitätsindex
PEG	Polyethylenglykol
PG	Proteingehalt
PLGA	Polylactid-co-Glycolid
PLGA-NP	Polylactid-co-Glycolid Nanopartikel

PVA	Polyvinylalkohol
QbD	Quality by Design
QRM	Qualitäts-Risiko-Management
QTPP	Quality Target Product Profile / (Qualitäts-) Zielprodukt-profil
REM	Rasterelektronenmikroskop
S	Stabilisatorlösung
SARS-CoV-2	Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Type 2
SD	Standardabweichung
SLN	Solid Lipid Nanoparticle
t (W/O)	Rührdauer Wasser-in-Öl Einfachemulsion
t (W/O/W)	Rührdauer Wasser-in-Öl-in-Wasser Doppelemulsion
u. l.	unten links
u. r.	unten rechts
UK	United Kingdom
UPP	Unclassified process parameter / nicht klassifizierte Prozessparameter
US	Ultraschall
USA	United States of America
UT	Ultraturrax
v (W/O)	Rührgeschwindigkeit Wasser-in-Öl-in-Wasser Doppelemulsion
v (W/O/W)	Rührgeschwindigkeit Wasser-in-Öl-in-Wasser Doppelemulsion
W/O	Wasser-in-Öl Emulsion
W/O/W	Wasser in Öl in Wasser Doppelemulsion
W1	innere Phase der Doppelemulsion
W2	äußere Phase der Doppelemulsion
$\bar{x}$	Mittelwert
$x_i$	Einzelwerte
$\alpha$	Signifikanzniveau
$\mu$	Erwartungswert
$\sigma$	Standardabweichung
$\sigma^2$	Varianz
$\bar{x}$	Mittelwert

z.B.

Zum Beispiel

---

## 10 Literatur

1. Tegart, G. Nanotechnology: the technology for the twenty-first century. *Foresight* 2004, *6*, 364–370, doi:10.1108/14636680410569948.
2. Satalkar, P.; Elger, B.S.; Shaw, D.M. Defining Nano, Nanotechnology and Nanomedicine: Why Should It Matter? *Sci. Eng. Ethics* 2016, *22*, 1255–1276, doi:10.1007/s11948-015-9705-6.
3. Saad, Z.H.; Jahan, R.; Bagul, U. *Nanopharmaceuticals: A New Perspective of Drug Delivery System*, 2012.
4. Bawa, R. Nanopharmaceuticals: Nanopharmaceuticals. *European Journal of Nanomedicine* 2010, *3*, doi:10.1515/EJNM.2010.3.1.34.
5. Bawarski, W.E.; Chidlow, E.; Bharali, D.J.; Mousa, S.A. Emerging nanopharmaceuticals. *Nanomedicine* 2008, *4*, 273–282, doi:10.1016/j.nano.2008.06.002.
6. Diaz-Arévalo, D.; Zeng, M. Nanoparticle-based vaccines. In *Expectations and realities of multifunctional drug delivery systems*, Shegokar, R., Ed.; Elsevier: Amsterdam, Oxford, Cambridge, MA, 2020; pp 135–150, ISBN 978-0-12-817778-5.
7. Barenholz, Y. Doxil® --the first FDA-approved nano-drug: lessons learned. *J. Control. Release* 2012, *160*, 117–134, doi:10.1016/j.jconrel.2012.03.020.
8. CHMP. Abraxane, INN-paclitaxel.
9. Vahedifard, F.; Chakravarthy, K. Nanomedicine for COVID-19: the role of nanotechnology in the treatment and diagnosis of COVID-19. *Emergent Mater.* 2021, *4*, 75–99, doi:10.1007/s42247-021-00168-8.
10. Sharma, A.; Kontodimas, K.; Bosmann, M. Nanomedicine: A Diagnostic and Therapeutic Approach to COVID-19. *Front. Med. (Lausanne)* 2021, *8*, 648005, doi:10.3389/fmed.2021.648005.
11. Desai, N. Challenges in development of nanoparticle-based therapeutics. *AAPS J.* 2012, *14*, 282–295, doi:10.1208/s12248-012-9339-4.
12. Paliwal, R.; Babu, R.J.; Palakurthi, S. Nanomedicine scale-up technologies: feasibilities and challenges. *AAPS PharmSciTech* 2014, *15*, 1527–1534, doi:10.1208/s12249-014-0177-9.
13. Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte. Arbeitsgruppe Nanomedizin. Available online: <https://www.bfarm.de/DE/Arzneimittel/Zulassung/Zulassungsverfahren/Nanomedizin.html> (accessed on 22 July 2023).

14. Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz, Bau und Reaktorsicherheit (BMUB), [www.bmub.bund.de](http://www.bmub.bund.de). Besonderheiten von Nanomaterialien 2017.
15. Chrastina, A.; Massey, K.A.; Schnitzer, J.E. Overcoming in vivo barriers to targeted nanodelivery. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* 2011, *3*, 421–437, doi:10.1002/wnan.143.
16. Haulitschek, P.-T.M. Formulation and Characterization of Sonosensitive Organic Nanoparticles: Dissertation 2021.
17. Subhan, M.A.; Yalamarty, S.S.K.; Filipczak, N.; Parveen, F.; Torchilin, V.P. Recent Advances in Tumor Targeting via EPR Effect for Cancer Treatment. *J. Pers. Med.* 2021, *11*, doi:10.3390/jpm11060571.
18. Wu, J. The Enhanced Permeability and Retention (EPR) Effect: The Significance of the Concept and Methods to Enhance Its Application. *J. Pers. Med.* 2021, *11*, doi:10.3390/jpm11080771.
19. Chen, W.; Sun, Z.; Lu, L. Zielgerichtete Wirkstoffe für die Krebstherapie: Aktuelle Entwicklungen und Perspektiven. *Angewandte Chemie* 2021, *133*, 5686–5705, doi:10.1002/ange.201914511.
20. Taha, M.S.; Padmakumar, S.; Singh, A.; Amiji, M.M. Critical quality attributes in the development of therapeutic nanomedicines toward clinical translation. *Drug Deliv. Transl. Res.* 2020, *10*, 766–790, doi:10.1007/s13346-020-00744-1.
21. Smith, A.M.; Nie, S. Semiconductor nanocrystals: structure, properties, and band gap engineering. *Acc. Chem. Res.* 2010, *43*, 190–200, doi:10.1021/ar9001069.
22. Boles, M.A.; Ling, D.; Hyeon, T.; Talapin, D.V. The surface science of nanocrystals. *Nat. Mater.* 2016, *15*, 141–153, doi:10.1038/NMAT4526.
23. Nsairat, H.; Khater, D.; Sayed, U.; Odeh, F.; Al Bawab, A.; Alshaer, W. Liposomes: structure, composition, types, and clinical applications. *Heliyon* 2022, *8*, e09394, doi:10.1016/j.heliyon.2022.e09394.
24. Mehnert, W.; Mäder, K. Solid lipid nanoparticles. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2012, *64*, 83–101, doi:10.1016/j.addr.2012.09.021.
25. Letchford, K.; Burt, H. A review of the formation and classification of amphiphilic block copolymer nanoparticulate structures: micelles, nanospheres, nanocapsules and polymersomes. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2007, *65*, 259–269, doi:10.1016/j.ejpb.2006.11.009.

26. Kango, S.; Kalia, S.; Celli, A.; Njuguna, J.; Habibi, Y.; Kumar, R. Surface modification of inorganic nanoparticles for development of organic–inorganic nanocomposites—A review. *Progress in Polymer Science* 2013, *38*, 1232–1261, doi:10.1016/j.progpolymsci.2013.02.003.
27. Abid, N.; Khan, A.M.; Shujait, S.; Chaudhary, K.; Ikram, M.; Imran, M.; Haider, J.; Khan, M.; Khan, Q.; Maqbool, M. Synthesis of nanomaterials using various top-down and bottom-up approaches, influencing factors, advantages, and disadvantages: A review. *Adv. Colloid Interface Sci.* 2022, *300*, 102597, doi:10.1016/j.cis.2021.102597.
28. Indiarito, R.; Indriana, L.P.A.; Andoyo, R.; Subroto, E.; Nurhadi, B. Bottom–up nanoparticle synthesis: a review of techniques, polyphenol-based core materials, and their properties. *Eur Food Res Technol* 2022, *248*, 1–24, doi:10.1007/s00217-021-03867-y.
29. Crucho, C.I.C.; Barros, M.T. Polymeric nanoparticles: A study on the preparation variables and characterization methods. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* 2017, *80*, 771–784, doi:10.1016/j.msec.2017.06.004.
30. Rao, J.P.; Geckeler, K.E. Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters. *Progress in Polymer Science* 2011, *36*, 887–913, doi:10.1016/j.progpolymsci.2011.01.001.
31. Hoang, N.H.; Le Thanh, T.; Sangpueak, R.; Treekoon, J.; Saengchan, C.; Thepbandit, W.; Papatthoti, N.K.; Kamkaew, A.; Buensanteai, N. Chitosan Nanoparticles-Based Ionic Gelation Method: A Promising Candidate for Plant Disease Management. *Polymers (Basel)* 2022, *14*, doi:10.3390/polym14040662.
32. Fàbregas, A.; Miñarro, M.; García-Montoya, E.; Pérez-Lozano, P.; Carrillo, C.; Sarrate, R.; Sánchez, N.; Ticó, J.R.; Suñé-Negre, J.M. Impact of physical parameters on particle size and reaction yield when using the ionic gelation method to obtain cationic polymeric chitosan-tripolyphosphate nanoparticles. *Int. J. Pharm.* 2013, *446*, 199–204, doi:10.1016/j.ijpharm.2013.02.015.
33. Witt, S. *Entwicklung von Nanopartikeln für Targeted Drug Delivery Systeme*, 2020.
34. Merkle, H.P. Zur Mikroverkapselung fester Arzneistoffe: Dissertation 1972.
35. Timilsena, Y.P.; Akanbi, T.O.; Khalid, N.; Adhikari, B.; Barrow, C.J. Complex coacervation: Principles, mechanisms and applications in microencapsulation. *Int. J. Biol. Macromol.* 2019, *121*, 1276–1286, doi:10.1016/j.ijbiomac.2018.10.144.

