

**Lipid- und Polymernanopartikel für die perorale
Anwendung: Herstellung, Charakterisierung und
Untersuchung des intestinalen Abbaus**

Dissertation

zur Erlangung des
Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

der

Naturwissenschaftliche Fakultät I – Biowissenschaften –

der Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg,

vorgelegt

von Frau Martha Margarete Heider

geb. am 18.08.1988 in Halle

Gutachter:

1. Prof. Dr. Karsten Mäder
2. Prof. Dr. Lea Ann Dailey
3. Prof. Dr. Sandra Klein

Halle (Saale), d. 17.01.2019

Es gibt nichts Kleines auf der Welt, es kommt auf den Standpunkt an.

August Oetker, Apotheker

Inhaltsverzeichnis

	Abkürzungsverzeichnis	IV
1	Einleitung	1
1.1	Nanopartikuläre Systeme für die perorale Anwendung	1
1.2	Physiologische Grundlagen des Lipidverdaus und der Lipidnanopartikel im Gastrointestinaltrakt	2
1.3	Aufnahme von polymeren Nanopartikeln aus dem Gastrointestinaltrakt	5
1.4	Der Pankreatin-Lipolysetest mittels pH-stat Modell	6
1.5	Feste Lipidnanopartikel für die perorale Anwendung	10
1.6	Polymernanopartikel für die perorale Anwendung	11
1.7	Multispektrale Fluoreszenzbildgebung im Mausmodell für Verdaustudien	13
2	Zielstellung.....	15
3	Materialien und Methoden.....	16
3.1	Materialien	16
3.2	Methoden	18
3.2.1	Herstellung von festen Lipidnanopartikeln	18
3.2.2	Herstellung der Polymernanopartikel.....	18
3.2.3	Herstellung der <i>in vivo</i> verwendeten fluoreszenzmarkierten Polymer-nanopartikel.....	20
3.2.4	Photonenkorrelationsspektroskopie.....	22
3.2.5	Laserdiffraktometrie.....	22
3.2.6	Nanoparticle Tracking Analysis	22
3.2.7	Zetapotential	23
3.2.8	Dynamische Differenzkalorimetrie	23
3.2.9	Transmissionselektronenmikroskopie.....	23
3.2.10	Verwendete Verdaumedien	23
3.2.11	Verdaustudien mit der pH-stat Methode	25
3.2.12	Rücktitration	26
3.2.13	Hochleistungsdünnschichtchromatographie	26
3.2.14	L-Lactat-Nachweis.....	27
3.2.15	Tierstudien	28
3.2.16	Multispektrale Fluoreszenzbildgebung.....	28
3.2.17	Auswertung der Fluoreszenzaufnahmen	29
3.2.18	Fluoreszenzmikroskopie.....	31
3.2.19	Statistische Auswertung	32

4	Ergebnisse und Diskussion	33
4.1	<i>In vitro</i> Verdaustudien mit langkettigen Lipidnanopartikeln	33
4.1.1	Herstellung der Cetylpalmitatnanopartikel	33
4.1.2	Transmissionselektronenmikroskopie	35
4.1.3	Partikelgrößenanalytik	36
4.1.4	Zetapotential	39
4.1.5	Dynamische Differenzkalorimetrie	39
4.1.6	Stabilitätsmessungen	42
4.1.7	Einfluss der verwendeten Emulgatoren Poloxamer 188 und Polysorbat 80 auf den Verdau von Cetylpalmitatnanopartikeln	43
4.1.8	Vergleich zwischen der HPTLC und der pH-stat Methode beim Verdautest mit Cetylpalmitatnanopartikeln.....	45
4.1.9	Auswirkung der Rücktitration im Anschluss an die pH-stat Methode beim Lipidverdau.....	48
4.1.10	Einfluss von Orlistat auf das Verdaussystem und den Verdau von Cetylpalmitatnanopartikeln	49
4.1.11	Abbau von Cetylpalmitatnanopartikeln	51
4.2	<i>In vitro</i> Verdaustudien mit Polymernanopartikeln	55
4.2.1	Partikelgrößenanalytik	56
4.2.2	Zetapotential	58
4.2.3	Transmissionselektronenmikroskopie	58
4.2.4	Stabilitätsmessungen	59
4.2.5	Hydrolyse der Polymernanopartikel in den Verdaumedien	60
4.2.6	Einfluss der Lipase im Abbauprozess von Polymernanopartikeln	62
4.2.7	Untersuchung der Konzentrationsabhängigkeit von PVA als Stabilisator von Polymernanopartikeln.....	64
4.2.8	Einfluss des unterschiedlichen Molekulargewichtes von PVA als Stabilisator von Polymernanopartikeln	67
4.2.9	Einfluss der unterschiedlichen Stabilisatoren auf den Abbau von Polymernanopartikeln.....	68
4.3	<i>In vivo</i> Verhalten der Polymernanopartikel im Mausmodell mittels multispektraler Fluoreszenzbildgebung	72
4.3.1	<i>In vitro</i> Verhalten der Polymernanopartikel im simulierten Magensaft.....	73
4.3.2	Charakterisierung der <i>in vivo</i> angewendeten Proben	74
4.3.3	Versuche zur Evaluierung der Tiermodellparameter und Auswertung	78
4.3.4	<i>In vivo</i> Verlaufskontrolle der p. o. und i. v. applizierten Nanopartikel	80
4.3.5	<i>Ex vivo</i> Untersuchung der Studientiere bei peroral applizierten Polymernanopartikeln.....	84

Inhaltsverzeichnis

5	Zusammenfassung und Ausblick.....	99
6	Literatur.....	VI
7	Selbstständigkeitserklärung	XXII
8	Danksagung.....	XXIII
9	Lebenslauf	XXIV
10	Publikationsliste	XXV

Abkürzungsverzeichnis

CEH	Carboxylesterhydrolase
CP	Cetylpalmitat
DFR	DarkFatRed
EAB	Europäisches Arzneibuch
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EDC-HCl	1 Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimidhydrochlorid
EMA	European Medicines Agency
FaSSIF	Fasted State Simulated Fluid
FeSSIF	Fed State Simulated Fluid
FDA	Food and Drug Administration
GC	Gaschromatographie
GIT	Gastrointestinaltrakt
HLB	Hydrophilic-Lipophilic Balance
HPTLC	Hochleistungsdünnschichtchromatographie
HS15	Macrogol (15)-hydroxystearat
i. v.	intravenös
L-Lactat-NW	L-Lactat-Nachweis
LBDDS	Lipidbasierte Arzneistoffträgersysteme/ Lipid Based Drug Delivery Systems
LCTF	Liquid Crystal Tunable Filter
LD	Laserdiffraktometrie
LWG	Lipid-Wasser-Grenzfläche
MAG	Monoacylglycerid
MCT	Mittelkettige Triglyceride
MP	Mikropartikel
msFI	multispectral Fluorescence Imaging
NHS	N-Hydroxysuccinimide
NIR	Nahes Infrarot
NP	Nanopartikel
NTA	Nanoparticle Tracking Analysis
P188	Poloxamer 188
PCS	Photonenkorrelationspektroskopie
pK _s -Wert	Säurekonstante
PEG	Polyethylenglykol
PGA	Polyglycolid
PLA	Poly(D,L-lactid)

Abkürzungsverzeichnis

PLA2	Phosphatidylcholin-2-acylhydrolase; Phospholipase A2
PLGA	Poly(D,L-lactid-co-glycolid)
PLRP1	Pancreatic Lipase Related Protein 1
PLRP2	Pancreatic Lipase Related Protein 2
p. o.	peroral
PP	Peyer-Plaques
PS80	Polysorbat 80
PVA	Polyvinylalkohol
RT	Raumtemperatur
SGF	Simulated Gastric Fluid; simulierte Magenflüssigkeit
SIF	Simulated Intestinal Fluid; simulierte Darmflüssigkeit
SLN	Solid Lipid Nanoparticle, Feste Lipidnanopartikel
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
USWL	Unstirred Water Layer
USP	United States Pharmacopeia
ZP	Zetapotential

1 Einleitung

1.1 Nanopartikuläre Systeme für die perorale Anwendung

Nanopartikel (NP) stehen nach jahrelanger Forschung unvermindert im Fokus der Wissenschaft, welches an der stetig wachsenden Anzahl von fachspezifischen sowie populärwissenschaftlichen Veröffentlichungen zu erkennen ist. Im pharmazeutischen Bereich ist speziell die perorale (p. o.) Applikation von NP von besonderem Interesse. Der p. o. Weg bietet im Vergleich zu anderen Applikationsarten durch die Einfachheit der Anwendung und die Vermeidung der Schmerzeinwirkung eine große Patientenakzeptanz und damit einhergehend eine gesteigerte Therapietreue bei Patienten. Problematisch erweist sich eine verminderte Arzneistoffaufnahme aus dem Gastrointestinaltrakt (GIT) durch die geringe orale Bioverfügbarkeit der Arzneistoffe, wenn diese eine schlechte Wasserlöslichkeit aufweisen und somit nach dem Biopharmazeutischen Klassifizierungssystem den Klassen 2 oder 4 angehören [1]. Aufgrund dessen kann es zur Ausfällung des Wirkstoffes im GIT kommen, welche durch gezielte galenische Formulierungen vermindert werden kann. Der Hauptanteil, der in den letzten Jahren untersuchten Wirkstoffkandidaten für die p. o. Therapie besitzt eine schlechte Wasserlöslichkeit [2]. Diese Stoffe bestehen aus komplexen chemischen Strukturen, welche mittels Hochdurchsatz-Screening (*High-Throughput-Screening*) entwickelt werden [3]. Dieses Verfahren führt zu weniger wasserlöslichen Profilen für die Wirkstoffkandidaten [2]. Als Folge stehen nanopartikuläre lipidbasierte Arzneistoffträgersysteme (*Lipid Based Drug Delivery Systems*, LBDDS) wie Nanoemulsionen, Liposomen, Mikroemulsionen, Nanokapseln und selbst emulgierende Systeme vermehrt im Fokus, welche dem Lipidverdau im GIT unterliegen und inkorporierte schwerlösliche Arzneistoffe vor der Präzipitation im GIT schützen können. Die Bioverfügbarkeit dieser Arzneistoffe kann durch die Anwendung von LBDDS erheblich gesteigert werden [4]. Für Polymer-NP wird hingegen eine erhöhte Stabilität im GIT und ein Schutz für die inkorporierten Arzneistoffe wie säurelabile Proteine angenommen [5]. Eine Aufnahme der intakten Partikel und eine damit einhergehende Steigerung der Bioverfügbarkeit der inkorporierten Stoffe ist in der Literatur sowohl Gegenstand intensiver Forschung als auch Diskussionen [6–10]. Für ein zielgerichtetes Entwickeln von NP ist es essentiell, das Verhalten der NP im GIT nach p. o. Applikation sowie die Einflüsse des GIT auf die Formulierung zu kennen. Hierbei stellen *in vitro* Tests ein wichtiges Hilfsmittel dar, welche die Basis für *in vivo* Tests sind und diese bei guter Korrelation wegen der einfachen Handhabung, Kosteneffizienz und zur Reduzierung von Tierversuchen ersetzen können. Neben weiterführenden Untersuchungen und kritischer Betrachtung zum Einfluss des GIT auf p. o. applizierte Formulierungen ist es ebenso notwendig, Tests bestmöglich an das physiologische Geschehen anzupassen und diese stetig zu evaluieren und zu optimieren.

1.2 Physiologische Grundlagen des Lipidverdaus und der Lipidnanopartikel im Gastrointestinaltrakt

Voraussetzung für prädiktive *in vitro* Untersuchungen ist die Kenntnis der physiologischen Abläufe im GIT. Zur Untersuchung der vorherrschenden Bedingungen stehen heute Messsysteme wie die Heidelberger Kapsel [11] oder SmartPill® [12] zur Verfügung. Diese speziellen Sensoren nehmen Parameter wie z.B. pH-Werte, vorherrschende Druckschwankungen, Transitzeiten sowie Temperatur kontinuierlich auf und ermöglichen ein detailliertes Wissen über den GIT. Zusätzlich wurden stetig Studien über die Zusammensetzung der intestinalen Flüssigkeiten sowie über den Ablauf des Verdaus unternommen [13, 14].

Dieser beginnt mit der Zerkleinerung der Nahrung und dem Mischen mit Saliva im Mund [15]. Die in anderen Säugetierarten (Ratten und Mäusen) vorkommende linguale Lipase ist im erwachsenen Menschen nicht vorhanden [14]. Im Magen wird die Nahrung mit dem Magensaft vermischt, welcher hauptsächlich aus Salzsäure, Bicarbonaten, Mucin, Pepsinogen als Vorstufe des Pepsins sowie der gastrischen Lipase besteht [15]. Auch ein geringer Anteil an Gallensalzen ist gegenwärtig, welche durch den duodenalen Reflux in den Magen gelangen [15]. Der Fettverdaus beginnt bereits im Magen durch die gastrische Lipase [16], deren Sekretion durch die p. o. Gabe von Lipiden stimuliert wird [17]. Diese ist besonders stabil bei sauren pH-Werten und weist eine maximale Aktivität bei pH 5-5,4 auf [14].

Aufgrund der Hemmung des Enzyms durch entstehende freie Fettsäuren verläuft die Hydrolyse im Magen zu einem maximalen Prozentsatz von 25 % des möglichen Gesamtverdaus der Lipide [14]. Die verbleibenden Fette sowie deren Abbauprodukte unterliegen den gastrischen Scherkräften und werden grob emulgiert, wobei besonders die Antrumühle eine zentrale Rolle bei der Homogenisierung des Nahrungsbreies übernimmt [15]. Im Dünndarm erfolgt die Sekretion der Gallen- und Pankreassäfte zu dem Chymus (Abb. 1). Die Kontraktion der Gallenblase sowie der pankreatische Zufluss alternieren mit der Entleerung des Chymus aus dem Magen, um ein effektives Mischen von Fetten, Gallensalzen und Enzymen zu gewährleisten [18]. Die hauptsächlichen Bestandteile der Gallenflüssigkeit sind Wasser, Bicarbonate, Gallensalze, Cholesterin und Phospholipide, wobei die letzten drei in Form von Mischmizellen in den Dünndarm sezerniert werden [17]. Die Gallensalze werden in der Leber aus Cholesterin synthetisiert und in der Gallenblase bis zur Sezernierung gelagert [19].

Am häufigsten sind die Gallensalze Cholat, Chenodeoxicholat und Deoxicholat im Menschen vorhanden, welche mit Glycin (75 %) und mit Taurin (25 %) konjugiert sind [19]. Das wichtigste Enzym für den Fettverdaus ist die Pankreaslipase, die durch intestinale Hormone (Cholecystokinin, Sekretin) und indirekt über freie Fettsäuren stimuliert wird [14]. Das Aktivitätsmaximum der Pankreaslipase liegt bei pH-Werten zwischen 7,0-7,5 [14]. Für den Beginn

des Verdauungsprozesses ist die Anlagerung des Enzyms an die Grenzfläche zwischen der wässrigen Umgebung und der Lipidoberfläche (Lipid-Wasser-Grenze; LWG) essentiell. Die ebenfalls im Pankreassaft sezernierte Colipase agiert in einem Verhältnis von 1:1 mit der Lipase als Cofaktor [14]. Als regioselektives Enzym spaltet die Lipase bei Triglyceriden zwei Fettsäuren in der sn-1 und sn-3 Position ab [14], wobei aufgrund der sterischen Hinderung ein 2-Monoacylglycerid (MAG) verbleibt [20].

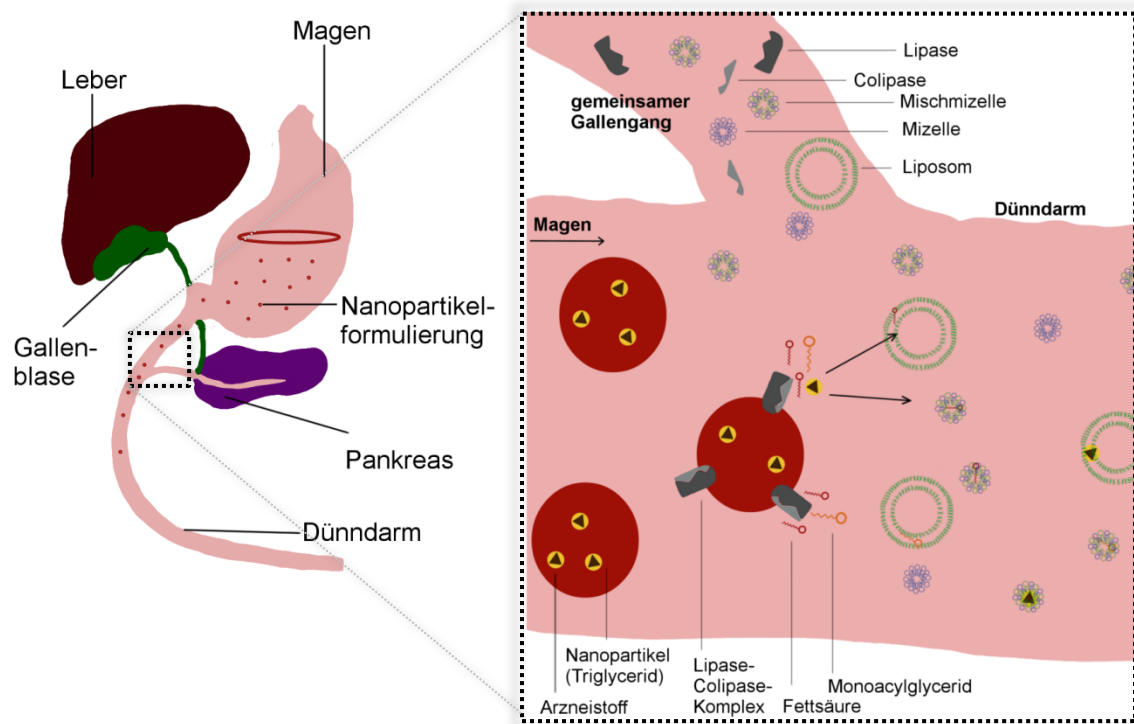


Abb. 1 Intestinaler Abbau von arzneistoffhaltigen, nanoskaligen Lipidformulierungen im oberen Dünndarm.

Die Lipolyseprodukte (MAG und freie Fettsäuren) besitzen einen amphiphilen Charakter und akkumulieren aufgrund dessen an der Grenzfläche, welches zur Hemmung der Lipolyse führt [21]. Die Inhibition tritt besonders bei langkettigen Verdauprodukten durch deren geringe Wasserlöslichkeit auf (10^{-3} M bei mittelkettigen Fettsäuren im Vergleich zu 10^{-7} M bei langkettigen Fettsäuren [22, 23]). Der stetige Abtransport der Produkte ist für den weiterführenden Abbau der Lipide essentiell. Dieser findet durch die Verdrängung der freien Fettsäuren und MAG durch die Gallensalze an der LWG statt [21], wobei diese zusammen mit den Gallensalzen, Phospholipiden und Cholesterol zu Mischmizellen solubilisiert werden [24]. Der Abtransport an der Grenzfläche erfolgt über verschiedene flüssigkristalline Strukturen, die sich je nach Zusammensetzung der verdauten Lipidpartikel unterscheiden können. Ausführliche Studien wurden hierbei von Kossena *et al.* [25], Fatouros *et al.* [26] und Kleberg *et al.* [27] durchgeführt. Eine hohe Spezifität weist die Pankreaslipase für Triglyceride und Diglyceride auf [24]. Aufgrund der Wirkung an der LWG tritt nur eine geringe Aktivität bei MAG auf, welche in Mischmizellen abtransportiert werden [24].

Neben der Lipase sind weitere Enzyme im Pankreassaft enthalten. Die Phosphatidylcholin-2-acylhydrolase (PLA₂) hydrolysiert hauptsächlich Glycerolphospholipide zu freien Fettsäuren und sn-1-Lysophospholipid [14]. Die weiterhin enthaltene Carboxylesterhydrolase (CEH, Cholesterase) ist eine nicht spezifische Esterase mit breiter Substratspezifität [20]. Sowohl Phospholipide, Cholesterolester, diverse Acylglycerole und weitere Ester (z. B. Vitaminester) sowie Lysophospholipide und 2-MAG werden von der CEH hydrolysiert [14, 20]. Diese kombiniert die Eigenschaften von Esterasen, die in wässriger Umgebung agieren, mit denen von Lipasen, deren Wirkort an wasserunlöslichen Lipidsubstraten ist [14].

Weitere Enzyme sind die im Pankreas produzierten Proteine PLRP1, welches keine lipolytische Aktivität zeigt und deren Funktion nach bisherigen Erkenntnissen unbekannt ist [28], und das PLRP2, welches gleichfalls zur CEH eine breite Substratspezifität (z. B. Triglyceride, Phospholipide, Galactolipide, Vitaminester [28]) aufweist und bevorzugt bei Substraten, die kleine Monomere oder Aggregate wie Mizellen bilden, agiert [14].