36. Hickey, J.W.; Santos, J.L.; Williford, J.-M.; Mao, H.-Q. Control of polymeric nanoparticle size to improve therapeutic delivery. *J. Control. Release* 2015, *219*, 536–547, doi:10.1016/j.jconrel.2015.10.006.
37. Wang, W.; Zhang, M.-J.; Chu, L.-Y. Functional polymeric microparticles engineered from controllable microfluidic emulsions. *Acc. Chem. Res.* 2014, *47*, 373–384, doi:10.1021/ar4001263.
38. Grangeia, H.B.; Silva, C.; Simões, S.P.; Reis, M.S. Quality by design in pharmaceutical manufacturing: A systematic review of current status, challenges and future perspectives. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2020, *147*, 19–37, doi:10.1016/j.ejpb.2019.12.007.
39. European Medicines Agency. ICH guideline Q8 (R2) on pharmaceutical development 2017.
40. Lionberger, R.A.; Lee, S.L.; Lee, L.; Raw, A.; Yu, L.X. Quality by design: concepts for ANDAs. *AAPS J.* 2008, *10*, 268–276, doi:10.1208/s12248-008-9026-7.
41. European Medicines Agency. ICH guideline Q11 on Development and manufacture of drug substances (chemical entities and biotechnological/biological entities) 2012.
42. European Medicines Agency. ICH guideline Q10 on pharmaceutical quality system - Step 5 2015.
43. European Medicines Agency. ICH guideline Q9 on quality risk management 2015.
44. Wieczorek, D. Statistische Versuchsplanung. In „Das ist gar kein Modell!“, Bandow, G., Holzmüller, H.H., Eds.; Gabler: Wiesbaden, 2009; pp 167–187, ISBN 978-3-8349-1842-0.
45. Kleppmann, W. *Versuchsplanung. Produkte und Prozesse optimieren*, 10., überarbeitete Auflage; Hanser: München, 2020, ISBN 9783446463974.
46. adam, m. Versuchsplanung und Auswertung (DoE Design of Experiments): Vorlesungsskript im Masterstudiengang Simulation und Experimentaltechnik, Hochschule Düsseldorf, Fachbereich Maschinenbau und Verfahrenstechnik.
47. Siebertz, K.; van Bebber, D.; Hochkirchen, T. *Statistische Versuchsplanung*; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2017, ISBN 978-3-662-55742-6.
48. B. Jones, C. J. Nachtsheim. A Class of Three-Level Designs for Definitive Screening in the Presence of Second-Order Effects. *Journal of Quality Technology* 2011, *43*.
49. Jones, B.; Nachtsheim, C.J. Effective Design-Based Model Selection for Definitive Screening Designs. *Technometrics* 2017, *59*, 319–329, doi:10.1080/00401706.2016.1234979.