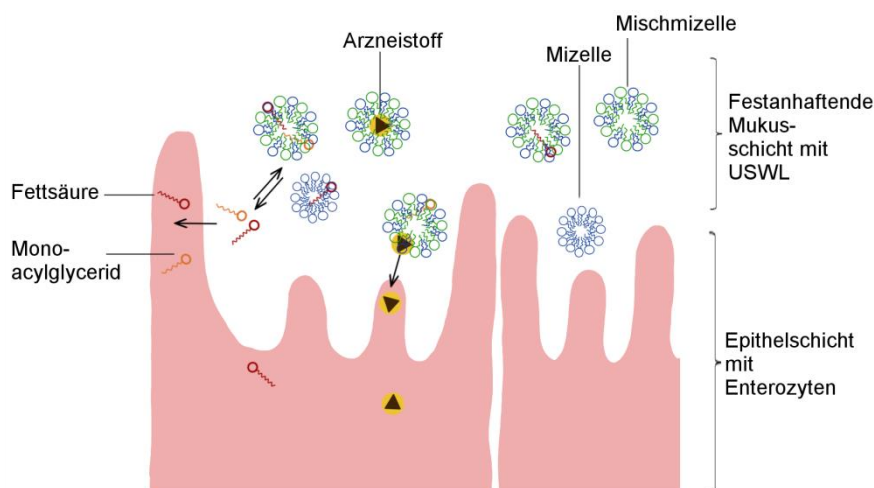


Abb. 2 Aufnahme von Arzneistoffmolekülen sowie Abbauprodukte der Lipidformulierung im Dünndarm.

Die fluide Bulkphase mit dem Chymus ist im Dünndarm von den Enterozyten durch eine schwer durchmischbare Wasserschicht (USWL, *Unstirred Water Layer*) getrennt (Abb. 2) [17]. Diese Schicht bildet zusammen mit dem intestinalen Mukus eine Barriere, die die Fette und NP für die Aufnahme in den Körper überwinden müssen [17]. Die Fette und deren Verdauprodukte weisen eine geringe Löslichkeit auf, wodurch diese hauptsächlich in Form von Vesikeln und Mizellen durch die Wasserschicht zu der Oberfläche der Enterozyten transportiert werden [17]. Nach der Freigabe der lipophilen Moleküle können diese passiv sowie aktiv carriervermittelt in die Enterozyten aufgenommen werden. [17].

Die Erhöhung der Bioverfügbarkeit der Arzneistoffe durch LBDDS beruht auf der Unterstützung des Verdaus durch die zugeführten Lipide, da diese selbst bzw. deren Verdauprodukte verschiedene mizellare Strukturen in Verbindung mit Gallensalzen und Phospholipiden bilden und einer Präzipitation des Arzneistoffes vorbeugen und infolge dessen die Aufnahme in

die Zellen steigern können [29]. Einhergehend wird eine Minimierung des Food-Effektes erreicht [4, 30, 31]. Ebenso wird eine Erhöhung des lymphatischen Transportes des Arzneistoffes mit der Gabe der LBDDS verbunden [17, 29]. Der weitere Transport der Lipidabbauprodukte und der solubilisierten Arzneistoffe wurde ebenfalls intensiv untersucht. Genauere Beschreibungen sind bei Porter *et al.* nachzulesen [17].

1.3 Aufnahme von polymeren Nanopartikeln aus dem Gastrointestinaltrakt

Neben den Lipid-NP wird den Polymer-NP ebenfalls eine Erhöhung der inkorporierten Arzneistoffe zugeschrieben, welche im Gegensatz zu den LBDDS auf eine erhöhte gastrointestinale Stabilität sowie Aufnahme der intakten NP zurückgeführt wird. Hierbei ist besonders die Überwindung der zellnahen Mukusbarriere sowie die Passage über die Darmzellen von besonderem Interesse (Abb. 3). Im Dünndarm befinden sich hauptsächlich Enterozyten und Becherzellen, welche die Nährstoffe aus dem Chymus aufnehmen (Enterozyten) und Mukus (Becherzellen) produzieren [6]. Diese sind mit dem follikelassozierten Epithel, den Peyer-Plaques (PP), durchsetzt, welches als lymphatische Region M-Zellen enthält, die eine wesentlich geringere Schicht Mukus aufweisen [8, 32] und eine flachere Oberfläche als die Enterozyten besitzen [33].

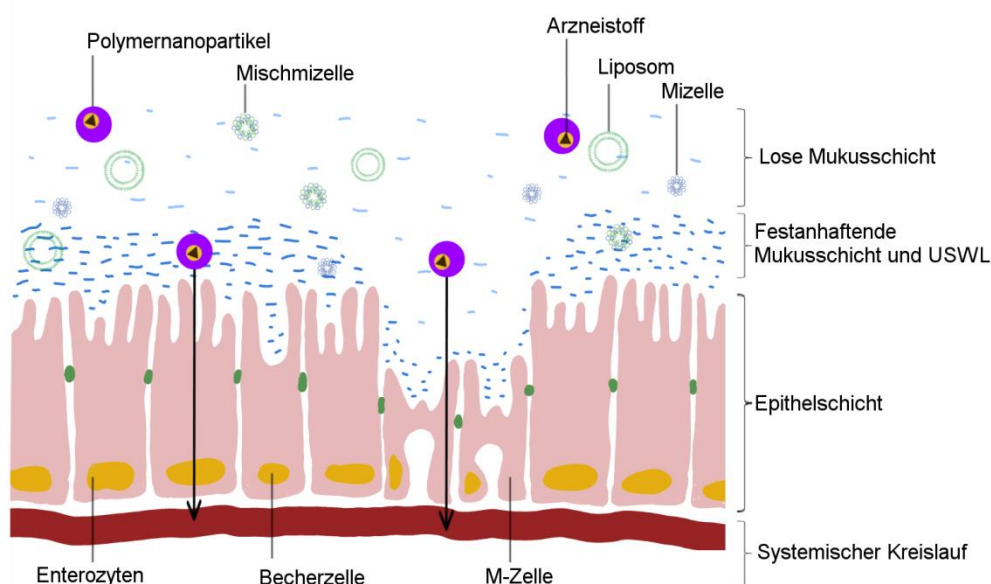


Abb. 3 Aufnahmemechanismen bei arzneistoffhaltigen polymeren NP aus dem Dünndarm mittels des transzellulären Transportweges durch Enterozyten und M-Zellen.

Der Mukus ist ein komplexes Hydrogel, welches aus verschiedenen Proteinen (zum Hauptteil aus Mucin), Kohlenhydraten, Lipiden, Salzen und Antikörpern sowie Bakterien besteht [32]. Die Mukusschicht wird in eine festhaftende Schicht nahe der Darmwand und eine lose

diffuse Mukusschicht unterteilt, die den Transport unverdauter Nahrungsbestandteile durch die Darmpassage unterstützt [32]. Die Stärke der Schichten variiert im GIT und ist im Magen als Säureschutz und im Colon zum Schutz vor den Bakterien am größten [32].

Die intakten NP haben für die systemische Aufnahme aufgrund der Größe und der Zusammensetzung den Mukus als zusätzliche Barriere zu überwinden. Die Interaktionen der NP mit diesem können durch ein Haften bzw. Verbleiben im Mukus, im Speziellen in der losen Schicht, zu einer schnellen Elimination der Partikel führen und einer Aufnahme entgegenwirken. Die verbleibende Zeit im GIT ist in diesem Fall von der physiologischen Erneuerung des Mukus abhängig [5]. Eine erschwerte Aufnahme findet im entzündeten Gewebe, wie bei chronischen Darmerkrankungen, durch die erhöhte Produktion des Mukus statt [34].

Nach dem Durchdringen der Mukusschicht muss die zelluläre Ebene als Barrierschicht überwunden werden [35]. Nach der Adhäsion an die Darmwand kann der enthaltene Arzneistoff direkt zur Aufnahme freigegeben werden [35]. Die Aufnahme der Partikel selbst kann parazellulär und transzellulär erfolgen, wobei der parazelluläre Weg aufgrund der Größe der Partikel eine untergeordnete Rolle spielt [36]. Der transzelluläre Weg kann sowohl bei Enterozyten als auch bei M-Zellen stattfinden, wobei in der Mehrzahl der Veröffentlichungen ein simultanes Auftreten von unterschiedlichen Aufnahmemechanismen beschrieben wird [8]. Der Aufnahmemechanismus der NP scheint in Abhängigkeit zur Oberflächenmodifikation und der Größe zu stehen [8]. Anschließend an die intestinale Aufnahme erfolgt ein Erscheinen der NP im Blutkreislauf durch den direkten Transport in die Blutkapillaren bei Enterozytenaufnahme oder über den im *Ductus thoracicus* bei lymphatischer Aufnahme [8].

1.4 Der Pankreatin-Lipolysetest mittels pH-stat Modell

Je nach Zusammensetzung der nanopartikulären Formulierung kann diese einem Abbau durch gastrointestinale Enzyme unterliegen. Zur Bewertung der Vorgänge im GIT wurde in den letzten Jahrzehnten der Pankreatin-Lipolyse-Test entwickelt, welcher zur Simulation des menschlichen Verdaus angewendet wird. Der Test wurde als Alternative zu den oft kostspieligen und teilweise risikobehafteten *in vivo* Studien in Tieren oder im Menschen entwickelt. Obwohl die experimentellen Details zwischen den Arbeitsgruppen variieren, sind die Theorie und das angewendete Prinzip gleichbleibend [29] und können durch gute *in vitro-in vivo*-Korrelationen dazu beitragen, die *in vivo* Situation besser einzuschätzen [37, 38]. Eingehende Untersuchungen des *in vitro* Lipolysetests zu den Vorgängen während des enzymatischen Abbaus wurden beispielsweise mit Elektronenspinresonanz [39], Cryo-Transmissionselektronenmikroskopie [26], Größenausschlusschromatographie [40], Röntgenkleinwinkelstreuung [41], Gaschromatographie (GC) [42] und Hochleistungsdünnschichtchromatographie (HPTLC) [43–45] vorgenommen.

Die pH-stat Methode wird aufgrund der schnellen, unkomplizierten Handhabung und der kontinuierlichen Kontrolle des Fettverdaus meist bevorzugt. Durch den enzymatischen Verdau entstehen freie (Fett-) Säuren, welche den pH-Wert des Testmediums senken. Die Methode beruht auf der Aufrechterhaltung des ständig sinkenden pH-Wertes durch die Titration mit NaOH-Maßlösung über den Testzeitraum. Die Transitzeit von Formulierungen durch den Dünndarm beträgt zwischen 3-4 Stunden [46], weshalb mindestens 2 h für den Simulationstest der oberen Dünndarmabschnitte ausgewählt werden. Voraussetzung für die Imitation des menschlichen GIT ist die Verwendung biorelevanter Medien. Die als Standard-Tests des Europäischen und U.S. Arzneibuches (EAB und USP) aufgeführten wässrigen Pufferlösungen spiegeln nur eingeschränkt die physiologischen Bedingungen, physikochemischen Eigenschaften (Osmolarität, Ionenstärke, Viskosität und Oberflächenspannung) [47] und Zusammensetzung der Verdaussäfte wider. Zur Untersuchung nahrungsmittelabhängiger Zustände wurden die Medien FaSSIF (*fasted state simulating fluid*) und FeSSIF (*fed state simulating fluid*), die den nüchternen und fettreichen Nahrungszustand simulieren sollen, entwickelt.

Als wichtigstes Enzym wird die Pankreaslipase verwendet, die aus unterschiedlichen Quellen gewonnen werden kann. Neben der isolierten Lipase wird das Enzymgemisch des Pankreasextraktes von Schweinen als Quelle für die Simulation des menschlichen Pankreas verwendet. Dieser enthält alle Enzyme, die vom Pankreas sezerniert werden [20] und weist vergleichbare Eigenschaften zu den humanen Pankreassaften auf [14].

Der Vorteil von den verwendeten Gemischen besteht in der natürlichen Zusammensetzungen der Enzyme und der bereits enthaltenen PLA2 [14] und CEH sowie Colipase, die andernfalls separat zugesetzt werden muss [28]. Durch die breitere Substratspezifität des Gemisches besteht die Möglichkeit, den Verdau zusätzlicher Formulierungsbestandteile zu betrachten.

Als weitere Komponente der biorelevanten Medien sind die Gallensalze essentiell für die Solubilisierung der Verdauprodukte. Statt der Reinstoffe können ebenfalls Gemische von Schweine- oder Rinderursprung verwendet werden, welche die physiologische Situation besser imitieren [38]. Die Gallenextrakte aus Schweinegalle enthalten hauptsächlich mit Glycin konjugierte Gallensäuren und sind hinsichtlich der Konjugation mit den menschlichen Gallensalzen vergleichbar [20].

Im nüchternen Zustand befinden sich 2-6 mmol/l Gallensalze und geringe Konzentrationen an Phospholipiden (0,19-0,26 mmol/l) in dem humanen intestinalen Chymus [48]. Im nahrungsmittelreichen Zustand erhöhen sich diese auf durchschnittlich 15 mmol/l Gallensalze und 3 mmol/l Phospholipide [48]. Daher werden zur Bildung von Mischmizellen *in vitro* die Gallensalze zu Phospholipiden in dem Verhältnis von 4:1 [20, 49–51] bzw. 5:1 [26, 52] eingesetzt.

Weitere Bestandteile zur Einstellung der physiologischen Werte sind Natriumchlorid und Calciumchlorid. *In vivo* werden die Verdauprodukte von im Besonderen langkettigen Lipidformulierungen, welche zur Hemmung der Lipase führen können, von Mischmizellen solubilisiert und im Weiteren aufgenommen. *In vitro* unterstützen die Calciumionen zusammen mit den Mischmizellen das Gleichgewicht zur Bereinigung der LWG durch die Entfernung freier hemmender Fettsäuren unter der Bildung von schwerlöslichen Calciumseifen, womit die Absorption *in vivo* imitiert wird [20]. Die Calciumzugabe kann hierbei anfänglich [37, 49, 50, 53] oder kontinuierlich erfolgen [51, 52].

Die pH-stat Methode zeigt bei der Gegendtitration der (Fett-) Säuren auch Probleme auf, die zu Fehlinterpretationen der Ergebnisse führen können. Durch den enzymatischen Abbau weiterer Verdaumediumbestandteile wie z. B. Gallensalze, Lecithin und durch nicht enzymatische Hydrolyseprozesse können erhöhte Ergebnisse entstehen. Um diese zu vermeiden, muss zusätzlich ein Blindwert aufgenommen werden, der diese Prozesse berücksichtigt. Der Blindwert ist aufgrund der Zusammensetzung von FaSSIF und FeSSIF unterschiedlich und muss jeweils für das entsprechende Medium separat bestimmt werden. Im Allgemeinen ist ein höherer Wert für FeSSIF zu erwarten, da hier ein höherer Anteil an Mischmizellen vorliegt [54].

Weiterhin besteht die Möglichkeit einer Fehleinschätzung der Ergebnisse durch zu geringe Werte. Diese Beobachtung tritt bei unvollständiger Titration der freien (Fett-) Säuren auf, wenn die pH-stat Methode bei einem pH-Wert nahe oder unterhalb des pK_S -Wertes der entsprechenden (Fett-) Säure durchgeführt wird oder die (Fett-) Säure nicht in wässriger Umgebung vorliegt und somit der Titration nicht zugänglich ist [54].

Zur quantitativen Titration müssen die (Fett-) Säuren dissoziiert vorliegen. Das Verhältnis der Dissoziation der entstehenden (Fett-) Säure wird durch die Henderson-Hasselbalch-Gleichung wiedergegeben (Gleichung (1)).

$$pH = pK_S + \log_{10} \frac{c(A^-)}{c(HA)} \quad (1)$$

Die Formel berücksichtigt den Grad der Protonierung in Abhängigkeit zur Säurekonstanten (pK_S -Wert). Am pK_S -Wert besteht die gleiche Verteilung von protonierten zu deprotonierten Komponenten, weshalb bei der Durchführung der pH-stat Methode an diesem pH-Wert annähernd 50 % der entstandenen Säuren detektiert werden. Bei der Durchführung mit einem um 1 höheren pH-Wert sinkt der Fehler auf 10 %, bei zwei Einheiten auf 1 % [54].

Die Gleichung dient zur Verdeutlichung des Einflusses des pH-Wertes bei dem Verdautest. Die Einteilung der freien Fettsäuren kann anhand der Anzahl an C-Atomen in kurzkettig (unter 5 C-Atomen), mittelkettig (6-12 C-Atome) und langkettig (über 12 C-Atome) erfolgen [30]. Small und Mitarbeiter geben den pK_S -Wert kurzkettiger Fettsäuren mit 4,8 in Wasser (30 °C)

an [55]. Bestätigt wird die resultierende gute Wasserlöslichkeit durch Kanicky *et al.* [56]. Ebenso erreichen mittelkettige Verdauprodukte, welche verhältnismäßig hydrophil sind, schnell die wässrige Phase [24] und zeigen eine geringe Abhängigkeit von der mizellaren Solubilisierung [57]. Bei dem Verdau von langkettigen Formulierungsbestandteilen wird der Einfluss des pK_S -Wertes deutlich, da dieser höhere Werte als der verwendete pH-Wert der pH-stat Methode besitzen kann. Die Literaturangaben der pK_S -Werte von langkettigen Fettsäuren schwanken von 4-10 (Tab. 1).

Eine Abhängigkeit des pK_S -Wertes konnte in Zusammenhang mit der Gallensalzkonzentration [58], der Calciumzugabe [51, 59], durch das Vorhandensein von Mischmizellen [60] sowie von der Kettenlänge der Lipide [56] und der möglichen Bindungen an zusätzliche Stoffe (z. B. Albumin) bzw. aufgrund von Oberflächenmodifikationen festgestellt werden [55]. Ebenso ist die Struktur der LWG, die Zusammensetzung des wässrigen Mediums sowie die Ionenstärke und die Oberflächenladung entscheidend [61].

Tab. 1 pK_S -Werte langkettiger Fettsäuren in der Literatur.

Fettsäure	pK_S	Umgebung/Zusätze	Referenz
Myristinsäure	8,1-8,2		[56]
Palmitinsäure	8,6-8,8		[56]
Stearinsäure	10,15		[62]
Ölsäure	9,85		[62]
	4,2	an Albumin gebunden	[55]
	7,5	in Lecithinvesikeln	[55]
	8,0-8,5		[63]
Linolsäure	9,24		[62]
Linolensäure	8,28		[62]

Unter der Betrachtung der vielfältigen Einflüsse ergibt sich besonders bei langkettigen Fettsäuren die Problematik der unvollständigen Titration bei der pH-stat Methode. Durch die Komplexität des Mediums (Gegenwart von Enzymen, Hydrolyseprodukten, Mischmizellen und Vesikeln) kann keine verlässliche Aussage über den pK_S -Wert der zu titrierenden Fettsäuren vorgenommen werden, wodurch bei der nicht vollständigen Dissoziation langkettiger Fettsäuren die Möglichkeit der Fehlinterpretation bei dem Verdau der entsprechenden Formulierung besteht.

Eine ausreichende Erfassung ist nur bei höheren pH-Werten zu gewährleisten. Die pH-Werte im menschlichen Dünndarm liegen in pH-Bereichen von 6,0-7,5 und 5,0-6,6 im nüchternen und fettreichen Zustand [20] und die Aktivität der verwendeten Lipase weist einen pH-Bereich

von 6,5-8 [20] auf. Der verwendete pH-Wert bei der pH-stat Methode stellt infolge dessen einen Kompromiss zwischen den physiologischen Werten und dem Aktivitätsbereich der Lipase dar. Eine Titration in pH-Bereichen über 7 bzw. 8 entspricht nicht den physiologischen Bedingungen.

Zur Erfassung nicht dissoziierter Fett- (Säuren) findet die sogenannte Rücktitration (*Back-titration*) Anwendung, bei welcher der pH-Wert nach Beendigung des Experiments schnell angehoben wird. Der Begriff ist im engeren Sinne falsch gewählt, da es sich durch die fehlende Zugabe weiterer Komponenten um keine eigentliche Rücktitration handelt [20].

Unter Anwendung der Rücktitration wird oftmals der pH-Wert von 9 als Referenzwert angenommen [24, 28, 64, 65], obwohl, wie in Tab. 1 aufgezeigt, die Möglichkeit von höheren pK_s -Werten als 10 bei langkettigen Fettsäuren besteht.

Aufgrund der verbreiteten Anwendung des Pankreatin-Verdautests bei LBDDS ist es zur Optimierung der Formulierungsentwicklung erforderlich, den *in vitro* Test einer ständigen Evaluation, im Speziellen im Hinblick auf langkettige Formulierungsbestandteile, zu unterziehen. Insofern gilt es den Pankreatin-Verdautest bei langkettigen Formulierungen sowie die Methodik der Rücktitration mit einer zweiten dissoziationsunabhängigen Methode zu überprüfen.

1.5 Feste Lipidnanopartikel für die perorale Anwendung

Zur Untersuchung der pH-stat Methode mit langkettigen Fettsäuren wurden feste Lipid-NP (Solid Lipid Nanoparticles; SLN) aus Cetylpalmitat (CP) als ausgewählt. SLN sind im Rahmen der LBDDS als alternative Arzneistoffträgersysteme zu z. B. Nanoemulsionen, Liposomen und Mikroemulsionen entwickelt worden. Im Besonderen hat das Interesse an SLN in den vergangenen Jahrzehnten zugenommen [66]. In den frühen 1990er Jahren wurden SLN erstmalig erwähnt und standen anschließend als Trägersysteme für lipophile Arzneistoffe sowie für Proteine und Peptide im Interesse der Forschung [67]. SLN bestehen im Kern aus festen Lipiden, die mit einer Emulgatorschicht in einer wässrigen Suspension stabilisiert sind und deren Größe im kolloidalen Bereich zwischen 50 und 1000 nm liegt [68]. Als Kernsubstanz werden Triglyceride, Mischungen aus Mono-, Di- und Triglyceriden sowie Wachse, Cholesterole [67] und Fettsäuren [69] verwendet. Die Ausgangsstoffe für die Herstellung der SLN besitzen oftmals GRAS-Status (*Generally Recognized As Safe*) und sind für die p. o. und dermale Nutzung als sicher eingestuft worden [69].