50. Anderson, M.J.; Whitcomb, P.J. *RSM simplified. Optimizing processes using response surface methods for design of experiments*; CRC Press: Boca Raton, Fla., 2005, ISBN 1563272970.
51. P.E. Chigbu, E.C. Ukaegbu, J.C. Nwanya. On comparing the prediction variances of some central composite designs in spherical regions: a review. *Statistica* 2009.
52. Khuri, A.I.; Mukhopadhyay, S. Response surface methodology. *WIREs Comp Stat* 2010, *2*, 128–149, doi:10.1002/wics.73.
53. Stein, P.E.; Leslie, A.G.; Finch, J.T.; Carrell, R.W. Crystal structure of uncleaved ovalbumin at 1.95 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 1991, *221*, 941–959, doi:10.1016/0022-2836(91)80185-W.
54. Nisbet, A.D.; Saundry, R.H.; Moir, A.J.; Fothergill, L.A.; Fothergill, J.E. The complete amino-acid sequence of hen ovalbumin. *Eur. J. Biochem.* 1981, *115*, 335–345, doi:10.1111/j.1432-1033.1981.tb05243.x.
55. Wang, Y.; Murayama, K.; Myojo, Y.; Tsenkova, R.; Hayashi, N.; Ozaki, Y. Two-Dimensional Fourier Transform Near-Infrared Spectroscopy Study of Heat Denaturation of Ovalbumin in Aqueous Solutions. *J. Phys. Chem. B* 1998, *102*, 6655–6662, doi:10.1021/jp9816115.
56. Panyam, D.; Kilara, A. Enhancing the functionality of food proteins by enzymatic modification. *Trends in Food Science & Technology* 1996, *7*, 120–125, doi:10.1016/0924-2244(96)10012-1.
57. Horino, A.; Taneichi, M.; Naito, S.; Ami, Y.; Suzaki, Y.; Komuro, K.; Uchida, T. Cytokine production by spleen cells from mice with ovalbumin-specific, IgE-selective unresponsiveness induced by ovalbumin-liposome conjugate. *Allergology International* 1997, *46*, 249–253, doi:10.2332/allergolint.46.249.
58. Makadia, H.K.; Siegel, S.J. Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier. *Polymers (Basel)* 2011, *3*, 1377–1397, doi:10.3390/polym3031377.
59. Danhier, F.; Ansorena, E.; Silva, J.M.; Coco, R.; Le Breton, A.; Préat, V. PLGA-based nanoparticles: an overview of biomedical applications. *J. Control. Release* 2012, *161*, 505–522, doi:10.1016/j.jconrel.2012.01.043.
60. Hernández-Giottonini, K.Y.; Rodríguez-Córdova, R.J.; Gutiérrez-Valenzuela, C.A.; Peñuñuri-Miranda, O.; Zavala-Rivera, P.; Guerrero-Germán, P.; Lucero-Acuña, A. PLGA nanoparticle preparations by emulsification and nanoprecipitation techniques: effects of formulation parameters. *RSC Adv.* 2020, *10*, 4218–4231, doi:10.1039/c9ra10857b.

61. Zöchling, M. A novel method for rapid and accurate quantitative characterization of PLGA/PGA-based biomaterials and biomedical devices: Diplomarbeit 2009.
62. Little, A.; Wemyss, A.M.; Haddleton, D.M.; Tan, B.; Sun, Z.; Ji, Y.; Wan, C. Synthesis of Poly(Lactic Acid-co-Glycolic Acid) Copolymers with High Glycolide Ratio by Ring-Opening Polymerisation. *Polymers (Basel)* 2021, *13*, doi:10.3390/polym13152458.
63. Evonik Industries. Biodegradable polymers for controlled release. Available online: <https://healthcare.evonik.com/en/drugdelivery/parenteral-drug-delivery/parenteral-exipients/bioresorbable-polymers/standard-polymers> (accessed on 30.09.2023).
64. Nykamp, G. Herstellung und Charakterisierung neuer Blockcopolymeren auf Polylaktid- und Polyglykolid Basis und ihr Einsatz zur Herstellung von Mikropartikeln: Dissertation 2004.
65. Schmidt, P.C. *Pharmazeutische Hilfsstoffe: Eigenschaften, anwendung und handelsprodukte; eigenschaften, anwendung und handelsprodukte, 2., vollständig überarbeitete Auflage*; Govi-Verlag: [S.I.], 2020, ISBN 9783774114562.
66. Aranaz, I.; Alcántara, A.R.; Civera, M.C.; Arias, C.; Elorza, B.; Heras Caballero, A.; Acosta, N. Chitosan: An Overview of Its Properties and Applications. *Polymers (Basel)* 2021, *13*, doi:10.3390/polym13193256.
67. Gong, X.; Gao, Y.; Shu, J.; Zhang, C.; Zhao, K. Chitosan-Based Nanomaterial as Immune Adjuvant and Delivery Carrier for Vaccines. *Vaccines (Basel)* 2022, *10*, doi:10.3390/vaccines10111906.
68. Dmour, I.; Islam, N. Recent advances on chitosan as an adjuvant for vaccine delivery. *Int. J. Biol. Macromol.* 2022, *200*, 498–519, doi:10.1016/j.ijbiomac.2021.12.129.
69. Parmaksız, S.; Şenel, S. An Overview on Chitosan-Based Adjuvant/Vaccine Delivery Systems. In *Chitosan for Biomaterials IV*; Jayakumar, Prabakaran, M., Jayakumar, R., Eds.; Springer International Publishing: Cham, 2021; pp 293–379, ISBN 978-3-030-83020-5.
70. McIntosh, M.; Stone, B.A.; Stanisich, V.A. Curdlan and other bacterial (1→3)-beta-D-glucans. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2005, *68*, 163–173, doi:10.1007/s00253-005-1959-5.
71. Zhang, R.; Edgar, K.J. Properties, chemistry, and applications of the bioactive polysaccharide curdlan. *Biomacromolecules* 2014, *15*, 1079–1096, doi:10.1021/bm500038g.
72. Chen, Y.; Wang, F. Review on the preparation, biological activities and applications of curdlan and its derivatives. *European Polymer Journal* 2020, *141*, 110096, doi:10.1016/j.eurpolymj.2020.110096.