Die Betrachtung des Verdauprozesses sowie die physikochemische Charakterisierung sind wichtig, um das Verhalten des Systems *in vivo* abschätzen zu können. Besonders das Zusammenspiel zwischen den Verdauprodukten, den Mischmizellen aus Gallensalzen und Phospholipiden sowie den weiteren Nahrungsbestandteilen ist für die Vorhersage des Ver-

haltens im GIT bedeutsam [54]. In unerwünschten Fällen mag dies zu einer Verminderung bzw. dem Verlust der Solubilisierungskapazität und zu einer Arzneistoffpräzipitation im Dünndarm führen [50, 53].

Die Mehrzahl der Studien mit p. o. applizierten Lipidpartikeln befasst sich mit SLN aus Mono-, Di- und/oder Triglyceriden, welche mit Verdaustudien umfassend charakterisiert wurden.

CP besteht als Estergemisch aus gesättigten Fettalkoholen und -säuren (C_{14} - C_{18}), wobei hauptsächlich Palmitinsäure und Cetylalkohol vorkommen (Abb. 4).

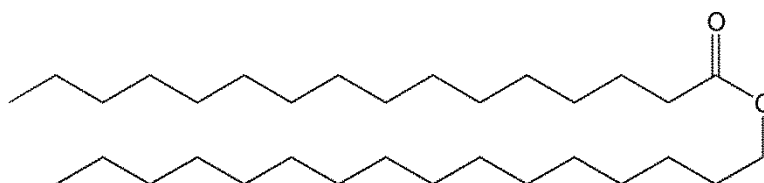


Abb. 4 Strukturformel von Cetylpalmitat, hauptsächlich bestehend aus veresterter Palmitinsäure (C_{16}) und Cetylalkohol (C_{16}).

Auf dem dermatologischen Gebiet wurden umfassende Forschungen mit SLN aus CP (CP-SLN) durchgeführt [70–72]. Im Bereich der p. o. Anwendung wurden SLN aus Wachsen, im Speziellen aus CP, nur in wenigen Veröffentlichungen betrachtet [57, 73]. CP-SLN besitzen aufgrund ihrer einfachen Esterbindung strukturell nicht die klassische Voraussetzung als Substrat für die Pankreaslipase zu agieren. Eine genauere Untersuchung des Abbaus von SLN mit langkettigen Fettsäuren dient dem Informationserwerb für eine mögliche erweiterte Anwendung von CP-SLN und kann den *in vitro* Pankreatintest mit der pH-stat Methode einer kritischen Betrachtung unterziehen.

1.6 Polymernanopartikel für die perorale Anwendung

Das vermehrte Interesse an Polymer-NP wird an der in den letzten Jahrzehnten gestiegenen Anzahl an Veröffentlichungen, die sich mit der p. o. Applikation von bioabbaubaren Polymeren befassen, sichtbar [10].

Als häufig verwendete Polymere stehen, neben dem nicht bioabbaubaren Polystyrol, die bioabbaubaren Polymere auf Basis von Poly(D,L-lactid) (PLA), Polyglycolid (PGA) und Poly(D,L-lactid-co-glycolid) (PLGA, Abb. 5) im Vordergrund der Untersuchungen.

Diese Polymere sind wichtige Ausgangsstoffe für parenterale Arzneistoffträgersysteme mit Zulassungen von der FDA (Food and Drug Administration) und EMA (European Medicines Agency) [34]. Der Abbau dieser Trägersysteme kann hierbei von wenigen Wochen bis hin zu Monaten bzw. Jahren durch das Verhältnis der Milchsäure zur Glykolsäure gesteuert werden [74].

Weitere Vorteile ergeben sich aus der Vielfalt der Arzneistoffträgersysteme, die aus diesen Polymeren, im Besonderen aus PLGA, für effektive Therapien hergestellt werden können.

Beispiele hierfür sind neben NP und Mikropartikeln (MP), *in situ*-gelierende Systeme [75], Implantate für parenterale [76] und okuläre Anwendung [77] sowie Implantate für die Anwendung im Innenohr [78].

Zurückzuführen ist diese hohe Anzahl auf die sehr gute Biokompatibilität und die Bioabbaubarkeit in körpernahe, gut verträglich Produkte [76, 79]. Neben der parenteralen Anwendung gelangt ebenso die p. o. Anwendung weiter in den Fokus [6, 34, 80].

Die intensive Forschung an PLGA-NP ist auf die Möglichkeit der Überwindung zahlreicher Barrieren im Körper (auch im GIT) begründet, welche mit der Gabe von Arzneistoffen verbunden sind [81]. Hierbei wurde in der Literatur mehrfach von der Aufnahme von PLGA-NP nach p. o. Gabe berichtet [82–86], welche über die PP oder die Enterozyten angegeben wird [7].

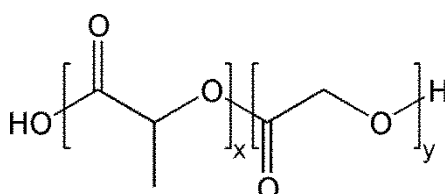


Abb. 5 Formel von dem Polymer PLGA (Poly(D,L-lactid-co-glycolid)).

PLGA-NP besitzen dementsprechend die Voraussetzung, als effektive Transportsysteme für die Absorptionserhöhung von Arzneistoffen aus dem GIT zu agieren. In den bisherigen Studien wurde u. a. von der Abhängigkeit der Aufnahme von der Größe, der Oberflächenladung, der Form und Elastizität der Partikel sowie der physikalischen und chemischen Stabilität berichtet [7]. Erfolgreich wurden Studien mit unterschiedlichen Coatings und Oberflächenmodifikationen im Speziellen mit Chitosan [87, 88], Polyethylenglycol (PEG) [89, 90], Lectinen [91, 92], Lecithinen und Gallensalzen [93, 94] durchgeführt.

Im Vergleich zu den nicht verkapselten Arzneistoffen wurden eine höhere Bioverfügbarkeit und verlängerte Zeiträume, in denen der Arzneistoff im systemischen Kreislauf gemessen werden könnte, beobachtet [95]. Neben der Beschreibung der direkten Aufnahme entwickelte sich parallel ein weiteres Forschungsgebiet für die Verwendung p. o. applizierter polymerer NP. Durch die Anwendung der Polymer-NP bei chronischen Darmkrankheiten, zu denen Colitis ulcerosa und Morbus Crohn gehören und die eine chronische Behandlung erfordern [96], wurden positive Effekte erzielt [87, 97–103]. Diese konträren Anwendungsgebiete verlangen verschiedene Eigenschaften der NP, um eine Aufnahme oder einen Verbleib im GIT zu gewährleisten. Ein geringer intestinaler Abbau ist jedoch die Grundvoraussetzung für die effektive Aufnahme der Partikel oder die Wirkung in tieferen Darmabschnitten. Dieser Aspekt wurde bei den bisherigen Forschungen nur unzureichend betrachtet, da die Polymere im Vergleich zu Triglyceriden keine Strukturmerkmale wie die Lipidsubstrate für die Lipase bereitstellen. Hierbei wird oft angenommen, dass die Polymermatrix den Arzneistoff gegen den enzymatischen und hydrolytischen Abbau schützt [5] bzw. diesem selbst nicht unterliegt. Für

Stabilitätsmessungen werden infolge dessen enzymfreie Salzsäure pH 1,2 und phosphatgepufferten Lösungen für die Imitation des GIT eingesetzt.

Landry *et al.* haben sich als eine der ersten Arbeitsgruppen mit der Problematik des enzymatischen Verdaus von bioabbaubaren Polymeren befasst [104]. Diese erforschten eingehend die Abbaucharakteristik von Albumin-stabilisierten PLA-NP. Albumin wird innerhalb kurzer Zeit in enzymhaltigem SGF (*Simulated Gastric Fluid*) und SIF (*Simulated Intestinal Fluid*) abgebaut, so dass die PLA-NP frei untersucht wurden. In den Studien wurde gezeigt, dass PLA-NP im SIF im Gegensatz zum SGF einem enzymatischen Abbau durch Pankreatin unterliegen können, womit auch polymere NP sensitiv für die Einfluss von Enzymen scheinen, die für den natürlichen Fettabbau verantwortlich sind [104]. Es beschäftigen sich insgesamt nur wenige Studien mit der Möglichkeit des Pankreatin-induzierten Abbaus von Polymer-NP [104–107].

In Anbetracht des umfangreichen Interesses an p.o. applizierten PLGA-NP gibt es auf diesem Gebiet des intestinalen Verdaus der Partikel dringenden Forschungsbedarf. Der *in vitro* Lipolyse-Test ist eine einfache Möglichkeit, auch die Polymer-NP einer genaueren Betrachtung durch den möglichen enzymatischen Abbau zu unterziehen.

1.7 Multispektrale Fluoreszenzbildgebung im Mausmodell für Verdaustudien

Das Wissen über das *in vivo* Verhalten im GIT von Polymer-NP ist bisher wegen der schwierigen Detektion in dem komplexen Milieu ebenso begrenzt und dient zur Überprüfung der *in vitro* erhobenen Ergebnisse.

Zur Untersuchung von NP stehen *in vivo* für erste Studien hauptsächlich Kleintiere, wie Mäuse und Ratten, zur Verfügung. Bei der Verwendung von diesen Tieren im Verdaumodell müssen anfänglich die anatomischen Unterschiede des GIT betrachtet werden.

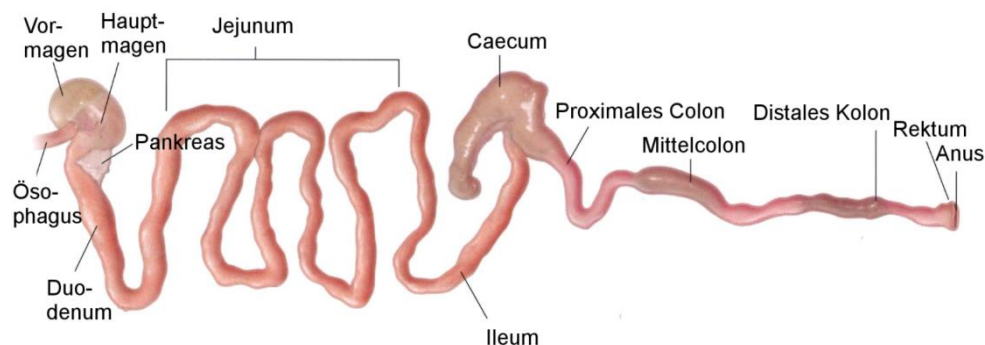


Abb. 6 Isolierter Gastrointestinaltrakt der Maus. Modifiziert nach [108].

Der murinen Magen zeigt im Vergleich zum humanen Magen eine sichtbare Zweiteilung (Abb. 6). Der weißgraue Vormagen ist ein Blindsack und mit Schleimhaut ausgekleidet [109], welcher drüsen- und muskelarm ist und etwa 2/3 des Gesamtmagens einnimmt [109, 110].

Der Magen ist durch eine erhöhte Trennlinie geteilt, die die unterschiedlichen Gewebe des Vormagens und des Hauptmagens abgrenzt (ähnlich der Z-Linie, die den humanen Magen von dem distalen Ösophagus trennt) [108]. Der Hauptmagen ist analog zum humanen Magen in Kardial, Fundus und Antrum unterteilt, wobei das Futter einige Zeit im Vormagen durch dessen Vorratsfunktion verbleibt und erst im Hauptmagen proteolytischen und amylolytischen Prozessen unterliegt [110]. Anschließend folgt der Dünndarm, welcher gleichfalls dem humanen in Duodenum, Jejunum und Ileum aufgeteilt ist [108]. Das Caecum ist im Vergleich größer [110] und trägt durch die hohe Anzahl an Bakterien zur Zersetzung der Nahrungsbestandteile bei [111]. Die Maus besitzt im Gegensatz zum Menschen keinen Wurmfortsatz und nur ein sehr kurzes Rectum, wobei die Kotpelletbildung hauptsächlich schon im distalen Colon stattfindet [111]. Als weitere Unterschiede sind für die Betrachtung der Aufnahme von NP die Anzahl und Lage der PP zu beachten, da Nagetiere eine erhöhte Anzahl [112] und eine andere Verteilung im Darm im Vergleich zum Menschen besitzen [108].

Bisherige Studien zu Verteilungen und Aufnahmen von NP im GIT wurden *ex vivo* mit Radio- [84] oder Fluoreszenzmarkierung [89, 113] sowie *in situ* mittels des Perfusionsmodells [114–118] durchgeführt. Die Möglichkeiten für die nicht invasive Verlaufskontrolle von p.o. applizierten NP sind stark begrenzt bzw. bis jetzt kaum genutzt worden. Die häufig in der Tumorforschung eingesetzte multispektrale Fluoreszenzbildgebung dient *in vivo* als ein nicht invasives Verfahren zur Erkennung und Verlaufskontrolle solider Tumoren sowie deren Ansprechen auf vorhandene und neue Therapieoptionen [119–122]. Bisher wurde diese Technik nur in sehr wenigen Studien mit p.o. applizierten NP für die Verteilung genutzt. So untersuchten Lee *et al.* Cy5.5-markiertes ZnO über den Verlauf von 7 h in Ratten [123] und Chen *et al.* zeigten die Verteilung von Sulforhodamin B-markierten Lipid-NP im Tiermodell [124]. Erste Erfahrungen mit Polymerpartikeln zeigten Panthani *et al.* mit $\text{CuInSe}_x\text{Se}_{2-x}/\text{ZnS}$ Komplex inkorporiert in PLGA-MP [125] und Ali *et al.* bei 6-Cumarin-beladenen PLGA-NP für die Colonanwendung [102]. Aufgrund der unzureichenden Betrachtung des möglichen Abbaus der Partikel im GIT in den bisherigen Veröffentlichungen gilt es, diese Aspekte im Tiermodell näher zu untersuchen.

2 Zielstellung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte die Herstellung, Charakterisierung sowie die Untersuchung des intestinalen Verdaus von Lipid- und Polymer-NP vorgenommen werden.

Untersuchung des *in vitro* Verdaus von langkettigen Lipid-NP

Für die Weiterentwicklung und zur Erhöhung der Aussagekraft von *in vitro* Tests gilt es diese stetig zu evaluieren. Im Hinblick auf den vielfältigen Einsatz von Hilfsstoffen mit langkettigen Fettsäuren sollte diese Arbeit anhand von Lipidpartikeln mit CP das pH-stat Modell im Vergleich mit der dissoziationsunabhängigen HPTLC sowie der häufig angewendeten Rücktitration betrachten. Hierbei sollte detailliert auf die Abhängigkeit der Erfassung von langkettigen Fettsäuren und den Abbau der Formulierung von der Stabilisierung eingegangen werden. Als weiteres Forschungsziel sollte der Einfluss der Lipase in den Abbauprozess von Wachsen betrachtet werden.

Untersuchung des *in vitro* Verdaus von Polymer-NP

Bei p. o. applizierten Polymer-NP ist im Widerspruch zu der vermehrten Anwendung nur wenig über das Verhalten im GIT und den möglichen Abbau bekannt. Die vorliegende Arbeit sollte die Thematik des intestinalen Abbaus mittels *in vitro* Untersuchungen mit der pH-stat Methode und einem spezifischen L-Lactat-Nachweis (L-Lactat-NW) näher betrachten. Im Besonderen sollte das Ausmaß des Verdaus von PLGA-NP sowie der mögliche Einfluss von Stabilisatoren untersucht werden. Im Weiteren sollte der Anteil der Lipase im Abbauprozess durch den Einsatz von einem Lipasehemmer überprüft werden.

Untersuchung des Verhaltens von Polymer-NP im GIT *in vivo*

Für die *in vivo* Betrachtung der Polymer-NP sollte ein geeignetes Mausmodell für p. o. applizierte NP unter Einbeziehung des Verdaus etabliert werden. Hierfür sollte der Transit von fluoreszenzmarkierten Partikeln mittels der nicht invasiven Fluoreszenzbildgebung betrachtet werden. Begleitende *ex vivo* Analysen sowie fluoreszenzmikroskopische Gewebeuntersuchungen sollten zur Bewertung des Verdau- und Verteilungsverhaltens sowie der Interaktion mit Darmgeweben und der möglichen Aufnahme von PLGA-NP dienen.

Unter Anwendung dieser Methoden und Ergebnisse sollte die vorliegende Arbeit zur Weiterentwicklung der pH-stat Methode und durch das verbesserte Verständnis von Lipid- und Polymer-NP im GIT zum zielgerichteten Entwickeln von NP als Arzneistoffträger beitragen.

3 Materialien und Methoden

3.1 Materialien

Tab. 2 Materialien.

Inhaltsstoff	Firma	Bemerkung
Partikelherstellung		
Cetylpalmitat	BASF, Deutschland	Kollicream® CP15
PLGA	Evonik, Deutschland	Resomer® RG 503
	Evonik, Deutschland	Resomer® RG 503 H
PEG-PLGA	Evonik, Deutschland	PEG-PLGA 5000 10 % (m/m)
Poloxamer 188	BASF, Deutschland	Kolliphor® P188
Polysorbat 80	BASF, Deutschland	Kolliphor® PS80
Macrogol (15)-hydroxystearat	BASF, Deutschland	Kolliphor® HS 15
Polyvinylalkohol	Nippon Gohsei, Japan	Gohsenol® EG-05 PW
	Merck, Deutschland	Emprove® 4-88
	Merck, Deutschland	Emprove® 5-88
	Merck, Deutschland	Emprove® 8-88
	Merck, Deutschland	Emprove® 18-88
Orlistat, Tetrahydrolipstatin	Roche, Schweiz	
Glucosemonohydrat	Caelo, Deutschland	
Fluoreszenzfarbstoffe		
DarkFatRed	Dyomics, Deutschland	Absorption: 678 nm, Emission: 701 nm in Ethanol (lt. Hersteller)
DY-780	Dyomics, Deutschland	Absorption: 782 nm, Emission: 800 nm in Ethanol (lt. Hersteller)
Verdaumedi		
Pankreatin, 8xUSP	Sigma-Aldrich, USA	Pulver vom Schweinepankreas
Gallensalzextrakt	Sigma-Aldrich, USA	Ursprung: Schwein
Phospholipide	Lipoid, Deutschland	Phospholipon® 90 G
Pepsin	Sigma-Aldrich, USA	Ursprung: Schwein
Tris-Maleat-Puffer	C. Roth, Deutschland	
Calciumchlorid	Grüssing, Deutschland	wasserfrei, reinst
Natriumchlorid	Grüssing, Deutschland	reinst
Natriumhydroxid-Maßlösung	C. Roth, Deutschland	Roti® Volum, 0,1 mol/l

Inhaltsstoff	Firma	Bemerkung
EDTA (Ethylendiamintetraes- sigsäure-Dinatrium- Magnesiumsalz Tetrahydrat)	Fluka [®] Analytical, Schweiz	≥ 98,5 %
Referenzsubstanzen		
Cetylalkohol	Fluka [®] Analytical, Schweiz	≥99,5 %, Analytischer Standard
Cetylpalmitat	Fluka [®] Analytical, Schweiz	pharm. secondary standard
Palmitinsäure	Sigma-Aldrich, USA	≥ 99 %
Organische Lösungsmittel		
Ethanol	VWR, Deutschland	HiPerSolv CHROMANORM [®] ; Reinheit mind. 99,8 %; Gehalt: 96,0- 96,3 % (V/V)
Hexan (Extraktionsmittel)	Merck, Deutschland	LiChrosolv [®] (Reinheit ≥ 99.0 %)
Hexan (Laufmittel)	C. Roth, Deutschland	Rotisolv [®] ; HPLC-Qualität
Ethylacetat	C. Roth, Deutschland	Rotisolv [®] ; HPLC-Qualität
Methanol	VWR, Deutschland	HiPersolv CHROMANORM [®]
Aceton	VWR, Deutschland	HiPersolv CHROMANORM [®]
Tetrahydrofuran	Grüssing, Deutschland	reinst
Dichlormethan	C. Roth, Deutschland	reinst
weitere Substanzen/ Materia- lien		
Kupfersulfat x 5 H ₂ O	Grüssing, Deutschland	
Kaliumchlorid	Grüssing, Deutschland	reinst
Eindeckmedium	Dako, Dänemark	Fluorescent Mounting Medium
Phosphorsäure 85 %	J.T.Baker [®] , Avantor, USA	BAKER ANALYZED™ Reagent, zur Analyse
Mittelkettige Triglyceride	H&R, Deutschland	Pionier MCT
EDC-HCl	C. Roth, Deutschland	1 Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)- carbodiimidhydrochlorid, ≥ 99.0 %
NHS	C. Roth, Deutschland	N-Hydroxysuccinimide, ≥ 99.0 %
Ultrafiltrationsmembranen	Pall Corporation, USA	Nanosep device 100 K

3.2 Methoden

3.2.1 Herstellung von festen Lipidnanopartikeln

Die SLN wurden mittels temperierter Hochdruckhomogenisation hergestellt. Die Suspensionen enthielten einen Lipidanteil von 10 % CP und wurden mit den Emulgatoren Polysorbat 80 (PS80) oder Poloxamer 188 (P188) stabilisiert. Die resultierenden Proben wurden entsprechend ihres enthaltenen Emulgators gekennzeichnet (CP-SLN P188 und CP-SLN PS80). Das CP wurde auf einem separaten Wasserbad (80 °C) bis zur vollständigen Schmelze erhitzt. Zu dieser Schmelze wurde die wässrige Emulgatorlösung (2,0 % m/m) hinzugegeben und im Wasserbad mit einem Rotor-Stator-Mixer (Ultra Turrax® T18, IKA®-Werke, Deutschland) für 5 min bei 22000 U/min grob homogenisiert. Die Voremulsion wurde bei 500 bar durch einen im Wasserbad (60 °C) befindlichen EmulsiFlex-C5 (Avestin, Kanada) mit 5 Zyklen im diskontinuierlichen Modus gegeben. Nach der Herstellung wurden die erhaltenen Proben im Eiswasserbad heruntergekühlt.