73. Kim, H.S.; Park, K.H.; Lee, H.K.; Kim, J.S.; Kim, Y.G.; Lee, J.H.; Kim, K.H.; Yun, J.; Hwang, B.Y.; Hong, J.T.; et al. Curdlan activates dendritic cells through dectin-1 and toll-like receptor 4 signaling. *Int. Immunopharmacol.* 2016, *39*, 71–78, doi:10.1016/j.intimp.2016.07.013.
74. *Europäisches Arzneibuch, 10. Ausgabe, Grundwerk 2020*; Deutscher Apotheker Verlag: Stuttgart.
75. Merck. Carboxymethylcellulose Natriumsalz: C5678 Sigma-Aldrich. Available online: <https://www.sigmaaldrich.com/DE/de/product/sigma/c5678> (accessed on 26 August 2024).
76. Samuelsen, A.B.C.; Schrezenmeir, J.; Knutsen, S.H. Effects of orally administered yeast-derived beta-glucans: a review. *Mol. Nutr. Food Res.* 2014, *58*, 183–193, doi:10.1002/mnfr.201300338.
77. Petravić-Tominac, V.; Zechner-Krpan, V.; Grba, S.; Srečec, S.; Panjkota-Krbavčić, I.; Vidović, L. Biological Effects of Yeast  $\beta$ -Glucans. *Agriculturae Conspectus Scientificus* 2010, *75*, 149–158.
78. Shawkat, H.; Westwood, M.-M.; Mortimer, A. Mannitol: a review of its clinical uses. *Continuing Education in Anaesthesia Critical Care & Pain* 2012, *12*, 82–85, doi:10.1093/bja-ceaccp/mkr063.
79. Thakral, S.; Sonje, J.; Munjal, B.; Bhatnagar, B.; Suryanarayanan, R. Mannitol as an Excipient for Lyophilized Injectable Formulations. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2023, *112*, 19–35, doi:10.1016/j.xphs.2022.08.029.
80. Merck. Direct-Q® 3 Wasseraufbereitungssystem mit UV-Lampe: Ein Basissystem zur Erzeugung von Rein- und Reinstwasser. Available online: [https://www.merckmillipore.com/DE/de/product/Direct-Q-3-UV-Water-Purification-System,MM\\_NF-ZRQSV3WW](https://www.merckmillipore.com/DE/de/product/Direct-Q-3-UV-Water-Purification-System,MM_NF-ZRQSV3WW).
81. Jahnke, J. PLGA-Nanopartikel für die Inhalative Vakzinierung: Dissertation 2014.
82. Struzek, A.-M.; Scherließ, R. Quality by Design as a Tool in the Optimisation of Nanoparticle Preparation-A Case Study of PLGA Nanoparticles. *Pharmaceutics* 2023, *15*, doi:10.3390/pharmaceutics15020617.
83. Weiss, J. Emulsion Processing – Homogenization. Available online: [https://people.umass.edu/mcclemen/FoodEmulsions2008/Presentations\(PDF\)/\(5\)Emulsion\\_Formation.pdf](https://people.umass.edu/mcclemen/FoodEmulsions2008/Presentations(PDF)/(5)Emulsion_Formation.pdf) (accessed on 20 June 2025).