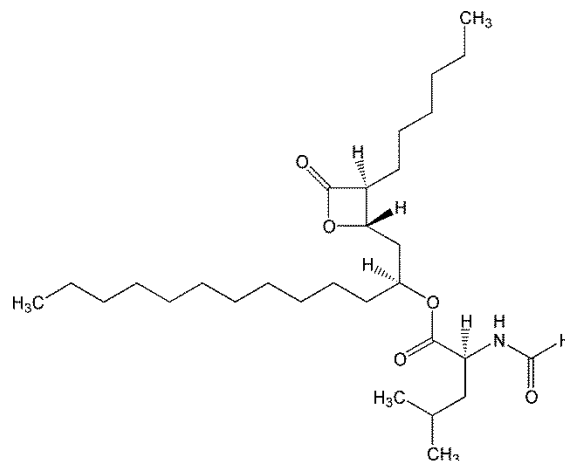


Abb. 7 Strukturformel des spezifischen Lipasehemmers Orlistat (Tetrahydropipstatin).

Zusätzlich wurden mit dem Lipaseinhibitor Orlistat versehene Proben hergestellt, die mit P188 stabilisiert wurden (CP-SLN P188 + O)(Abb. 7). Hierzu wurde eine ethanolische Lösung (10 mg/ml) des Lipaseinhibitors zu dem geschmolzenen CP (0,5 % (m/m) bezogen auf den Lipideinsatz) hinzugegeben. Der übrige Herstellungsprozess wurde, wie oben beschrieben, durchgeführt. Alle Proben wurden in Glasvials bei 4-8 °C im Kühlschrank für weiterfolgende Versuche gelagert.

3.2.2 Herstellung der Polymernanopartikel

Herstellung der PLGA-NP

Die PLGA-NP wurden mittels der Nanopräzipitationsmethode hergestellt [126]. Das Polymer PLGA Resomer® RG 503 (L-Lactat (25 %), D-Lactat (25 %) und Glykolsäure (50 %)) wurde

zu einer Konzentration von 6 mg/ml in Aceton gelöst. Anschließend wurde die organische Lösung in eine wässrige stabilisatorhaltige (0,6 % m/m) Lösung getropft, die zuvor durch einen 0,2 µm Sterilfilter gegeben wurde. Als Stabilisatoren wurden hierbei P188 (PLGA-NP P188), PS80 (PLGA-NP PS80) sowie Polyvinylalkohol (PVA; PLGA-NP PVA) eingesetzt. PVA wurde mit den in Tab. 3 aufgelisteten Molekulargewichten in der Menge von 0,1 % (m/m) eingesetzt, wobei PVA I über einen breiteren Bereich mit folgenden Mengenanteilen untersucht wurde: 0,1 %, 0,3 %, 0,6 %, 1,0 % und 3,0 % (m/m). Durch die Mischbarkeit des Acetons mit der wässrigen Lösung fällt das darin enthaltene nicht wasserlösliche Polymer als NP aus. Das verbleibende Aceton wurde mittels eines Rotationsverdampfers schrittweise entfernt. Ab 60 mbar wurde unter Anwendung eines 30 °C warmen Wasserbades die Konzentration von PLGA auf 1,0 bzw. 1,5 mg/ml eingestellt. Bei der Formulierungsentwicklung wurden die NP mittels des Mikroskops Axio Lab. (Zeiss, Deutschland) auf das Vorhandensein von Partikeln im Mikrometerbereich untersucht.

Tab. 3 Charakteristische Eigenschaften der verwendeten PVA-Typen nach Angaben der jeweiligen Hersteller. Als Kurzbezeichnung wurde PVA I-V verwendet.

Kurzbezeichnung	Handelsname	Deacetylierungsgrad	Viskosität einer wässrigen Lösung (40 g/l)
PVA I	Gohsenol [®] EG-05 PW	88 %	5 mPa·s
PVA II	Emprove [®] 4-88	88 %	4 mPa·s
PVA III	Emprove [®] 5-88	88 %	5 mPa·s
PVA IV	Emprove [®] 8-88	88 %	8 mPa·s
PVA V	Emprove [®] 18-88	88 %	18 mPa·s

Herstellung der orlistathaltigen PLGA- NP

Als weiteres Ziel der Studie wurden Untersuchungen zum Anteil der Lipase am Abbauprozess von PLGA-NP vorgenommen.

Für die Herstellung der orlistathaltigen Partikel (PLGA-NP P188+O) wurde eine ethanolische Lösung (10 mg/ml) des Lipasehemmers (0,5 % (m/m) bezogen auf den Polymergehalt) zu der organischen Phase (Aceton) gegeben, zusammen mit dem Polymer gelöst und anschließend wie oben beschrieben weiterverarbeitet. Diese Probe wurde mit P188 stabilisiert.

Herstellung der pegylierten PLGA-NP (PEG-PLGA-NP)

PEG-PLGA 5000 10 % (m/m) wurde in Tetrahydrofuran zu einer Konzentration von 20 mg/ml gelöst. Die organische Lösung wurde unter Rühren (400 U/min) mit einer Glasspritze bzw. Mikroliterpipette kontinuierlich in die wässrige stabilisatorhaltige Lösung in einem Becherglas gegeben. Nach der Überführung wurde wie oben beschrieben weiter verfahren. Die Lagerung der Proben erfolgte bis zur Weiterverwendung im Kühlschrank.

3.2.3 Herstellung der *in vivo* verwendeten fluoreszenzmarkierten Polymer-nanopartikel

Für die *in vivo* Versuche wurde die multispektrale Fluoreszenzbildgebung angewendet. Durch die starke Absorption des sichtbaren Lichtes von biologischen Chromophoren, im Speziellen Hämoglobin, gelangen die kürzeren Wellenlängen (blau und grün) nur wenige Millimeter ins Gewebe [127], wohingegen rote und Nahes Infrarot (NIR) Spektralbereiche wesentlich tiefere Gewebeschichten erreichen [128]. Andere biologische Komponenten, wie z. B. Lipide, sind jedoch transparent im sichtbaren und NIR Spektralbereich [127]. Aufgrund dessen ergibt sich für die Emission der Fluoreszenzfarbstoffe *in vivo* ein Bereich von 600-1000 nm [127]. Die Fluoreszenzmarkierung der Partikel wurde mittels Inkorporierung in die PLGA-NP sowie mittels Labeling an das Polymer durchgeführt.

Kovalent gelabelt fluoreszenzmarkierte PLGA-NP

Um eine stabile Amidbindung zu erhalten, wurde das PLGA Resomer[®] 503H mit endständiger Säuregruppe zusammen mit einem aminogruppenderivatisierten Fluoreszenzfarbstoff (DY-780 Aminoderivat, Abb. 8) zu einem kovalent gelabelten Polymerkonjugat umgesetzt. Das Labeling des Polymers wurde von Herrn Tom Wersig durchgeführt.

Die Säuregruppe von dem PLGA wurde über die Bildung eines N-Succinimidesters über 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimidhydrochlorid (EDC-HCl) und N-Hydroxysuccinimide (NHS) aktiviert. Anschließend erfolgte die Umsetzung des NHS-Esters mit der Aminogruppe des Fluorenzfarbstoffes. Resomer[®] 503 H (100 mg) wurde in Dichlormethan (getrocknet über P₂O₅) zu einer Konzentration von 10 mg/ml gelöst und zusammen mit EDC-HCl (0,8 mg) und NHS (0,6 mg) in einen 10 ml Reaktionskolben gegeben. 1 mg des Farbstoff DY-780 Amino wurde in 1 ml DCM gelöst und tropfenweise über 30 min der Reaktionslösung zugegeben. Der Ansatz wurde für 48 h bei Raumtemperatur mit 600 U/min (C-MAG HS 7, IKA[®]-Werke, Deutschland) unter Lichtschutz gerührt.

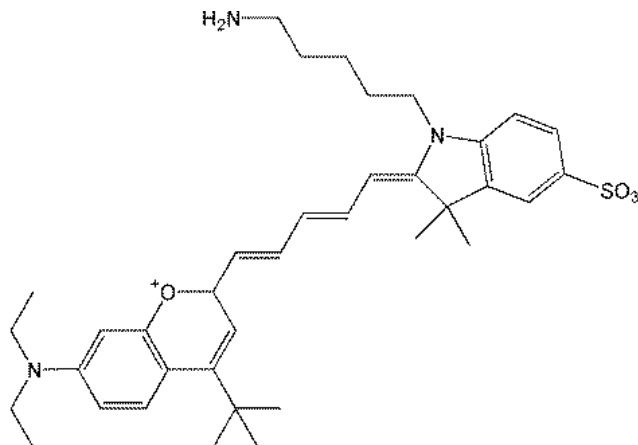


Abb. 8 Strukturformel von DY-780, welches für die kovalente Markierung des PLGA Resomer 503 H mit einer Aminogruppe versehen ist.

Anschließend wurde das Dichlormethan mittels eines Rotationsverdampfers bis auf 1 ml eingedampft. Die aufkonzentrierte Lösung wurde tropfenweise in 100 ml kalten Ethanol getropft und stark gerührt (800 U/min), um das Syntheseprodukt zu präzipitieren. Der Vorgang wurde 3x wiederholt. Das Polymerkonjugat wurde in 10 ml getrocknetem Aceton aufgenommen und für die weitere Verarbeitung aliquotiert. Das Aceton wurde mittels Vakuum für 48 h entfernt und die Aliquote bei -18 °C gelagert. Die Herstellung der NP aus dem gelabelten PLGA erfolgte wie in Kapitel 3.2.2 beschrieben (PLGA-NP 780). Die Suspension wurde auf eine Konzentration von 10 mg/ml PLGA-NP 780 für die p.o. Proben und 20 mg/ml für die intravenös (i.v.) verabreichten Proben eingestellt.

DarkFatRed-Partikel und -Lösung

Die Polymere PLGA RG 503 mit dem Stabilisator PVA I 0,1 % und PEG-PLGA 5000 10 % (m/m) wurden zur Herstellung der nichtkovalent markierten Fluoreszenzpartikel PLGA-NP DFR und PEG-PLGA-NP DFR verwendet. Der Farbstoff DarkFatRed (DFR) emittiert im roten Spektralbereich und wurde als Derivat von FatRed auf Anfrage von der Firma Dyomics (Deutschland) für die Versuche hergestellt. DFR kann sich speziell in lipophile Bereiche der Partikel im Herstellungsprozess einlagern und besitzt ein entsprechendes Emissionsmaximum im roten Spektralbereich für die Detektion mit dem Maestro™ Imager. Der Farbstoff (1 mg/ml; ethanolische Lösung) wurde zu einem Anteil von 0,5 % (bezogen auf den Polymergehalt) verwendet. Während der Herstellung wurde der Farbstoff zur organischen Phase hinzugefügt und zusammen mit dem Polymer in die wässrige Phase gegeben. Für die weitere Partikelherstellung wurde nach der oben beschriebenen jeweiligen Anweisungen für PLGA-NP und PEG-PLGA-NP verfahren. Die Suspensionen wurden auf eine Konzentration von 10 mg/ml PLGA bzw. PEG-PLGA (entsp. 50 µg/ml DFR) eingestellt.

Die für weitere *in vivo* Versuche verwendete DFR-Lösung wurde mit Kolliphor® HS 15 (HS15; 0,25 % (m/m)) stabilisiert und enthielt ebenfalls 50 µg/ml DFR.

Einstellung der Osmolalität und des pH-Wertes

Nach der Herstellung wurden die fluoreszenzmarkierten Proben auf physiologische Werte von 286 mOsmol/kg (p.o. und i.v. Proben) und pH-Wert 7,4 (i.v. Proben) eingestellt. Nach der Messung der Osmolalität (Halbmikro-Osmometer K-7400, Knauer, Deutschland) der Probe wurde diese mit Glukosemonohydrat bei Bedarf erhöht. Die Einstellung des pH-Wertes erfolgte mittels pH Elektrode (Portamess® 911pH, Knick, Deutschland) mit Natriumhydroxid-Lösung (0,01 mol/l). Die für die i.v.-Anwendung vorgesehenen Proben wurden aseptisch hergestellt und vor der Anwendung durch einen 0,8 µm Filter gegeben.

3.2.4 Photonenkorrelationsspektroskopie

Die Charakterisierung der Größenverteilung der Partikel wurde mittels dynamischer Lichtstreuung/Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS) mit dem Zetasizer Nano-ZS (Malvern Instruments, UK) mit der Zetasizer Software Version 6.30 im *Backscattering Modus* (173°) durchgeführt. Die Proben wurden für die Messung entsprechend (CP-SLN 1:50; PLGA-NP 1:33) mit gefiltertem (0,2 µm) bidestillierten Wasser verdünnt. Die Messungen wurden bei einer Temperatur von 25 °C durchgeführt und es wurde der Mittelwert nach fünfmaliger Probenmessung verwendet. Für die Auswertungen wurde die intensitätsgewichtete Größenverteilung sowie der Z-Average und Polydispersitätsindex (PDI) herangezogen. Die Proben wurden nach der Herstellung und für die Stabilitätsuntersuchungen in regelmäßigen Abständen gemessen.

3.2.5 Laserdiffraktometrie

Die CP-SLN wurden zusätzlich mittels der Laserdiffraktometrie (LD) mit dem Mastersizer 2000 (Malvern Instruments, UK) und der Software Mastersizer 2000 (Version 5.60) vermessen. Als Lichtquellen dienten ein roter Laser mit 633 nm und eine Blaulichtdiode mit 450 nm. Die Messungen wurden in fünfmaliger Wiederholung mit einem Brechungsindex von 1,44 und einer Absorption von 0,01 ausgeführt. Die Ergebnisse wurden unter Anwendung der Mie-Theorie berechnet. Neben der volumengewichteten Größenverteilung wurden die Parameter D10, D50 und D90 zur Auswertung genutzt.

3.2.6 Nanoparticle Tracking Analysis

Die Größenmessung mittels Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) wurde mit dem NanoSight NS300 (Malvern Instruments, UK) mit der Software NanoSight NTA 3.1 durchgeführt. Es wurde ein Modul mit einem Laser von 642 nm verwendet. Für die Messungen wurden die Proben in filtriertem (0,2 µm) bidestillierten Wasser verdünnt und auf 40-50 Partikel je Bildausschnitt eingestellt. Die Temperatur betrug 25 °C. Die Aufnahme erfolgte mit einer sCMOS Kamera. Hierbei wurden jeweils 5 Frames zu 60 s von verschiedenen Bildausschnitten von jeder Probe aufgenommen. Zur Vermeidung von Rückständen zwischen den Messungen wurde zwischen jeder Messung mit gefiltertem (0,2 µm) bidestillierten Wasser gespült und die Probenkammer auf Vorhandensein von Partikeln überprüft. Zur Auswertung wurde der von der Software errechnete Mittelwert und Modus verwendet.

3.2.7 Zetapotential

Die Messungen des Zetapotentials (ZP) wurden mit dem Zetasizer ZS Nano (Malvern Instruments, Malvern, UK) bei 25 °C durchgeführt. Die Verdünnung der Proben mit 0,2 mmol/l KCl-Lösung erfolgte im Verhältnis 1:50. Jede Messung wurde in fünf Messzyklen mit einer jeweils 20 s dauernden Pause zwischen den Zyklen gemessen.

3.2.8 Dynamische Differenzkalorimetrie

Die Untersuchungen der CP-SLN mittels dynamischer Differenzkalorimetrie (DSC) wurden mit der Netzsch DSC 200 (Netzsch, Deutschland) durchgeführt. Die Proben wurden in Aluminiumtiegel eingewogen und Stickstoff diente als inertes Spülgas. Die DSC Messungen wurden von -10 °C bis 85 °C (CP-SLN) und von 10 °C bis 120 °C (Orlistat) durchgeführt. Anschließend an den ersten Heizvorgang wurden eine Kühlkurve sowie eine darauffolgende 2. Aufheizkurve aufgenommen. Die Heiz- und Kühlrate betrug jeweils 5 K/min.

3.2.9 Transmissionselektronenmikroskopie

Die Probenvorbereitung der Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) wurde von Herrn Dr. Hause und Mitarbeitern durchgeführt. Die Vermessung der Proben erfolgte anschließend in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Hause.

Zur Probenpräparation wurden 3 µl von den Probendispersionen auf einen Kupfer-Netzträger (*Grid*) mit einem Formvar-Film aufgetragen. Nach der Absorptionszeit von einer Minute wurde die überschüssige Probe mittels eines Filterpapiers abgezogen.

Anschließend wurden die Proben für 10 s luftgetrocknet und im Folgenden mit Wasser gewaschen (3 x je eine Minute). Die Probenplättchen wurden mit einer 2 %igen Uranylacetatlösung für eine Minute inkubiert. Die Proben wurden an einem EM 900 Transmissionselektronenmikroskop (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Deutschland) bei einer Beschleunigungsspannung von 80 kV vermessen. Die Aufnahme der Mikroskopbilder erfolgte mit einer Variospeed SSCCD Kamera SM-1k-120 (TRS, Deutschland).

3.2.10 Verwendete Verdaumedien

Simulierter Magensaft (SGF)

Die Simulation der Versuche im Magenmilieu wurde mittels pepsinhaltigem SGF (entsprechend Ph. Eur. 8.0) durchgeführt. Die Mediumherstellung erfolgte mit Zugabe von 3,2 g Pepsin (0,32 %), 2,0 g NaCl und 80 ml Salzsäure (1 mol/l) zu 1 l SGF pH 1,2. Es erfolgte kein Zusatz von gastrischer Lipase, da humane gastrische Lipase kommerziell nicht verfügbar ist

[129]. Alternativ eingesetzte mikrobielle Lipasen weisen erhebliche Spezifitätsunterschiede im Vergleich zu humaner Lipase auf [129].

Die Proben mit Polymer-NP wurden zu einer Konzentration von 1 mg/ml im Medium über 120 min inkubiert und wurden auf Größenveränderungen mittels PCS und die Entstehung von L-Lactat untersucht.

Simulierter Verdau im Dünndarm

Zur Herstellung der Gallensalz-Phospholipid-Stammlösung wurde der Gehalt des heterogenen Gallensalzextraktes mittels des Testes Bile acids (Diasys Diagnostics Systems GmbH, Deutschland) im Zentrallabor des Universitätsklinikums Halle (Saale) bestimmt. Die Stammlösung enthielt 30 mmol/l Gallensalze sowie das Lecithin Phospholipon® 90G (gereinigtes Phosphatidylcholin aus pflanzlicher Herkunft) in dem Verhältnis 5:1. Für die Berechnung des Verhältnisses wurde der von dem Hersteller angegebene mittlere Gehalt an Phosphatidylcholin von 98 % zugrunde gelegt. Für die Gallensalz/Lecithin-Vormischung wurde der vorgelegte Trismaleat-Puffer auf 60 °C in einem Kolben erhitzt und die benötigte Menge Lecithin hinzugegeben. Nach einer Stunde unter Rühren wurden zu der Mischung die Gallensalze hinzugefügt und bis zum Lösen der Gallensalze bei 37 °C temperiert. Anschließend wurde der restliche Trismaleat-Puffer hinzugefügt. Die Stammlösung wurde im Kühlschrank bis zur Verwendung gelagert.

Die Simulation des Milieus im Dünndarm wurde mit den Inkubationsmedien FaSSIF (*Fasted State Simulating Fluid*) und FeSSIF (*Fed State Simulating Fluid*) durchgeführt. Als Grundlage der Medien wurde Trismaleat-Puffer pH 6,8 verwendet, welchem direkt vor dem Einsatz die entsprechende Menge Natriumchloridlösung (4,5 mol/l in Trismaleat-Puffer), Calciumchloridlösung (0,15 mol/l in Trismaleat-Puffer) sowie die vorher hergestellte Stammlösung von Gallensalzen und Lecithin hinzugefügt wurde. Die Konzentrationen der Bestandteile in den Medien sind in Tab. 4 aufgelistet. FaSSIF simuliert den nüchternen Zustand mit einer geringen Menge an dem Gallensalzen/Lecithin-Gemisch, wohingegen FeSSIF den fettreichen Zustand nach der Nahrungsaufnahme simuliert.

Tab. 4 Zusammensetzung der Medien FaSSIF und FeSSIF.

Komponente	FaSSIF	FeSSIF
Trismaleat-Puffer	5 mmol/l	5 mmol/l
Natriumchlorid	150 mmol/l	150 mmol/l
Calciumchlorid	5 mmol/l	5 mmol/l
Gallensalz/Lecithin-Mischung (Gallensalzgehalt)	5 mmol/l	15 mmol/l

3.2.11 Verdaustudien mit der pH-stat Methode

Zur Simulation des Verdauens im Dünndarm wurde die Autotitration mit der pH-stat Methode (DL 21, Mettler Toledo, Deutschland) angewendet (Abb. 9). Die Proben wurden zu dem Verdauemedium FaSSIF oder FeSSIF in der Konzentration von 10 mg/ml in 10 ml (Lipid-NP) bzw. von 1 mg/ml in 15 ml (Polymer-NP) hinzugefügt. Die Menge der Testvolumina wurde hinsichtlich der geringen Probenkonzentrationen der NP angepasst. Die Unterschiede zwischen den Lipid-NP und den Polymer-NP liegen in der jeweiligen verbesserten Aufarbeitung der Proben für die anschließenden Tests mit der HPTLC (Lipid-NP) sowie auf L-Lactat (Polymer-NP) begründet. Das Verdauexperiment wurde in einem Wasserbad bei 37 °C durchgeführt, wobei die Temperatur durch ein Thermoelement (Yellow line TC 3 IKA, Deutschland) eingestellt wurde. Der pH-Wert wurde kontinuierlich mit der pH-Elektrode (Mettler Toledo InLab[®] Semi-Micro pH, Deutschland) unter Rühren gemessen. Das Medium wurde in einer Vortitration automatisch auf den pH-Wert 6,8 mit Natriumhydroxid-Maßlösung (0,1 mol/l) eingestellt. Anschließend wurde der Verdau durch die Zugabe des Pankreatinextraktes entsprechend 450 U/ml Lipaseaktivität initiiert [130, 131]. Der Wert der Lipaseaktivität wurde von der Firma Sigma (USA) bereitgestellt.