84. *Emulgiertechnik: Grundlagen, Verfahren und Anwendungen*; Köhler, K., Ed., 3. Aufl.; Behr: Hamburg, 2012, ISBN 978-3899478693.
85. Heidland, J.M. Chitosan Nanoparticles for Mucosal Vaccination – Understanding the Particle Formation Process and Formulation for Nasal Application: Dissertation 2018.
86. *Pharmazeutische Technologie: Mit Einführung in Biopharmazie und Biotechnologie*, 11., völlig neu bearbeitete Auflage; Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft: Stuttgart, 2022, ISBN 978-3-8047-3847-8.
87. BÜCHI Labortechnik AG. High performance cyclone: for the Mini Spray S-300 & B-290, complete. Available online: <https://www.buchi.com/de/produkte/teile-zubehoer/high-performance-cyclone-complete-11074500> (accessed on 17 September 2024).
88. BÜCHI Labortechnik AG. B-290 Mini Spray Dryer - Operation Manual, Version N 2018.
89. BÜCHI Labortechnik AG. Nano Sprühtrockner B-90 HP. Available online: <https://www.buchi.com/de/produkte/instrumente/nano-spray-dryer-b-90-hp> (accessed on 31 December 2023).
90. BÜCHI Labortechnik AG. Nano-Sprühtrockner B-90 HP - Bedienungsanleitung, Version D 2017.
91. Osterhold, M. Partikelgrößenmeßtechnik im Vergleich Schwerpunkt: Laserbeugung und dynamische Lichtstreuung / Laser diffraction and dynamic light scattering: Particle analysers compared. *Applied Rheology* 1992, 2, 264–271, doi:10.2478/arh-1992-020413.
92. Malvern Instruments Limited. Dynamic Light Scattering: An Introduction in 30 Minutes. Available online: <https://www.chem.uci.edu/~dmitryf/manuals/Fundamentals/Dynamic%20light%20scattering%20in%2030%20minutes.pdf> (accessed on 9 December 2023).
93. Wagner, J. Teilchengrößen-Bestimmung mittels dynamischer Lichtstreuung. *Chemie Ingenieur Technik* 1986, 58, 578–583, doi:10.1002/cite.330580708.
94. Costigliola, L.; Heyes, D.M.; Schröder, T.B.; Dyre, J.C. Revisiting the Stokes-Einstein relation without a hydrodynamic diameter. *J. Chem. Phys.* 2019, 150, 21101, doi:10.1063/1.5080662.
95. Nobbmann, U.; Malvern Panalytical Ltd. Polydispersity – what does it mean for DLS and chromatography? Available online: <https://www.materials-talks.com/polydispersity-what-does-it-mean-for-dls-and-chromatography/> (accessed on 10 December 2023).
96. El-Emam, G.A.; Girgis, G.N.S.; El-Sokkary, M.M.A.; El-Azeem Soliman, O.A.; Abd El Gawad, A.E.G.H. Ocular Inserts of Voriconazole-Loaded Proniosomal Gels: Formulation, Evaluation

- and Microbiological Studies. *Int. J. Nanomedicine* 2020, *15*, 7825–7840, doi:10.2147/IJN.S268208.
97. Mudalige, T.; Qu, H.; van Haute, D.; Ansar, S.M.; Paredes, A.; Ingle, T. Characterization of Nanomaterials. *Nanomaterials for Food Applications*, Elsevier, 2019; pp 313–353, ISBN 9780128141304.
98. Raval, N.; Maheshwari, R.; Kalyane, D.; Youngren-Ortiz, S.R.; Chougule, M.B.; Tekade, R.K. Importance of Physicochemical Characterization of Nanoparticles in Pharmaceutical Product Development. *Basic Fundamentals of Drug Delivery*, Elsevier, 2019; pp 369–400, ISBN 9780128179093.
99. Monsalve, Y.; Tosi, G.; Ruozi, B.; Belletti, D.; Vilella, A.; Zoli, M.; Vandelli, M.A.; Forni, F.; López, B.L.; Sierra, L. PEG-g-chitosan nanoparticles functionalized with the monoclonal antibody OX26 for brain drug targeting. *Nanomedicine (Lond)* 2015, *10*, 1735–1750, doi:10.2217/nnm.15.29.
100. Jeffrey D. Clogston and Anil K. Patri. Chapter 6: Zeta Potential Measurement. In *Characterization of Nanoparticles Intended for Drug Delivery*, McNeil, S.E., Ed.; Humana Press: Totowa, NJ, 2011, ISBN 978-1-60327-197-4.
101. Lunardi, C.N.; Gomes, A.J.; Rocha, F.S.; Tommaso, J. de; Patience, G.S. Experimental methods in chemical engineering: Zeta potential. *Can J Chem Eng* 2021, *99*, 627–639, doi:10.1002/cjce.23914.
102. Bhattacharjee, S. DLS and zeta potential - What they are and what they are not? *J. Control. Release* 2016, *235*, 337–351, doi:10.1016/j.jconrel.2016.06.017.
103. Malvern Instruments Ltd. *Zetasizer Nano Series User Manual*, 2003.
104. *The protein protocols. Handbook*; Walker, J.M., Ed.; Humana Press: New York, N.Y., op. 2009, ISBN 978-1-60327-474-6.
105. U.S. Department of Health and Human Services; Food and Drug Administration; Center for Drug Evaluation and Research. *Guidance for Industry. Dissolution Testing of Immediate Release Solid Oral Dosage Forms*, 1997.
106. Minitab®. Tabelle der Varianzanalyse für Definitiven Screening-Versuchsplan analysieren. Available online: <https://support.minitab.com/de-de/minitab/20/help-and-how-to/statistical-modeling/doe/how-to/screening/analyze-screening-design/interpret-the-results/all-statistics-and-graphs/analysis-of-variance-table/> (accessed on 9 December 2022).