Abb. 9 Aufbau der pH-stat-Apparatur, bestehend aus einem Vorratsgefäß mit NaOH-Maßlösung, Titrereinheit sowie temperierten Reaktionsgefäß mit Medium, Probe und pH-Wert Messung.

Der pH-Wert von 6,8 wurde durch die Titration mit Natriumhydroxid-Maßlösung (0,1 mol/l) stetig konstant gehalten. Der detektierte Verbrauch wurde mittels des Programms Hyperterminal aufgenommen und diente zur Berechnung der entstandenen freien (Fett-)Säuren. Die Versuche wurden über einen Zeitraum von maximal 120 min durchgeführt. Zur Erfassung von pH-Wertänderungen und dem möglichen Verdau des Mediums, wurden jeweils entsprechende Blindwerte aufgenommen, wobei die Probenmenge durch die entsprechende Menge an Trismaleat-Puffer ersetzt wurde. Es wurden weiterhin Blindversuche mit Orlistat durchgeführt, um eine mögliche Hemmung des Abbaus der Medien zu detektieren. Hierzu wurden 0,05 ml Orlistatlösung (10 mg/ml in Ethanol) zusätzlich vor Versuchsbeginn zu den Medien hinzugefügt.

Die hemmende Wirkung der Orlistatformulierung wurde zuvor mit einer P188-stabilisierten MCT-Nanoemulsion (10 % (m/m)) getestet, welche mit dem EmulsiFlex-C5 (750 bar, 5 Zyklen im diskontinuierlichen Modus) hergestellt worden war.

3.2.12 Rücktitration

Zur Erfassung nicht dissoziierter Fettsäuren wurde bei dem Lipidverdau eine Rücktitration (*Backtitration*) angeschlossen. Hierbei wurde der pH-Wert nach Beendigung des Verdauexperimentes von 120 min schnell und kontinuierlich auf die jeweiligen pH-Werte 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5 und 10,0 angehoben und der Verbrauch an Natriumhydroxid-Maßlösung (0,1 mol/l) detektiert. Auch hier wurden entsprechende Blindversuche durchgeführt.

3.2.13 Hochleistungsdünnschichtchromatographie

Nach Beendigung der 120 min des pH-stat Verdaus ohne Rücktitration bei den Lipid-NP wurde 1 ml EDTA-Lösung (70 mmol/l) zum Medium hinzugegeben und zur Hinderung weiterer enzymatischer Prozesse wurden die Proben sofort mit flüssigem Stickstoff gefroren. Anschließend erfolgte eine Lyophilisation der Proben. Der verbleibende Rückstand wurde mit einem Hexan/Ethanol-Gemisch (2:1 V/V) über 45 min unter mehrmaligem Schütteln extrahiert, anschließend für 20 min zentrifugiert (2028 RCF, Heraeus Labofuge 300, Thermo Fisher Scientific, USA) und der Überstand nach entsprechender Verdünnung (Hexan/Ethanol-Gemisch (2:1 V/V)) in einem Glasvials bei -18 °C zur Analyse mittels HPTLC gelagert.

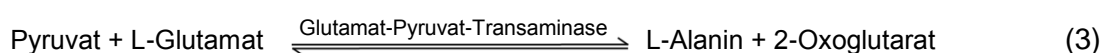
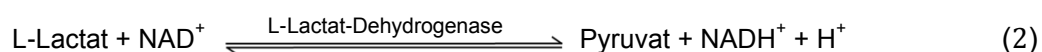
Tab. 5 Laufmittelzusammensetzung der verwendeten Stufen bei der HPTLC Analyse der CP-SLN.

Stufe	Laufstrecke in mm	n-Hexan in % (V/V)	Ethylacetat in % (V/V)
1	20,0 mm	70,0	30,0
2	25,1 mm	73,0	27,0
3	30,2 mm	76,0	24,0
4	35,3 mm	79,0	21,0
5	40,4 mm	82,0	18,0
6	45,5 mm	85,0	15,0
7	50,6 mm	88,0	12,0
8	55,7 mm	91,0	9,0
9	60,8 mm	94,0	6,0
10	65,9 mm	97,0	3,0
11	71,0 mm	100,0	0,0

Die Proben wurden auf Silica Gel Platten (HPTLC silica gel 60 F254 GLP, Merck, Deutschland) mittels der Auftrageinheit (Automatic TLC Sampler 4 (ATS), CAMAG, Schweiz) appliziert. Die Entwicklung der Platten wurde mit dem AMD 2 (CAMAG, Schweiz) unter Anwendung eines 11-stufigen Gradienten durchgeführt (Tab. 5) [132, 133]. Abschließend wurden die Platten für zweimal 10 s in eine Kupfersulfatlösung (150 g/l Kupfersulfat-Pentahydrat, 8 % (V/V) Phosphorsäure 85 %, 5 % (V/V) Methanol in destilliertem Wasser) getaucht [134] und für 20 min bei 150 °C im Trockenschrank getrocknet. Die Platte wurde mithilfe der Spektrodensitometrie bei 675 nm (TLC Scanner 3, CAMAG, Schweiz) analysiert. Die detektierten Fettsäuren wurden mittels einer internen Kalibrierung mit Palmitinsäure auf jeder Platte im Bereich von 0,4-1,2 µg berechnet.

3.2.14 L-Lactat-Nachweis

Nach Beendigung der Messzeit von 120 min bei den Polymer-NP wurde 1 ml Salzsäure (1 mol/l) zur Inaktivierung der Enzyme zum Medium hinzugegeben. Die Probe wurde anschließend für 15 min zentrifugiert (2028 RCF, Heraeus Labofuge 300, Thermo Fisher Scientific, USA) und in Glasvials abgefüllt, die bei 4-8 °C im Kühlschrank gelagert wurden. Diese Proben wurden mit dem spezifischen L-Lactat-NW (r-biopharm AG, Deutschland) auf Gehalt an L-Lactat im Überstand untersucht. Entsprechende Blind- und Hydrolyseversuche wurden durchgeführt. In dem Test wird L-Lactat zu Pyruvat mittels des Enzyms L-Lactatdehydrogenase unter der Entstehung von NADH⁺ umgesetzt (Gleichung 2).



Der Gehalt an NADH⁺ wurde UV-spektroskopisch (Spekol[®] 1200, Analytik Jena, Deutschland) mit der Software Aspect plus (Version 1.5) bei 340 nm bestimmt. Um eine Gleichgewichtseinstellung der Gleichung auf Seite des NADH⁺ zu erhalten, wurde das Pyruvat mittels L-Glutamat und der Glutamat-Pyruvat-Transaminase aus dem Gleichgewicht entfernt (Gleichung 3). Die Menge an NADH⁺ entspricht stöchiometrisch der von L-Lactat. Der Test wurde nach Anweisung des Herstellers durchgeführt. Die Proben wurden mit einem Absorptionsblindwert verglichen, der mit destilliertem Wasser anstatt der Probe hergestellt worden war. Die Differenz zwischen den Proben und dem Absorptionsblindwert sollte mindestens 0,1 für ein valides Ergebnis betragen. Diese wurde anschließend zur Berechnung des L-Lactat Gehaltes in den jeweiligen Proben herangezogen.

3.2.15 Tierstudien

Für die Untersuchungen wurden männliche und weibliche haarlose Mäuse SKH1 (SKH1-*H^{flr}*; Charles River Laboratories, USA) verwendet.

Diese Tiere zeichnen sich durch ihr fehlendes Fell und ihren Albinohintergrund für Fluoreszenzstudien aus. Den Tieren wurde vor und während der Versuche Wasser und Futter *ad libido* bereitgestellt. Von den physiologisch eingestellten Proben wurden 200 µl p.o. über eine Sonde in den Magen der Tiere bzw. 100 µl über die Schwanzvene für i.v. Versuche verabreicht. Die Tiere wurden für die Bildaufnahmen narkotisiert. Hierzu stand ein Isoflurangasnarkosesystem (Drägerwerk AG, Deutschland) zur Verfügung. Zur initialen Betäubung wurden 4 % Isofluran verwendet. Die Erhaltungsdosis lag zwischen 1,5-2,0 % und der Sauerstoffvolumenstrom betrug 2-3 l/min. Während der Messungen wurden die Tiere auf einer schwarzen beheizbaren Wärmeplatte (35 °C) gelagert, um ein Auskühlen zu vermeiden. Die Beobachtungszeit betrug für die p.o. Experimente 4 h bzw. 8 h, für die i.v. Experimente 24 h. Zum letzten Imagezeitpunkt wurden die Tiere getötet.

Nach Beendigung des *in vivo* Beobachtungszeitraumes wurden von jedem Tier die Organe Leber und Niere sowie der gesamte Magen-Darm-Trakt entfernt und getrennt mit dem Maestro™ Imager analysiert. Der Magen wurde weiterhin längsseitig aufgeschnitten, mehrfach mit Phosphatpuffer pH 7,4 (bereitgestellt von dem Universitätsklinikum) gespült und auf eine Präparationsplatte aufgespannt. Dieser wurde ebenfalls separat mit dem Maestro™ Imager untersucht. Weitere Gewebeproben wurden für die Fluoreszenzmikroskopie entnommen (Kapitel 3.2.18). Für die Tierstudien wurden für die p.o. applizierten Partikelformulierungen jeweils 6 Tiere (entsp. 3 Tiere pro Entnahmezeitpunkte 4 h und 8 h) sowie je 3 Tiere für Kontrollformulierungen und die nicht behandelten Mäuse eingesetzt.

3.2.16 Multispektrale Fluoreszenzbildgebung

Bei der multispektralen Fluoreszenzbildgebung (*multispectral Fluorescence Imaging* (msFI)) besteht die Besonderheit in der Trennung spezifischer Spektrensignale von Fluoreszenzfarbstoffen voneinander sowie von Autofluoreszenz- und Hintergrundsignalen. Als Folge kann eine Zuordnung der jeweils spezifischen fluoreszierenden Bereiche und Anreicherungsregionen von den entsprechenden Farbstoffen vorgenommen werden. Das msFI wurde mit dem Imager Maestro™ *In-vivo* Fluorescence Imaging System (Cambridge Research and Instrumentation, USA) durchgeführt. Die Maestro™ Software Version 2.10.0 wurde für die Aufnahmen und Auswertung der Bilder genutzt.

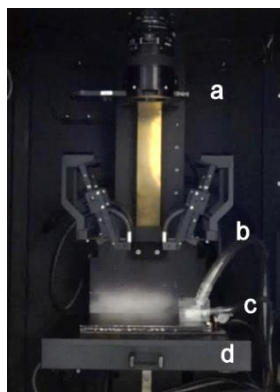


Abb. 10 Aufbau der Belichtungskammer des Maestro™ Imagers. a) Emissionsfilter b) schwenkbare Beleuchtungsarme c) Narkosemaske für die Versuchstiere d) höhenverstellbarer Probenstisch.

Eine 300 W Xenonlampe diente dem Maestro™ Imager als Lichtquelle. Das Licht passiert die auswechselbaren Anregungsfilter und wird zur Ausleuchtung der Aufnahmekammer unter Justierung von 4 Ausleuchtungsarmen genutzt (Abb. 10). Die verwendeten Filtersätze sind in Tab. 6 aufgeführt. Für eine entsprechende Ausleuchtung und Aufnahmeposition ist zusätzlich zur Lampenposition die Tischhöhe manuell einstellbar. Je nach zu untersuchender Probe wurde diese so eingestellt, dass die Probe zentral positioniert und gut ausgeleuchtet war und für alle weiteren Proben gleicher Art wurden diese Einstellungen in gleicher Weise beibehalten. Das emittierte Fluoreszenzlicht wurde nach Passieren des Emissionsfilters, der verbleibendes Anregungslicht ausschließt, und eines computergesteuerten Flüssigkristallfilters (LCTF-*Liquid Crystal Tunable Filter*) von einer auf 8 °C gekühlten 1,5 MP CCD Kamera aufgenommen. Zusätzlich zu den Fluoreszenzbildern wurde jeweils mit Weißlicht ein Graustufenfoto der jeweiligen Probe oder des Tieres aufgenommen. Um Überbelichtungen zu vermeiden, wurde mit der automatisch ermittelten optimalen Belichtungszeit gearbeitet.

Tab. 6 Verwendete Filtersets des Maestro™ *In-vivo* Imaging Systems.

Filterset	Anregungsfilter	Longpass-Emissionsfilter	Aufnahmebedingungen (in 10 nm Schritten)
Rot	615-665 nm	700 nm	680-950 nm
NIR	710-760 nm	800 nm	780-950 nm

3.2.17 Auswertung der Fluoreszenzaufnahmen

Der Maestro™ Imager nimmt jeweils eine Datei (*Cube*) auf, welche die entsprechenden spektralen Informationen für die Probe enthält (Abb. 11a). Die *Cubes* wurden mit Bibliotheken von Referenzspektren analysiert. Mittels der *Unmixing* Funktion isoliert die Software 12-bit Graustufenbilder für jedes Fluoreszenzsignal, welche separat für Quantifizierungen sowie für Vergleiche genutzt werden können.

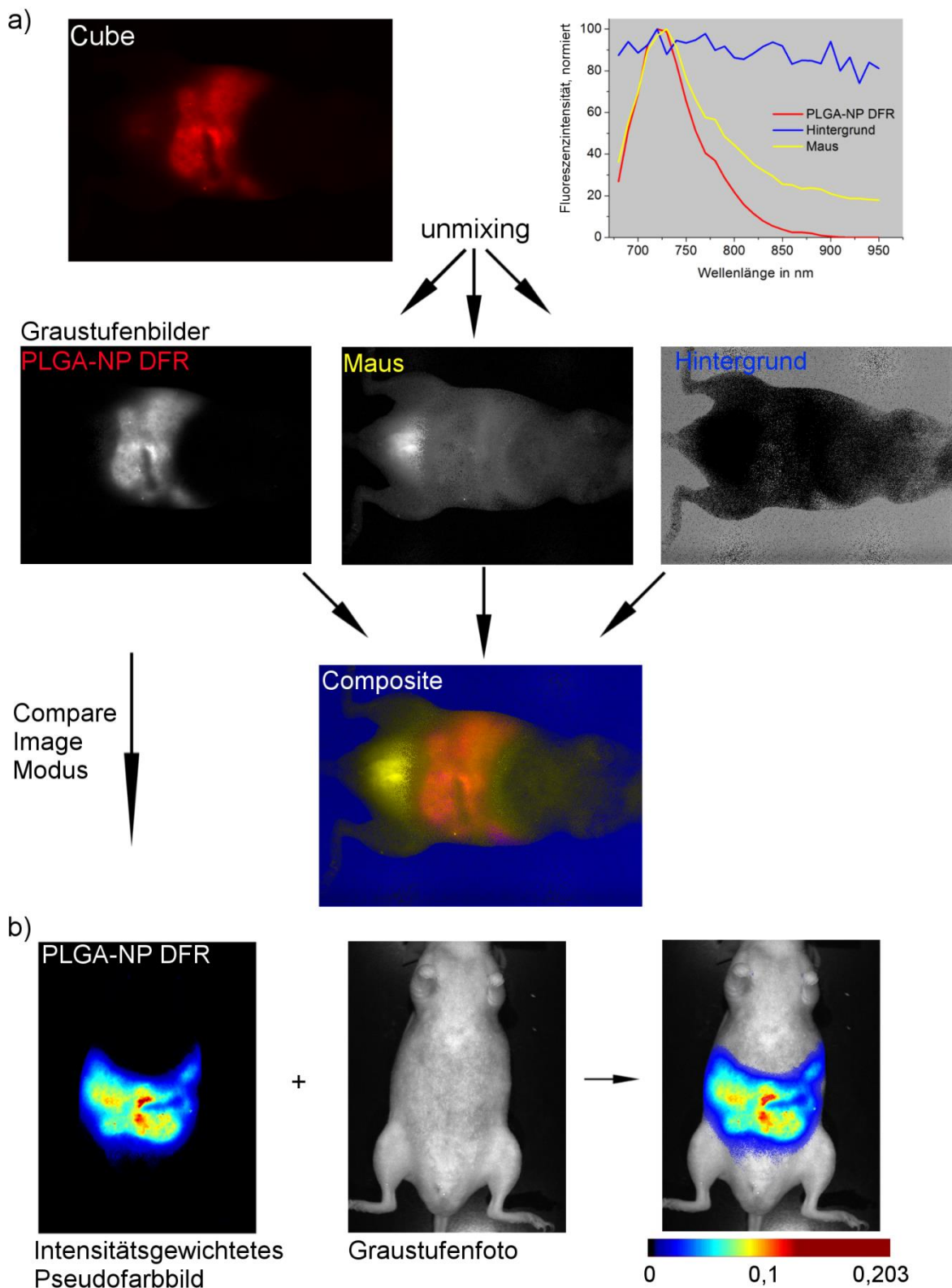


Abb. 11 Bildverarbeitung der *Cubes* des Maestro™ Imagers. a) *Unmixing* des *Cubes* mit der Spektralbibliothek in Graustufenbilder. Anschließend können diese zu einem *Composite* zusammengefügt werden. b) Die Graustufenbilder können in der *Compare Image* Funktion als Pseudofarbbild dargestellt werden und über das Graustufenfoto gelegt werden.

Bei der Anwendung des *Measure Panels* zur Berechnung der Fluoreszenzintensität der Organe wurde die gesamte Bildfläche der Graustufenbilder ausgewertet.

Zur Veranschaulichung der Fluoreszenzintensität innerhalb des isolierten Graustufenbildes kann dieses in der *Compare Image* Funktion der Software als Pseudofarbbild dargestellt und anschließend separat über das entsprechende Graustufenfoto gelegt werden (Abb. 11b). Dieser Schritt wurde mittels des GNU Image Manipulation Programms (GIMP, Version 2.8) durchgeführt, in dem schwarzgefärbte Bereiche, die eine Fluoreszenzintensität von Null aufweisen, als transparent gesetzt wurden. In der *Compare Image* Funktion können auch mehrere Bilder desselben Spektralbereiches miteinander verglichen werden. Die Skala wird auf den hellsten Punkt der vergleichenden Bilder normiert und wird von der Software in *scaled counts/s* unter Einbeziehung der Gleichung (4) angegeben.

$$scaled\ counts/s = \frac{counts}{2^{bit\ depth}} * \frac{1}{exposure\ time\ (s)} * \frac{1}{Binning^2} * \frac{1}{Gain} \quad (4)$$

Die Referenzspektren der Partikel sowie die Autofluoreszenz von unbehandelten Mäusen und des Hintergrundes wurden für die Auswertung der Proben in der spektralen Bibliothek hinterlegt. Falls aufgrund der ähnlich verlaufenden Spektren und der Signalintensität des Farbstoffes und der Autofluoreszenz bzw. der Nahrung der Mäuse eine Auftrennung dieser Proben nicht möglich war, wurde eine Trennung anhand der Intensitäten im direkten Vergleich mit der unbehandelten Maus oder des unbehandelten Gewebes vorgenommen. Um die hier auftretenden Unterschiede und Gemeinsamkeiten bei den Intensitäten hervorzuheben wurden die Aufnahmen der unbehandelten Mäuse jeweils mit in die Auswertung einbezogen.

3.2.18 Fluoreszenzmikroskopie

Die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen wurden mit einem Leica DM4000B Durchlichtmikroskop durchgeführt, welches mit dem Nuance[®] Ex multispectral Imagingsystem von PerkinElmer (USA) kombiniert ist. Als Lichtquelle wurde eine 200 W Halogen-Metaldampflampe verwendet. Die Filtersets für den roten sowie für den NIR Spektralbereich (Tab. 7), bestehend aus einem schmalen Anregungsfilter und einem Longpass-Emissionsfilter, wurden für die Versuche genutzt.

Nach Passieren der jeweiligen Filter und des computergesteuerten Flüssigkristallfilters (LCTF) wurde das Fluoreszenzlicht von einer auf 8 °C gekühlten 1,4 MP CCD Kamera aufgenommen. Die Software Nuance[®] Version 3.0.1.2 erstellt *Cubes*, welche alle spektralen Informationen des verwendeten Spektralbereiches enthalten. Die Belichtungszeit zur Auf-

nahme des *Cubes* wurde von der Software optimal bestimmt, um Über- oder Unterbelichtung der Proben zu vermeiden. Der Aufbau der Software Nuance[®] ist mit der des Maestro[™]-Systems vergleichbar, daher wurde die Datenverarbeitung der *Cubes* in der gleichen Weise durchgeführt wie in Kapitel 3.2.17. beschrieben.

Tab. 7 Verwendete Filtersets des Fluoreszenzmikroskops.