107. Minitab®. Tabelle mit der Zusammenfassung des Modells für Definitiven Screening-Versuchsplan analysieren. Available online: <https://support.minitab.com/de-de/minitab/20/help-and-how-to/statistical-modeling/doe/how-to/screening/analyze-screening-design/interpret-the-results/all-statistics-and-graphs/model-summary-table/> (accessed on 9 December 2022).
108. Minitab®. Residuendiagramme für Definitiven Screening-Versuchsplan analysieren. Available online: <https://support.minitab.com/de-de/minitab/20/help-and-how-to/statistical-modeling/doe/how-to/screening/analyze-screening-design/interpret-the-results/all-statistics-and-graphs/residual-plots/#normal-probability-plot-of-residuals> (accessed on 9 December 2022).
109. Mainardes, R.M.; Evangelista, R.C. PLGA nanoparticles containing praziquantel: effect of formulation variables on size distribution. *Int. J. Pharm.* 2005, *290*, 137–144, doi:10.1016/j.ijpharm.2004.11.027.
110. Hussein, A.S.; Abdullah, N.; Faku'l-razi, A. Optimizing the Process Parameters for Encapsulation of Linamarin into PLGA Nanoparticles Using Double Emulsion Solvent Evaporation Technique. *Adv. Polym. Technol.* 2013, *32*, E486–E504, doi:10.1002/adv.21295.
111. Narayanan, K.; Subrahmanyam, V.M.; Venkata Rao, J. A Fractional Factorial Design to Study the Effect of Process Variables on the Preparation of Hyaluronidase Loaded PLGA Nanoparticles. *Enzyme Res.* 2014, *2014*, 162962, doi:10.1155/2014/162962.
112. Sauter, C.; Emin, M.A.; Schuchmann, H.P.; Tavman, S. Influence of hydrostatic pressure and sound amplitude on the ultrasound induced dispersion and de-agglomeration of nanoparticles. *Ultrason. Sonochem.* 2008, *15*, 517–523, doi:10.1016/j.ultsonch.2007.08.010.
113. Vesna Milacic, V.M.; Schwendeman, S.P. Lysozyme release and polymer erosion behavior of injectable implants prepared from PLGA-PEG block copolymers and PLGA/PLGA-PEG blends. *Pharm. Res.* 2014, *31*, 436–448, doi:10.1007/s11095-013-1173-6.
114. Zeng, J.; Shirihai, O.S.; Grinstaff, M.W. Modulating lysosomal pH: a molecular and nanoscale materials design perspective. *J. Life Sci. (Westlake Village)* 2020, *2*, 25–37, doi:10.36069/jols/20201204.
115. Duan, J.Z.; Riviere, K.; Marroum, P. In vivo bioequivalence and in vitro similarity factor (f<sub>2</sub>) for dissolution profile comparisons of extended release formulations: how and when do they match? *Pharm. Res.* 2011, *28*, 1144–1156, doi:10.1007/s11095-011-0377-x.