Filterset	Anregungsfilter	Longpass-Emissionsfilter	Aufnahmebedingungen (in 10 nm Schritten)
Rot	620-660 nm	665 nm	670-850 nm
NIR	710-775 nm	780 nm	785-950 nm

Hierzu wurden separate spektrale Bibliotheken mit der Autofluoreszenz von den Objektträgern sowie der Partikel und der unbehandelten Gewebeproben erstellt. Die Gewebeproben von jeweils etwa 1 cm Länge wurden aus dem Vormagen und den verschiedenen Dünndarmabschnitten (Duodenum, Jejunum und Ileum) der Tiere entnommen. Anschließend wurden diese zur Entfernung anhaftender Futtermittelreste mehrfach mit Phosphatpuffer pH 7,4 (bereitgestellt von dem Universitätsklinikum) gespült. Nach der Präparation auf die Objektträger wurden diese mit einem flüssigem Eindeckmittel (Fluorescent Mounting Medium, Dako, Dänemark) und einem Deckgläschen versehen, um das Austrocknen der Probe zu minimieren. Zur Identifikation verbleibender Futterreste wurden in destilliertem Wasser aufgeweichte Futterpellets sowie mit PLGA-NP DFR behandelte Futterpellets untersucht. Hierzu wurden die Pellets mit den Partikelproben über 120 min inkubiert und anschließend drei Waschstufen mit destilliertem Wasser mittels Zentrifugation (IKA Mini G, IKA, Deutschland) durchgeführt. Danach wurden die Proben auf Objektträger mit Deckgläschen präpariert und sofort untersucht.

3.2.19 Statistische Auswertung

Zur Ermittlung der Mittelwerte sowie Standardabweichungen wurden, wenn nicht anders erwähnt, n = 3 zugrunde gelegt. Die Berechnungen wurden mit Excel 10 (Microsoft Corporation, USA) durchgeführt. Die Darstellung der Graphen wurde mittels OriginPro 8G (OriginLab Corporation, USA) vorgenommen.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 *In vitro* Verdaustudien mit langkettigen Lipidnanopartikeln¹

Die Verringerung der Partikelgröße bei NP geht mit einem erhöhten Oberflächen-Volumen-Verhältnis einher, wodurch eine Agglomeration, besonders auch im GIT, hervorgerufen werden kann [135]. Die Agglomeration ist ein bekanntes Problem bei Partikeln im Nanometerbereich, weswegen der Einsatz eines Emulgators erforderlich ist [135]. Die Stabilisierung von Nanosuspensionen können durch Ladungsstabilisierungen oder sterische Stabilisierungen erreicht werden, wobei die Ladungsstabilisierung im GIT aufgrund der unterschiedlichen, vorherrschenden pH-Werte zur Neutralisation und somit zum Verlust der Stabilisierung führen kann [135].

Aufgrund dieser Betrachtung wurden nichtionogene sterisch stabilisierende Emulgatoren verwendet. Neben der Untersuchung des Verdaus der CP-SLN sollte als weiterer Aspekt die Verdaubarkeit der Emulgatoren und deren Einfluss auf den Verdaus der CP-SLN berücksichtigt werden. Im Gegensatz zu Emulgatoren wie PEG-Ester (wie z. B. PS80), die veresterte Fettsäuren enthalten und anfällig für den enzymatischen Abbau sind [65], konnte für PEG-Ether wie Brij[®] 97 [49] oder Poloxamere [44] kein Verdaus festgestellt werden. Aus diesem Grund wurden zur Herstellung der CP-SLN die Emulgatoren P188 (CP-SLN P188) und PS80 (CP-SLN PS80) eingesetzt. Beide Emulgatoren sind häufig verwendete Stabilisatoren bei Lipidformulierungen [136].

4.1.1 Herstellung der Cetylpalmitatnanopartikel

Zur Herstellung von Nanodispersionen unterhalb des Mikrometerbereiches mit festen Lipiden ist die Hochdruckhomogenisation die am häufigsten genutzte und effektivste Methode [136]. Mit hohem Druck (100-2000 bar) wird die Flüssigkeit, die das zu zerkleinernde Gut enthält, durch einen wenige Mikrometer breiten Spalt gepresst [136]. Die dabei auftretenden hohen Geschwindigkeiten auf den kurzen Distanzen können über 1000 km/h erreichen und führen zu hohen Scherkräften, wodurch die Partikel in Kombination mit den auftretenden Kavitationskräften stark zerkleinert werden [136]. Die gewünschte Partikelgröße der resultierenden Suspension ist von Parametern wie der Zyklenzahl, dem angewendeten Druck oder der Verfahrensweise im kontinuierlichen bzw. diskontinuierlichen Modus abhängig [137, 138]. Zu

¹ Ergebnisse dieses Kapitels wurden publiziert in:

Heider M, Hause G, Mäder K (2016) Does the commonly used pH-stat method with back titration really quantify the enzymatic digestibility of lipid drug delivery systems? A case study on solid lipid nanoparticles (SLN). Eur J Pharm Biopharm 109:194–205

berücksichtigen gilt, dass der Verdau von Lipidnanoemulsionen einer Größenabhängigkeit unterliegt und kleinere Partikel schneller und zum erhöhten Ausmaß enzymatisch verdaut werden [139–141]. Aufgrund dessen sollten die SLN-Formulierungen eine enge Größenverteilung sowie einen durchschnittlichen Größenbereich von 100-200 nm aufweisen.

Die zu verarbeitenden Lipide werden bei der temperierten Hochdruckhomogenisation mindestens 10 °C über die jeweilige Schmelztemperatur erhitzt [142]. Die lipophile Phase wird mit der emulgatorhaltigen wässrigen Phase nach einer Voremulgierung in einen beheizten Hochdruckhomogenisator gegeben und zu einer Öl-in-Wasseremulsion im Nanometerbereich verarbeitet. Durch Kühlen unter die Kristallisationstemperatur erhärten die Öltröpfchen zu festen Lipiden. Durch den Kristallisationsprozess und die Entstehung neuer Flächen, die durch den Emulgator abgesättigt werden müssen, können bei polymorphen Stoffen Modifikationswechsel zu thermodynamisch stabileren Modifikationen stattfinden [143]. Die Untersuchungen der geeigneten Herstellungsparameter für die CP-SLN wurden im diskontinuierlichen Modus durchgeführt, da dieser schneller zu einer kleineren Partikelgröße führt [138]. Hierbei wurde der Einfluss des angewendeten Druckes, der Zyklenzahl sowie der Probenmenge auf die resultierende Partikelgröße untersucht.

Die Größencharakterisierung wurde mithilfe der PCS und der LD durchgeführt. Um die fehlende Detektion größerer Partikel (>6 µm) mit der PCS auszugleichen [144], wird zur simultanen Anwendung beider Geräte geraten [136].

Tab. 8 Größenverteilung mit der LD der CP-SLN in Abhängigkeit des angewendeten Druckes beim Herstellungsprozess mit dem EmulsiFlex-C5.

Druck	D10 in µm	D50 in µm	D90 in µm
50 bar	0,192	0,413	1,426
250 bar	0,169	0,265	0,491
500 bar	0,150	0,211	0,334
750 bar	0,159	0,236	0,457
1000 bar	0,153	0,225	0,518
1500 bar	0,152	0,224	1,234

In Tab. 8 sind die Ergebnisse der LD in Abhängigkeit des angewendeten Druckes bei der Hochdruckhomogenisation dargestellt. Die erforderliche enge Größenverteilung wird bei 500-750 bar erreicht. Die Verringerung oder Erhöhung des angewendeten Druckes resultiert in der Verbreiterung der Größenverteilung.

In der Darstellung der Partikelgrößenverteilung in Abhängigkeit von der erreichten Zyklenzahl wird ersichtlich, dass nach der Anwendung von 5 Zyklen die beste Verteilung erreicht wird (Abb. 12a). Mit steigender Zyklenzahl kommt es erneut zur Verbreiterung der Größen-

verteilung. Der Anstieg der Partikelgröße aufgrund steigender Zyklenzahlen oder des angewendeten Druckes wird auf ein gleichzeitiges Stattfinden von Zerkleinerung und Koaleszenz der dispersen Phase zurückgeführt [137]. Der Einfluss der Ansatzmenge der Formulierung, welche mit der PCS gemessen wurde, zeigt die Erhöhung des PDI ab 120 g (Abb. 12b). Ab diesem Wert tritt eine Verbreiterung der Partikelgrößenverteilung bei gleichbleibendem Z-Average auf. Aufgrund dieser Ergebnisse wurden die CP-SLN gleichbleibend mit 500 bar und 5 Zyklen mit einer maximalen Ansatzmenge von 100 g hergestellt. Diese Herstellungswerte wurden entsprechend der Voruntersuchungen für alle herzustellenden SLN-Proben übernommen. Übereinstimmende Herstellungsparameter werden auch in der Literatur angegeben, um vergleichbare CP-SLN unter 200 nm mit ähnlichen PDI zu erhalten [145].

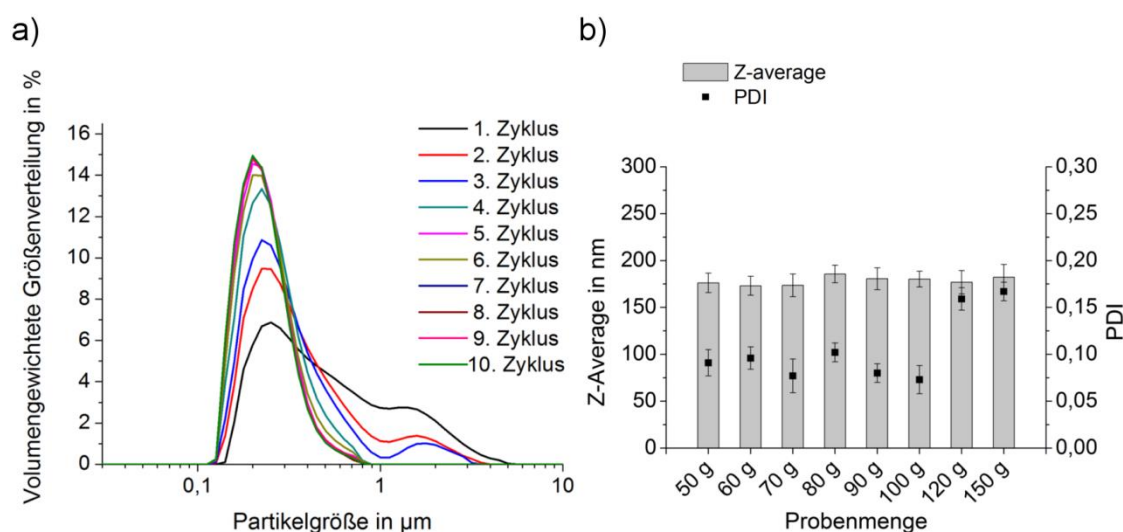


Abb. 12 Untersuchung der Herstellungsparameter des Hochdruckhomogenisationsprozesses mit dem EmulsiFlex-C5. a) Größenverteilung mit der LD der CP-SLN je nach Anzahl der angewendeten Zyklen. b) Einfluss der Menge des Probenansatzes auf den Z-Average und den PDI, gemessen mit der PCS.

4.1.2 Transmissionselektronenmikroskopie

Mittels TEM-Untersuchungen wurde die Form der CP-SLN in Abhängigkeit des verwendeten Emulgators untersucht (Abb. 13). Lipide kristallisieren bevorzugt in einer plättchenförmigen Struktur der beta-Modifikation [136, 146]. Durch die Präparationsweise der Proben für die TEM-Aufnahmen (das Entfernen der Flüssigkeit auf den *Grids*) kann ein Orientierungseffekt auftreten [146]. Die Partikel bleiben mit der größten Fläche sichtbar liegen und erschweren die Unterscheidung zwischen runden Partikeln und Plättchen [146]. Unabhängig von dem Orientierungseffekt konnten bei der Untersuchung Partikel gefunden werden, die sowohl auf der breiteren als auch auf der schmalen Seite verblieben sind. Die Plättchenform konnte für beide Lipidformulierungen bestätigt werden, wobei der verwendete Emulgator keinen Einfluss auf die Form der Partikel zeigt.

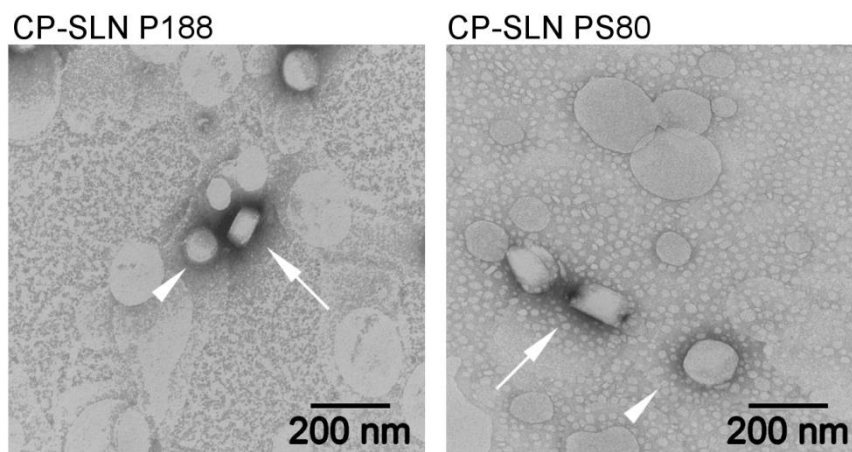


Abb. 13 Elektronenmikroskopische Aufnahmen von CP-SLN, stabilisiert mit P188 (links) und PS80 (rechts), zeigen auf der breiteren Seite liegende (Pfeilkopf) und auf der schmalen Seite stehende (Pfeil) Partikel.

4.1.3 Partikelgrößenanalytik

Im Hinblick auf die Verdaustudien muss die Vergleichbarkeit der SLN-Formulierungen hinsichtlich der Größe bzw. Größenverteilung, des ZP, des thermischen Verhaltens und des optischen Erscheinungsbildes gegeben sein. Um den Einfluss der pankreatischen Lipase auf den Abbauprozess von CP zu bestimmen, wurden SLN mit P188 und dem Lipasehemmer Orlistat (CP-SLN P188+O) hergestellt.

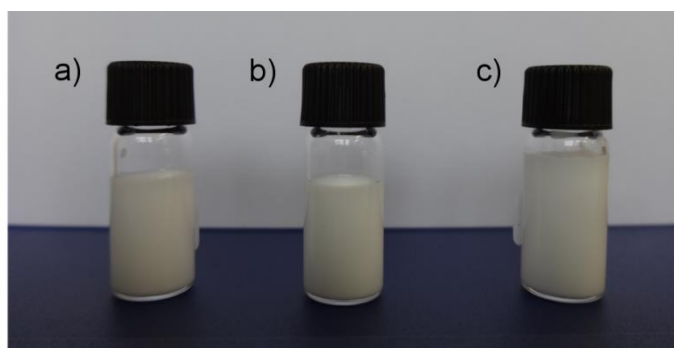
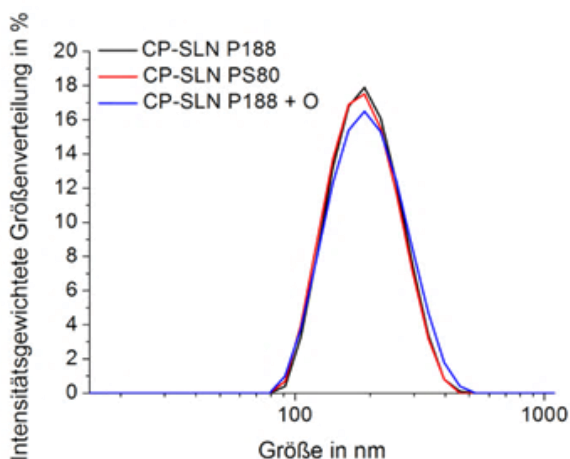


Abb. 14 Fotografische Aufnahmen der Vials mit den Proben. a) CP-SLN P188 b) CP-SLN P188+O c) CP-SLN PS80.

Die in Abb. 14 dargestellten Suspensionen CP-SLN P188, CP-SLN P188+O und CP-SLN PS80 haben eine dünnflüssige Konsistenz und sind nicht durchscheinend. Das Erscheinungsbild ist vergleichbar mit der Beschreibung anderer CP-SLN Formulierungen mit identischem Lipidgehalt [70]. Die Proben können optisch nicht voneinander unterschieden werden.

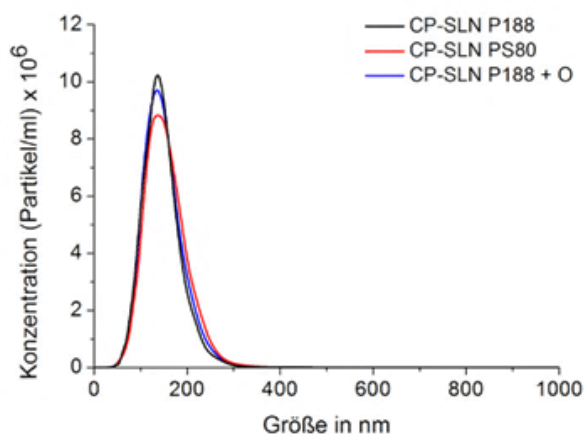
Die Größencharakterisierung im Nanometerbereich ist komplex, da die Messprinzipien der Methoden (wie z.B. PCS) durch die Berechnungsgrundlagen auf der Annahme der sphärischen Form der Partikel beruhen. Infolge dessen sind Ungenauigkeiten bei unregelmäßig geformten Partikeln, wie bei den vorliegenden SLN-Suspensionen, möglich [136].

a)



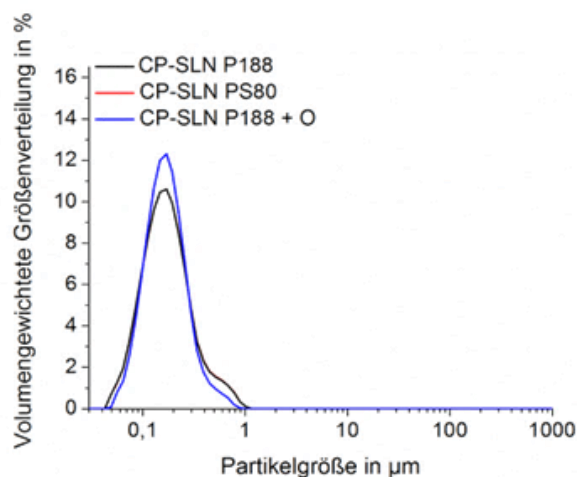
Probe	Z-Average in nm	PDI
CP-SLN P188	181,9	0,071
CP-SLN PS80	179,0	0,099
CP-SLN P188 + O	188,8	0,094

b)



Probe	Mittelwert in nm	Modus in nm
CP-SLN P188	145,4	136,3
CP-SLN PS80	148,3	136,4
CP-SLN P188 + O	148,6	129,6

c)



Probe	D10 in nm	D50 in nm	D90 in nm
CP-SLN P188	87	165	351
CP-SLN PS80	86	165	352
CP-SLN P188 + O	93	164	299

Abb. 15 Partikelgrößencharakterisierung, Messungen der Proben CP-SLN P188, CP-SLN PS80 und CP-SLN P188+O mit a) PCS, b) NTA und c) LD.

Zur Beschreibung der Partikelgröße wurden mehrere Messmethoden verwendet. Die PCS ist als Standardmethode für die Messung im Nanometerbereich etabliert, wobei neben der Größenverteilung auch der intensitätsgewichtete Z-Average und der PDI zur Bewertung der Pro-

ben herangezogen werden. Aufgrund des eingeschränkten Messbereiches der PCS (<6 µm) wurde zusätzlich die LD verwendet (Abb. 15a und c). Die Messungen mittels LD zeigen als volumengewichtete Verteilung einen D50 von 164-165 nm an und es wurden keine Partikel oberhalb von 1 µm erfasst. Die vermessenen Proben ergaben ein einheitliches Probenbild mit vergleichbaren Größenverteilungen. Der Z-Average der PCS Messungen liegt mit 180-190 nm geringfügig über den gemessenen D50 Werten der LD. Die Differenzen liegen an der unterschiedlichen Mess- und Berechnungsweise der Geräte und können durch die Intensitätswichtung, bei der größere Partikel stärker betont werden (bei Faktor 10 gilt eine um den Faktor 10^6 stärkere Betonung), und der Angabe des hydrodynamischen Partikeldurchmessers bei der PCS begründet werden. Die Partikel besitzen enge Größenverteilungen, welche ebenfalls keine Partikel >1 µm zeigen und mit PDI Werten unter 0,1 für die Homogenität der Proben sprechen [147]. Ergänzend wurden die Proben mittels NTA betrachtet. Diese Technik beruht auf der Darstellung einzelner NP im Probenfeld und auf deren 2D-Messung der Brownschen Molekularbewegung. Durch die Anwendung der Stokes-Einstein-Gleichung wird im Gegensatz zur PCS für jedes Partikel separat der hydrodynamische Durchmesser berechnet [148]. Ein Nachteil der PCS liegt in der schlechten Peakauflösung bei engen bi- oder mehrmodaligen Verteilungen [148]. Die NTA ermöglicht hingegen die akkurate Peakauflösung diverser Größenpopulationen [148]. Durch die Visualisierung der Proben ergänzt die NTA somit die Messungen der PCS.

Die Vergleichbarkeit und die Monomodalität der Proben werden durch die Messungen mittels NTA bestätigt. Die gemessenen Mittelwerte und Modi sind kleiner als die Z-Averages, welches durch die anzahlgewichtete Messweise sowie die Messung von einer geringen Anzahl an Partikeln (40-60 pro Messung) erklärt werden kann (Abb. 15b). Legt man anstatt der intensitätsgewichteten die anzahlgewichtete Messung des Zetasizers zugrunde, zeigt sich, dass über 95 % der Partikel eine Größe unter 295 nm besitzen. Hierbei wird deutlich, dass die Wahrscheinlichkeit der Erfassung sehr großer Partikel mit der NTA bei den wenigen gemessenen Partikeln gering ist und resultierend leichte Unterschiede zwischen dem Mittelwert der NTA und dem Z-Average der PCS auftreten können. Filipe *et al.* haben beide Messmethoden verglichen und ebenso gezeigt, dass der Mittelwert der NTA kleiner als der Z-Average sein kann [148]. Die Differenz der Mittelwerte und der Z-Averages liegt zumeist zwischen 20-40 nm [148, 149].