- 
116. Elstner, M. *Physikalische Chemie I: Thermodynamik und Kinetik*, 1. Auflage 2017; Springer Berlin; Springer Spektrum: Berlin, 2017, ISBN 9783662553633.
  117. Li, Z.; Kuang, H.; Yang, J.; Hu, J.; Ding, B.; Sun, W.; Luo, Y. Improving emulsion stability based on ovalbumin-carboxymethyl cellulose complexes with thermal treatment near ovalbumin isoelectric point. *Sci. Rep.* 2020, *10*, 3456, doi:10.1038/s41598-020-60455-y.
  118. Vehring, R. Pharmaceutical particle engineering via spray drying. *Pharm. Res.* 2008, *25*, 999–1022, doi:10.1007/s11095-007-9475-1.
  119. BÜCHI Labortechnik AG. Spray drying. Available online: <https://www.buchi.com/en/spray-drying>.
  120. Sander, A.; Penović, T. Droplet Size Distribution Obtained by Atomization with Two-Fluid Nozzles in a Spray Dryer. *Chem Eng & Technol* 2014, *37*, 2073–2084, doi:10.1002/ceat.201400185.
  121. Hu, Z.; Li, S.; Yang, F.; Lin, X.; Pan, S.; Huang, X.; Xu, J. Formation and Elimination of Satellite Droplets during Monodisperse Droplet Generation by Using Piezoelectric Method. *Micromachines* 2021, *12*, 921, doi:10.3390/mi12080921.
  122. Vicente, J.; Pinto, J.; Menezes, J.; Gaspar, F. Fundamental analysis of particle formation in spray drying. *Powder Technology* 2013, *247*, 1–7, doi:10.1016/j.powtec.2013.06.038.
  123. Krzysztof, C.; Krzysztof, S. Spray Drying Technique. I: Hardware and Process Parameters. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2010, *99*, 575–586, doi:10.1002/jps.21886.
  124. Diedrich, A.E. Entwicklung einer nanopartikulären Formulierung zur Vakzinierung über den Respirationstrakt: Dissertation 2015.
  125. Valentin, L. Deeper process understanding of chitosan nanoparticles as delivery system for immune actives: Dissertation 2024.
  126. Lee, J.H.; Yeo, Y. Controlled Drug Release from Pharmaceutical Nanocarriers. *Chem. Eng. Sci.* 2015, *125*, 75–84, doi:10.1016/j.ces.2014.08.046.
  127. Wang, N.; Cheng, X.; Li, N.; Wang, H.; Chen, H. Nanocarriers and Their Loading Strategies. *Adv. Healthc. Mater.* 2019, *8*, e1801002, doi:10.1002/adhm.201801002.
  128. Martínez Rivas, C.J.; Tarhini, M.; Badri, W.; Miladi, K.; Greige-Gerges, H.; Nazari, Q.A.; Galindo Rodríguez, S.A.; Román, R.Á.; Fessi, H.; Elaissari, A. Nanoprecipitation process: From encapsulation to drug delivery. *Int. J. Pharm.* 2017, *532*, 66–81, doi:10.1016/j.ijpharm.2017.08.064.
-

129. Desgouilles, S.; Vauthier, C.; Bazile, D.; Vacus, J.; Grossiord, J.-L.; Veillard, M.; Couvreur, P. The Design of Nanoparticles Obtained by Solvent Evaporation: A Comprehensive Study. *Langmuir* 2003, *19*, 9504–9510, doi:10.1021/la034999q.
130. Charcosset, C.; Limayem, I.; Fessi, H. The membrane emulsification process—a review. *J of Chemical Tech & Biotech* 2004, *79*, 209–218, doi:10.1002/jctb.969.
131. Santos, D.; Maurício, A.C.; Sencadas, V.; Santos, J.D.; Fernandes, M.H.; Gomes, P.S. Spray Drying: An Overview. In *Biomaterials - Physics and Chemistry - New Edition*; Pignatello, R., Musumeci, T., Eds.; InTech, 2018, ISBN 978-1-78923-064-2.
132. Sosnik, A.; Seremeta, K.P. Advantages and challenges of the spray-drying technology for the production of pure drug particles and drug-loaded polymeric carriers. *Adv. Colloid Interface Sci.* 2015, *223*, 40–54, doi:10.1016/j.cis.2015.05.003.
133. Iqbal, M.; Zafar, N.; Fessi, H.; Elaissari, A. Double emulsion solvent evaporation techniques used for drug encapsulation. *Int. J. Pharm.* 2015, *496*, 173–190, doi:10.1016/j.ijpharm.2015.10.057.
134. Delogu, F.; Gorrasi, G.; Sorrentino, A. Fabrication of polymer nanocomposites via ball milling: Present status and future perspectives. *Progress in Materials Science* 2017, *86*, 75–126, doi:10.1016/j.pmatsci.2017.01.003.

Erklärung nach § 9 der Promotionsordnung

Hiermit erkläre ich gemäß § 9 der Promotionsordnung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, dass ich die vorliegende Abhandlung, abgesehen von der Beratung durch meine Betreuerin, nach Inhalt und Form eigenständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Weiterhin habe ich keine anderen als die angegebenen Quellen oder Hilfsmittel benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht. Die vorliegende Arbeit ist unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft entstanden. Sie wurde weder ganz noch in Teilen an einer anderen Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegt. Einzelne Teile dieser Arbeit wurden bereits in wissenschaftlichen Publikationen veröffentlicht und sind entsprechend kenntlich gemacht. Weiterhin wurde mir kein akademischer Grad entzogen, noch habe ich an dieser oder einer anderen Fakultät einen früheren Promotionsversuch unternommen.

Anna-Maria Struzek