Die Ergebnisse der unabhängigen Messmethoden zeigen die Vergleichbarkeit und enge Größenverteilung der Proben untereinander. Es wurden keine Partikel im Mikrometerbereich detektiert. Der Zusatz von Orlistat beim Herstellungsprozess von den P188-stabilisierten Partikeln hat keinen Einfluss auf die resultierende Größe der Partikel.

Neben den SLN können auch weitere kolloidale Strukturen in den Proben vorhanden sein [136]. Diese sind durch den Emulgator bedingt, der als Monomer an der Lipidoberfläche zur

Stabilisierung und als Mizellen auftreten kann [136]. Die Mizellen sind in den meisten Fällen kleiner als die NP [4]. Wegen der geringeren Größen sind diese Strukturen nur schwer zu detektieren, da die Lichtintensität des an den größeren Partikeln gebeugten Lichtes überwiegt [4]. Bei der NTA-Methode ist die Detektion dieser Strukturen zusätzlich durch den Messbereich (ab 10-20 nm) sowie aufgrund der starken Probenverdünnung erschwert.

4.1.4 Zetapotential

Mit der Messung des ZP wird die Oberflächenladung der NP betrachtet. Ein ausreichend hohes Potential erhöht die Stabilität von elektrostatisch stabilisierten Nanosuspensionen, welche durch eine erhöhte Partikelabstoßung erreicht wird [67]. Bei NP-Formulierungen, die sterische Stabilisatoren enthalten, kann diese Betrachtung nicht angewendet werden [136]. Hier steht die sterische Stabilisierung von Suspensionen im Vordergrund und das gemessene ZP wird zum Informationserhalt über die bestehende Oberflächenladung herangezogen. Die CP-SLN Formulierungen zeigen ein negatives ZP (Tab. 9). Die Einarbeitung von Orlistat hat nur einen geringen Einfluss auf das resultierende ZP. Lipidformulierungen mit nichtionogenen Emulgatoren besitzen theoretisch keine Ladungen, können aber aufgrund von freien Fettsäuren oder produktions- bzw. lagerungsbedingten Verunreinigungen mit negativer Ladung ein negatives Potential aufweisen [140].

Tab. 9 Erhaltene Messwerte des ZP der Proben.

Probe	ZP in mV
CP-SLN P188	-12,7 ± 0,2
CP-SLN PS80	-10,7 ± 0,3
CP-SLN P188+O	-17,6 ± 0,7

4.1.5 Dynamische Differenzkalorimetrie

Mit der DCS wurde das Schmelzverhalten des CP-Bulks sowie der SLN-Formulierungen CP-SLN P188, CP-SLN PS80, CP-SLN P188+O und des Orlistats in jeweils zwei Aufheizzyklen überprüft.

Das Schmelzverhalten des CP-Bulks bei der ersten Aufheizkurve ist gekennzeichnet durch einen Schmelzpunkt von 52,7 °C (Abb. 16a unten, Tab. 10). Im zweiten Heizvorgang tritt ein weiterer Schmelzpunkt von 40,1 °C auf, welcher durch die auftretende Polymorphie des CP hervorgerufen werden kann [150, 151], welche bei Lipiden üblich ist [152].

Tab. 10 Schmelz- und Kristallisationspunkte der SLN-Proben, welche mittels DSC ermittelt wurden.

Probe	Schmelzpunkt in °C	Kristallisationspunkt in °C	Schmelzpunkt in °C
	1. Aufheizkurve	Abkühlkurve	2. Aufheizkurve
Bulk	52,7	43,3	40,1; 51,2
Orlistat	45,6	-	-
CP-SLN P188	49,3	18,9	49,4
CP-SLN PS80	48,5	18,4	48,4
CP-SLN	49,0	19,3	49,0

Der Schmelzpunkt der CP-SLN P188 liegt bei 49,3 °C und im Vergleich zum Bulk tritt eine Schmelzpunktdepression auf (Abb. 16a oben). Westesen *et al.* berichten bei SLN Formulierungen von geringeren Schmelzenthalpien und 2-3 °C niedrigeren Schmelzpunkten als der Bulk [153]. Diese konnten bei den vorliegenden Partikeln sowie auch bei weiteren CP-SLN in der Literatur bestätigt werden [145, 150, 151]. Die Verringerung der Schmelzenthalpie, des Schmelzpunktes und der Onset-Temperatur ist auf die Größe im Nanometerbereich, die verbundene hohe spezifische Oberfläche und auf die Anwesenheit von Emulgatoren zurückzuführen [154]. Die Lipid-NP weisen eine geringere Gitterordnung als der Bulk auf, welche für die Überwindung der Gitterkräfte einen geringeren Wärmeeintrag benötigen [150].

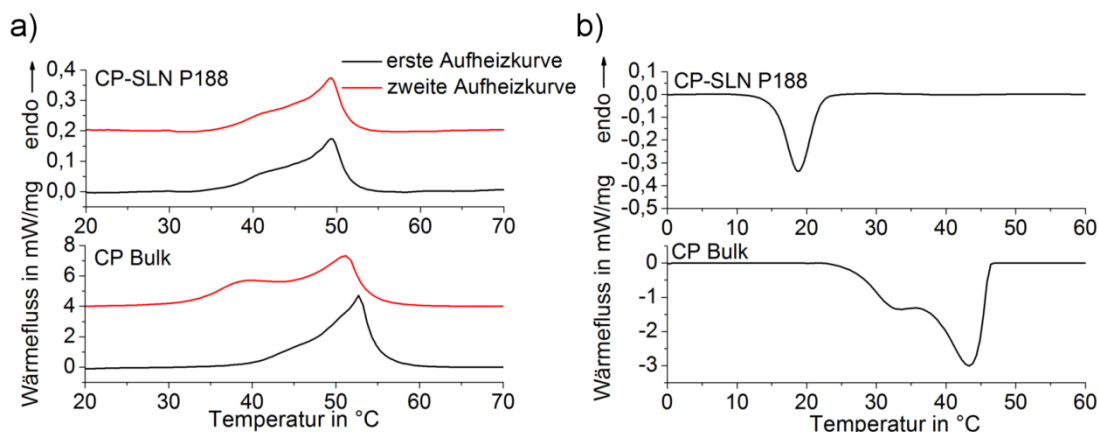


Abb. 16 a) DCS Kurven der ersten und zweiten Aufheizkurve des CP Bulks und CP-SLN P188. Die oberen Thermogramme sind zur besseren Visualisierung entlang der Y-Achse verschoben. b) Abkühlkurve vom CP-Bulk im Vergleich zu CP-SLN P188.

Bei dem Vergleich der Abkühlkurven des Bulks und der CP-SLN P188 wird ein verzögerter Kristallisationspeak ersichtlich, der bei 18,9 °C statt bei 43,3 °C auftritt (Abb. 16b). Bei NP-Suspensionen, die mittels temperierter Hochdruckhomogenisation hergestellt worden sind, kann das Phänomen der unterkühlten Schmelze eintreten. Hierbei liegt nach der Herstellung die Lipidphase nicht im festen sondern weiterhin im flüssigen Zustand, entsprechend einer Nanoemulsion, vor. Bei unterkühlten Schmelzen kann der Temperaturunterschied des Kristallisationspunktes zwischen dem Bulk und der kolloidalen Dispersion über 20 °C betragen

[153]. Auch Jennings *et al.* berichteten bei CP-SLN von der hohen Tendenz zur Ausbildung von unterkühlten Schmelzen [155]. Falls die Kristallisation nicht durch Kühlen nach der Herstellung forciert wird, kann die Lipiddispersion im Stadium der unterkühlten Schmelze über längere Zeit bestehen bleiben [153]. Die geringe thermodynamische Stabilität des Zustandes führt zu Lagerungsproblemen [153]. Das Phänomen ist durch die benötigte Anzahl an Kristallisationskeimen erklärbar, die bedingt durch die kleine Partikelgröße sehr gering ist [136]. Je kleiner die lipophile disperse Phase ist, desto wahrscheinlicher und ausgeprägter ist dieser Effekt [136]. Bei dem Bulk hingegen ist durch die durchgehende Phase eine fortführende Kristallisation gegeben [4]. Die eintretende Kristallisation bei nanodispersen Lipidformulierungen muss aufgrund dessen z. B. durch geringe Temperaturen erzwungen werden [4].

Durch die DSC-Analyse wurde nachgewiesen, dass die vorliegenden CP-SLN Formulierungen zur Ausbildung unterkühlter Schmelzen neigen. Bei dem Vergleich der ersten und zweiten Aufheizkurve ist der gleichbleibende Verlauf und Energieeintrag der Kurven erkennbar. Die Enthalpie für beide Aufheizkurven sowie die Abkühlkurve liegen im Mittelwert bei 1,303 J/g ($\pm 0,057$ J/g). Aufgrund dessen kann von einer vollständigen Kristallisation der Proben nach der Herstellung ausgegangen werden. Die Bestätigung des festen Zustandes der Partikel ist zusätzlich durch die TEM-Aufnahmen erfolgt (Kapitel 4.1.2).

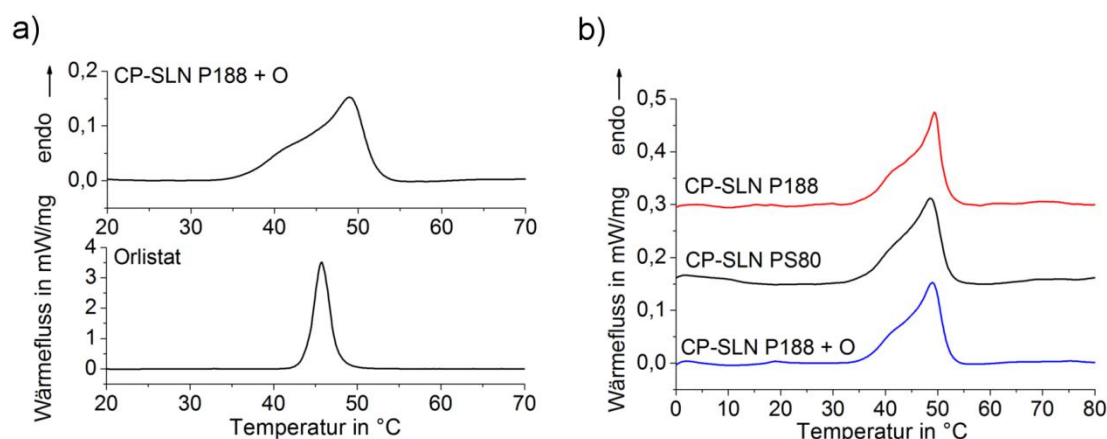


Abb. 17 a) DSC Kurven der Formulierung CP-P188+O im Vergleich zum Orlistat. b) Vergleich der ersten Aufheizkurve der Formulierungen CP-SLN P188; CP-SLN P188+O und CP-SLN PS80. Die oberen Thermogramme sind zur besseren Visualisierung entlang der Y-Achse verschoben.

Im Folgenden wurde das Schmelzverhalten der Formulierung CP-SLN P188+O im Vergleich zum Orlistat untersucht (Abb. 17a). Orlistat weist einen Schmelzpunkt von 45,6 °C auf. Die gemeinsame Verarbeitung der CP-SLN mit Orlistat zeigt keine Auswirkung auf das Schmelzverhalten der Probe CP-SLN P188+O. Der Schmelzpeak des Orlistats ist aufgrund des geringen verwendeten Anteils von 0,5 % (bezogen auf die Lipidmenge) von dem Schmelzpeak des CP überlagert.

Die verschiedenen SLN-Formulierungen weisen einen vergleichbaren Verlauf in der Aufheizkurve (Abb. 17b) sowie nahe beieinanderliegende Schmelz- und Kristallisationspunkte auf

(Tab. 10). Die Anwendung der Emulgatoren PS80 und P188 hat schlussfolgernd keine Auswirkungen auf das Schmelzverhalten der Formulierungen. Durch die Übereinstimmung der Ergebnisse der Proben kann in den nachfolgenden Studien von einem vergleichbaren thermischen Verhalten ausgegangen werden.

4.1.6 Stabilitätsmessungen

Für die folgenden Untersuchungen des Verdaus der Partikel muss die Probe eine ausreichende Stabilität und eine enge Größenverteilung aufweisen, um Kristallwachstum durch die Ostwaldreifung zu vermeiden [136]. Die Stabilitätsuntersuchungen wurden ausführlich für die Probe CP-SLN P188 durchgeführt, um die unterschiedlichen Stabilitätsbedingungen zu vergleichen (Abb. 18). Als Lagerbedingungen wurden die Kühlschrank-Lagerung (4-8 °C) sowie die Lagerung bei Raumtemperatur und bei 37 °C ausgewählt. Die Stabilitätsstudien erfolgten jeweils unter Lichtausschluss.

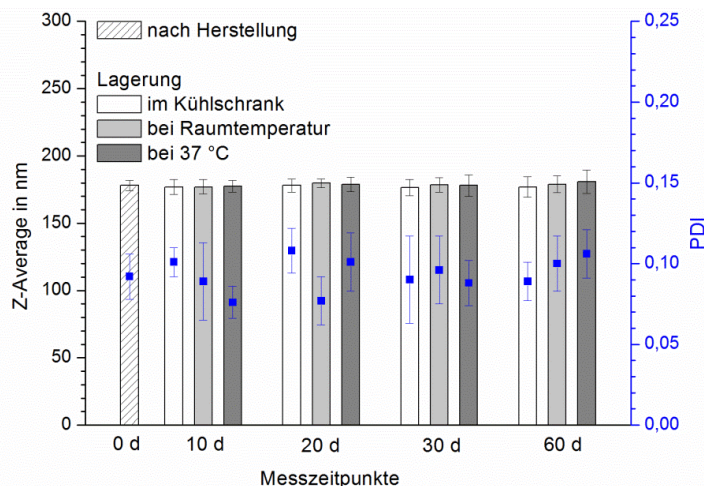


Abb. 18 Stabilität der Formulierung CP-SLN P188 über 2 Monate.

Über den untersuchten Zeitraum von zwei Monaten traten bei den vermessenen Suspensionen bei Kühlschranklagerung nur geringe messbedingte Schwankungen auf. Bei dem Vergleich der verschiedenen Bedingungen zeigten sich auch bei Lagerung bei Raumtemperatur und 37 °C keine relevanten Änderungen der Partikelgröße oder des PDI. Die Suspensionen weisen bei allen Lagerbedingungen eine ausreichende Stabilität auf.

Die Proben wurden im Kühlschrank gelagert und zeitnah für fortführende Experimente verwendet. Zur routinemäßigen Kontrolle wurde die Stabilität anhand von PCS Messungen für alle Proben in regelmäßigen Abständen über 2 Monate überprüft (Tab. 11). Es konnten keine nennenswerten Veränderungen über den gemessenen Zeitraum zu den Ausgangswerten in Abb. 15 festgestellt werden. Zur längerfristigen Aufbewahrung von SLN wird empfohlen, diese zu lyophilisieren [156, 157].

Tab. 11 Größenmessung mit PCS der CP-SLN Formulierungen über 2 Monate bei der Lagerung im Kühlschrank.

Probe	Z-Average in nm	PDI
CP-SLN P188	182,8	0,092
CP-SLN PS80	178,7	0,070
CP-SLN P188+O	183,3	0,083

4.1.7 Einfluss der verwendeten Emulgatoren Poloxamer 188 und Polysorbat 80 auf den Verdau von Cetylpalmitatnanopartikeln

Der Pankreatinverdautest wurde in den Medien FaSSIF und FeSSIF durchgeführt. Bei der pH-stat Methode entspricht das verbrauchte Volumen an NaOH-Maßlösung (0,1 mol/l) einem Äquivalent entstehender freier Fettsäuren. Das Volumen wurde zur Berechnung der enzymatisch gespalteten Menge, bezogen auf den Einsatz des CP unter der Annahme der Spaltung in je ein Molekül Cetylalkohol und Palmitinsäure, herangezogen.

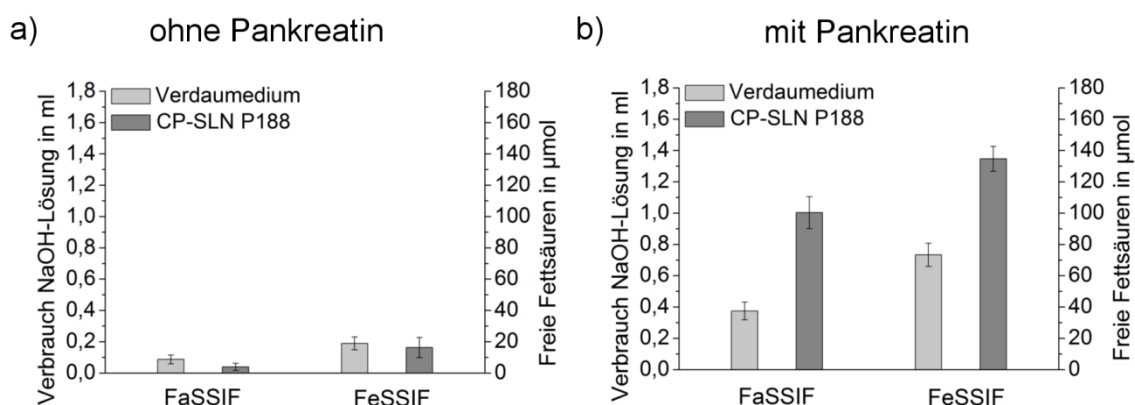


Abb. 19 a) Nicht enzymatische Hydrolyse ohne Pankreatinzugabe und b) Verdau mit Pankreatinzugabe der Medien und der CP-SLN P188 nach 120 min, bestimmt mit der pH-stat Methode.

Im Vorfeld der Verdauversuche wurde die nicht enzymatische Hydrolyse der Medien und der Formulierung CP-SLN P188 in Abhängigkeit des Pankreatineinsatzes bestimmt (Abb. 19). Die Medien ohne Pankreatinzugabe selbst unterliegen über den Zeitraum von zwei Stunden geringen pH-Wertveränderungen (Abb. 19a). Die Formulierung CP-SLN P188 und die Medien ohne Pankreatineinsatz weisen einen Verbrauch an NaOH-Maßlösung in vergleichbarer Menge auf. Für die CP-SLN P188 wurde kein erhöhter Verbrauch an Maßlösung detektiert. Dieses zeigt, dass die Lipidformulierung keiner zusätzlichen nicht enzymatischen Hydrolyse in den Medien unterliegt.

Mit der Zugabe von Pankreatin wurde der enzymatische Verdau der Medien bestimmt (Abb. 19b). Hierbei wird deutlich, dass die Medien einen enzymatischen Abbau durch das Pankreatingemisch aufweisen. Die im Enzymgemisch enthaltenen PLA2, CEH und PLRP2 können zum Abbau der Phospholipide und der Gallensalze beitragen [14]. Die entstandenen freien Säuren wurden als Blindwert gekennzeichnet und werden bei den Verdaustudien

berücksichtigt. Die Formulierung CP-SLN P188 zeigt im Vergleich erhöhte Werte (Verdau der Formulierung).

Der zeitliche Verlauf des Verdau (mit Pankreatin) der Formulierungen CP-SLN P188 und CP-SLN PS80 mit der pH-stat Methode über 120 min ist in Abb. 20a und b dargestellt. Der Vergleich der Verdaukurven zeigt, dass beide Formulierungen einem enzymatischen Verdau unterliegen und Unterschiede zum Blindwert aufweisen. Bei dem Verbrauch der Maßlösung sind für die Formulierung CP-SLN PS80 höhere Werte detektiert worden. Die Differenz ist im FaSSIF geringer als im FeSSIF. Ein deutlicher Anstieg der verbrauchten NaOH-Maßlösung ist bei den Blindwerten sowie bei den Formulierungen in den ersten 10-30 min zu erkennen. Anschließend findet ein langsamer Anstieg bzw. eine Stagnation des Verdau statt.

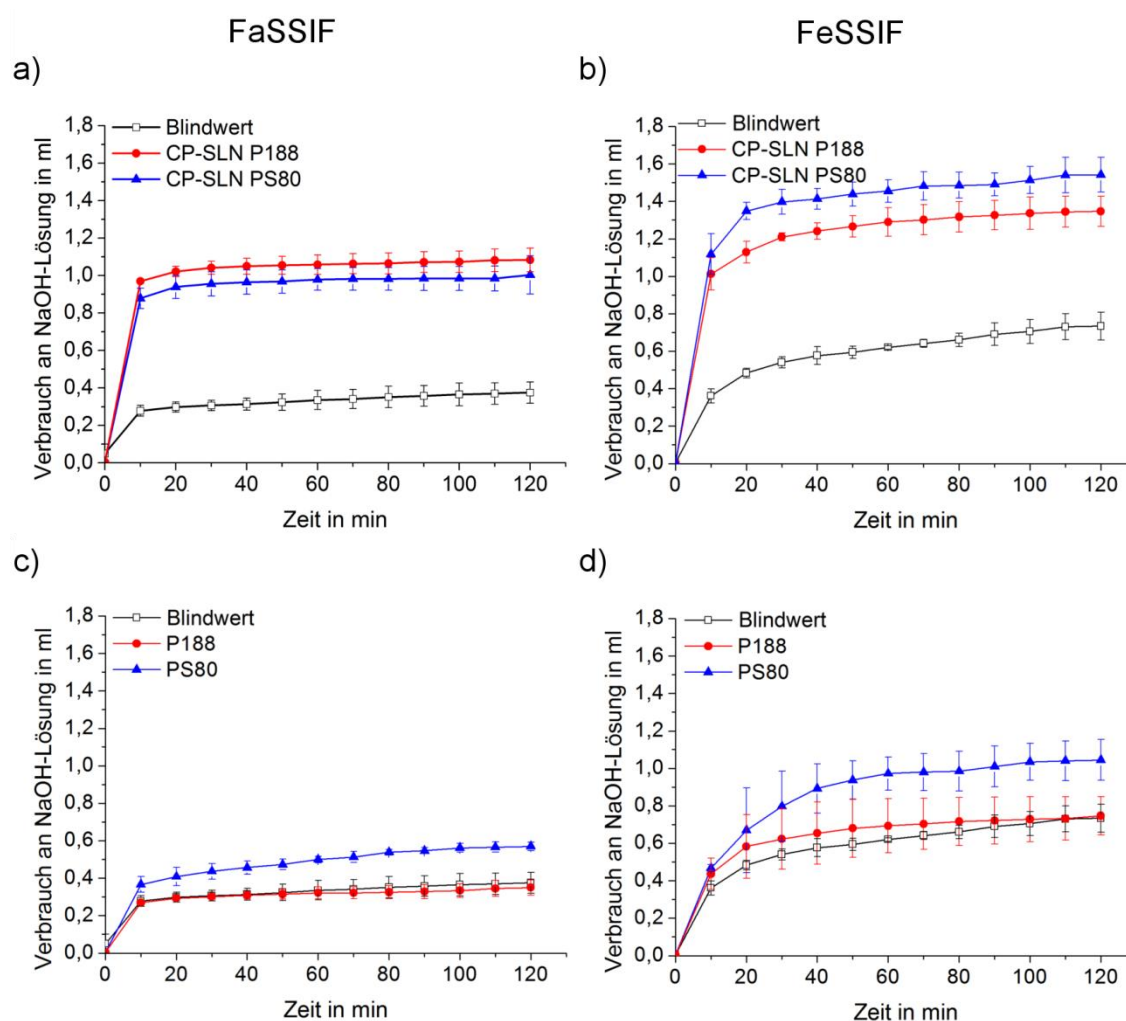


Abb. 20 Zeitlicher Verlauf des Verbrauchs an NaOH-Maßlösung mit der pH-stat Methode von den Formulierungen CP-SLN P188 und CP-SLN PS80 (a und b) sowie von den Emulgatoren P188 und PS80 (c und d) im FaSSIF (a und c) und im FeSSIF (b und d) über 120 min.

Über die letzten Jahrzehnte ist der Einfluss der Emulgatoren auf den Verdau untersucht worden [44, 65, 158–160]. Hierbei wurde von mehreren Arbeitsgruppen ein enzymatischer Verdau von den Emulgatoren durch gastrointestinale Enzyme festgestellt [28, 49, 64, 132].

Die Verdaubarkeit der verwendeten Emulgatoren P188 und PS80 ist im Weiteren untersucht worden (Abb. 20c und d). Dazu wurde der jeweilige Emulgator zu gleicher Menge wie in der Probe vorhanden zu den Medien hinzugefügt. Für PS80 ist ein erhöhter Verbrauch der Maßlösung zu erkennen, welches den Abbau des Emulgators PS80 anzeigt. Aufgrund dessen setzt sich das Messergebnis für den enzymatischen Abbau von CP-SLN PS80 aus der Freisetzung der Fettsäuren des CP sowie der Ölsäure des Emulgators zusammen. Im Gegensatz dazu ist der Kurvenverlauf von P188 vergleichbar mit dem des Blindwertes, so dass bei CP-SLN P188 kein gesonderter Verbrauch der Maßlösung für den Emulgator betrachtet werden muss. Die Ergebnisse bestätigen die Beobachtungen von verdaubaren Estergruppen in Emulgatoren [65].

Der enzymatische Abbau dieser Emulgatoren könnte statt über die klassische Lipase/Colipase-Reaktion über das ebenfalls im Pankreasgemisch enthaltene Enzym CEH erfolgen [160]. Fernandez *et al.* konnten nur eine geringe Aktivität der Lipase für PEG-Ester nachweisen [28]. Die höchste Spezifität für PEG-Ester zeigte sich hingegen bei CEH [28], über welche der Abbau von PS80 demnach möglich ist.

4.1.8 Vergleich zwischen der HPTLC und der pH-stat Methode beim Verdautesst mit Cetylpalmitatnanopartikeln

Die HPTLC wurde als zusätzliche Methode zur Quantifizierung der freien Fettsäuren während des Verdaus aufgrund der Möglichkeit unzureichender Dissoziation der langkettigen Fettsäuren bei der pH-stat Methode ausgewählt.

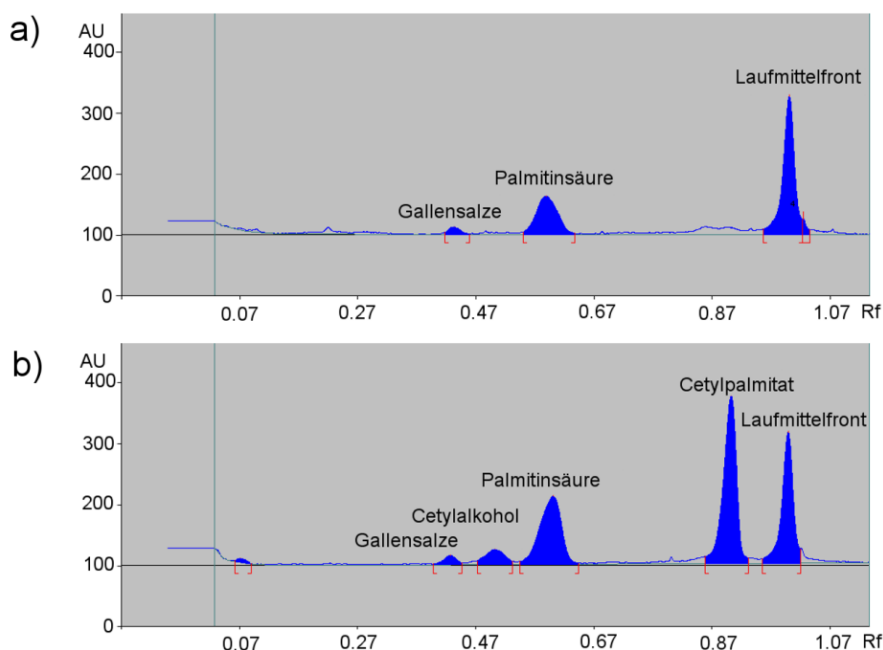


Abb. 21 Chromatogramm der HPTLC vom a) FaSSIF-Medium und b) CP-SLN P188 im FaSSIF nach 120 min.

Die Anwendung der HPTLC ist für biologische Lipidextrakte aufgrund der Robustheit die Methode der Wahl [134]. Diese wurde schon mehrfach für die Bestimmung des *in vitro* Verdau- tests eingesetzt [43, 131, 132], da die Auftrennung der einzelnen Lipidfraktionen dissozia- tions- bzw. pH-unabhängig erfolgt [45].

Repräsentative Chromatogramme vom FaSSIF-Medium (Blindwert) und der Formulierung CP-SLN P188 im FaSSIF zeigen die Auftrennung in die Fraktionen der Gallensalze, der freien Fettsäuren sowie der Fettalkohole und des CP (Abb. 21). Die Fraktionen wurden auf die im CP am häufigsten vorkommende Fettsäure Palmitinsäure und den Fettalkohol Cetyl- alkohol standardisiert. Im Gegensatz zu dem Medium sind bei der Probe die zusätzlichen Peaks der Fettalkohole, des CP sowie ein erhöhter Peak der Fettsäuren zu finden. Letztge- nannter wurde zur Analyse der Ergebnisse herangezogen.

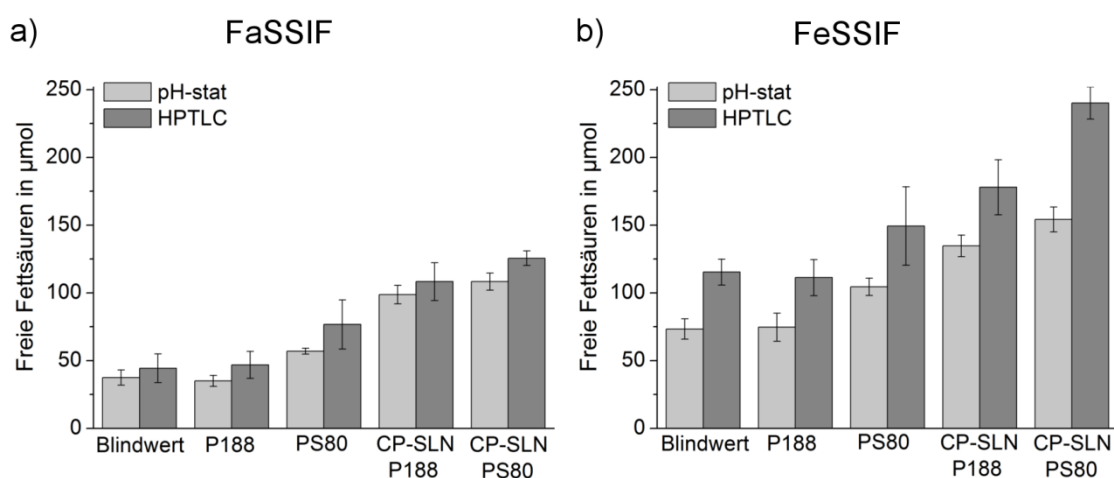


Abb. 22 Ergebnisse der HPTLC und pH-stat Messungen hinsichtlich freier Fettsäuren im a) FaSSIF und b) FeSSIF nach 120 min.

Der Vergleich der Ergebnisse der pH-stat Methode und der HPTLC-Methode nach 120 min ist in Abb. 22 dargestellt. Die Werte der HPTLC Methode von den Blindwerten und den Proben sind im FaSSIF geringfügig höher als die mit der pH-stat Methode detektierten freien Säuren. Im FeSSIF ist diese Differenz ausgeprägter, was bei der Titration für eine unzu- reichende Detektion der Fettsäuren, welche durch das Gallensalz/Lecithin-Gemisch in den Medien vorhanden sind, spricht. Durch die Beachtung der jeweiligen Blindwerte werden die Unterschiede jedoch nivelliert und eine Bewertung der Differenzen zwischen den Proben kann vorgenommen werden. Diese zeigt denselben Trendverlauf der Ergebnisse beider Me- thoden. Die Bestimmung der Formulierungen CP-SLN P188 und CP-SLN PS80 resultiert in höheren Werten als die jeweiligen Blindwerte im FaSSIF und FeSSIF. Der enzymatische Verdau des Emulgators PS80 wird durch die HPTLC Untersuchung ebenfalls bestätigt, wo- hingegen bei P188 vergleichbare Werte wie bei den Blindwerten aufgenommen worden sind. Zum Vergleich der Methoden wurde die Titrationseffizienz bestimmt (Gleichung (5)). Unter Berücksichtigung des jeweiligen Blindwertes wurden in der Berechnung diese von den dazu- gehörigen Ergebnissen der Formulierungen subtrahiert.

$$\text{Titrationseffizienz [\%]} = \frac{\text{Fettsäuren (pH-stat Methode) [\mu\text{mol}]}}{\text{Fettsäuren (HPTLC) [\mu\text{mol}]}} \times 100 \% \quad (5)$$

Bezugnehmend auf den Verdau des Emulgators PS80 wurde bei der Probe CP-SLN PS80 zwischen dem Gesamtverdau der Formulierung sowie dem separaten Abbau des Emulgators PS80 unterschieden. Zur Bestimmung des enzymatischen Abbaus der CP-SLN wurden die Messergebnisse von PS80 von dem Gesamtverdau subtrahiert (Tab. 12).

Die bei PS80 freigesetzte Ölsäure wurde bei der Titration zu einem Anteil von 60,4 % im FaSSIF und bei 91,8 % im FeSSIF erfasst. Die unvollständige Detektion kann auf eine unzureichende Dissoziation der Ölsäure zurückgeführt werden. Die Erfassung des Gesamtverdau der Probe CP-SLN PS80 war ebenfalls unvollständig. Für die ermittelten Werte der CP-SLN ergibt sich eine gute Titrationseffizienz im FaSSIF. Im FeSSIF werden im Gegensatz nur 54,7 % der mit der HPTLC detektierten Fettsäuren auch mit der Titration erfasst.

Tab. 12 Titrationseffizienz der pH-stat Methode zur HPTLC von CP-SLN PS80 und CP-SLN P188. Errechnet aus den jeweiligen Mittelwerten von drei Messversuchen.

	CP-SLN PS80			CP-SLN P188
	Gesamtverdau	Teilverdau PS80	Teilverdau CP-SLN	
FaSSIF	87,3 %	60,4 %	105,0 %	95,8 %
FeSSIF	64,8 %	91,8 %	54,7 %	97,8 %

Bei den P188-stabilisierten Partikeln ergibt sich hingegen eine sehr gute Titrationseffizienz von 95,8 % (FaSSIF) und 97,8 % (FeSSIF). Bei dieser Formulierung zeigt sich die Unabhängigkeit der Detektion der freien Fettsäuren von der Gallensalz/Phospholipid-Konzentration in den Medien. Resultierend ist die pH-stat Methode geeignet, um quantitative Aussagen zu dem Verdau der Formulierung CP-SLN P188 treffen zu können.

In Abhängigkeit der verwendeten Lipide und Hilfsstoffe zeigt die pH-stat Methode aber unzureichende Ergebnisse. Diese Methode lag ebenso bei den von Sek *et al.* untersuchten Formulierungen mit der Bestimmungseffizienz hinter der HPTLC zurück. Im Besonderen traf dies für Formulierungen mit langkettigen Lipiden zu [45].

Die Diskrepanz zwischen der Titration und weiteren Methoden konnte von Helbig *et al.* bestätigt werden. Hierbei wurde die Lipolyse von Molkeproteinisolat- oder Gummi arabicum-stabilisierten Trioleinemulsionen mit der pH-stat Methode und der GC untersucht. Abhängig von den verwendeten Emulgatoren wurden abweichende Messergebnisse mit der GC und der pH-stat Methode detektiert. Für die mit Molkeproteinisolat-stabilisierte Emulsion wurden 2- bis 3-fach höhere Werte für freie Fettsäuren mit der GC als mit der Titration erhalten, wohingegen ein wesentlich besserer Korrelationsfaktor für die mit Gummi arabicum-stabilisierte

Emulsion gefunden wurde (Korrelationsfaktor: 0,9 (Gummi arabicum) zu 0,3 (Molkeproteinisolat)) [42].

Die Ergebnisse in der vorliegenden Studie zeigen übereinstimmend, dass die Bestimmungseffizienz der pH-stat Methode in Abhängigkeit der Verdaumedien sowie von den Hilfsstoffen mit langkettigen Fettsäuren unterschiedliche Ergebnisse zu Referenzmethoden (z.B. HPTLC, GC) aufweisen kann. Durch die Komplexität der verwendeten Verdaumedien sind die Aussagen nicht auf andere Formulierungssysteme (z.B. SLN mit gleichem Lipid, aber unterschiedlichem Emulgator) übertragbar. Es wurde gezeigt, dass bei der Anwendung der pH-stat Methode bei pH 6,8 die Erfassung von langkettigen Fettsäuren aufgrund eines höheren pK_S -Wertes (Tab. 1) unvollständig sein kann. Um die Aussagekraft eines untersuchten Systems mit der pH-stat Methode zu überprüfen, sollte diese daher mit einer zweiten dissoziationsunabhängigen Methode untersucht werden.

4.1.9 Auswirkung der Rücktitration im Anschluss an die pH-stat Methode beim Lipidverdau

Die Rücktitration wird zur Detektion nicht dissoziierter freier Fettsäuren mit der pH-stat Methode genutzt. Ziel der vorliegenden Untersuchung war es, diese mit den Ergebnissen der HPTLC im Hinblick auf unterschiedliche pH-Werte zu vergleichen. Hierzu wurde der pH-Wert nach der Messzeit von 120 min sofort auf die jeweiligen pH-Level angehoben. Zur Erfassung nicht enzymatischer Hydrolyseprozesse der Medien wurde für jeden pH-Wert ein separater Blindwert bestimmt und von den erhaltenen Messergebnissen subtrahiert.

Der Vergleich der Messergebnisse der pH-stat Methode und der HPTLC-Methode mit den erhaltenen Werten für die Rücktitration nach 120 min wurde für die pH-Werte im Bereich 7,5-10 durchgeführt (Abb. 23). Bei der Formulierung CP-SLN P188 konnte mit der HPTLC bestätigt werden, dass bei pH 6,8 die Detektion der freien Fettsäuren vergleichbar ist (Abb. 23a und b; Kapitel 4.1.8). Mit der Anwendung der Rücktitration und dem verbundenem pH-Anstieg finden formulierungsbedingte basenkatalysierte Hydrolyseprozesse statt. Die Menge an erfassten Säuren steigt mit zunehmendem pH-Wert bis 9,5 (FeSSIF) bzw. 10,0 (FaSSIF) an, so dass für die verschiedenen pH-Werte unterschiedliche Ergebnisse detektiert worden sind.

Bei CP-SLN PS80 ist die pH-stat Methode durch die mangelnde Detektion der Ölsäure bei dem Verdau von PS80 unzureichend und starke Unterschiede zwischen den Methoden zeigen sich im Besonderen im FeSSIF (Abb. 23c und d). Mit der Anwendung der Rücktitration ist der gleiche Trend wie bei CP-SLN P188 zu erkennen. Mit steigendem pH-Wert wird ein kontinuierlicher Anstieg an freien Säuren detektiert, wobei die Ergebnisse der HPTLC bei den pH-Werten 8,0 (FaSSIF) und 8,5 (FeSSIF) erreicht werden. Dies zeigt ebenfalls die Unzuverlässigkeit der Rücktitration.

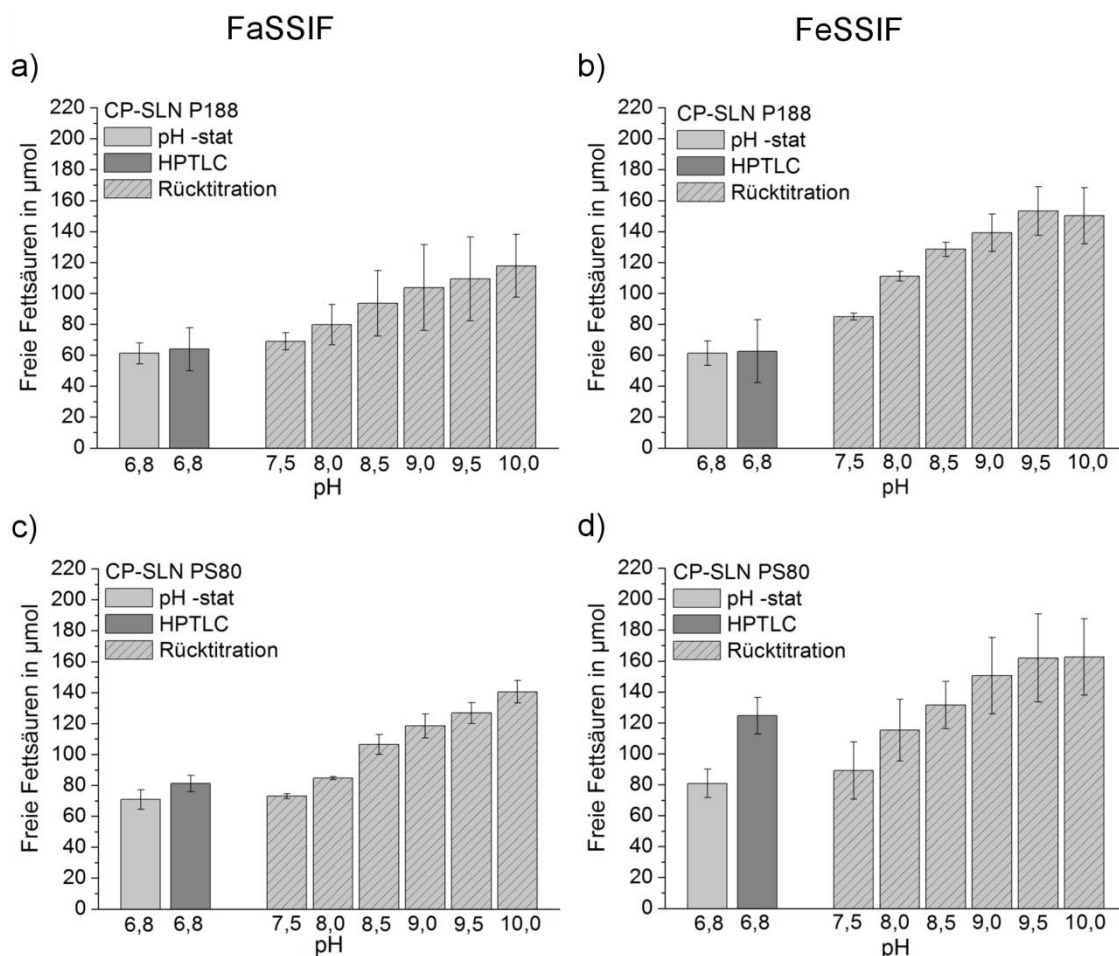


Abb. 23 Ergebnisse der pH-stat Methode nach 120 min mit anschließender Rücktitration im Vergleich zur HPTLC von den Formulierungen CP-SLN P188 (a und b) und CP-SLN PS80 (c und d) im FaSSIF (a und c) und im FeSSIF (b und d).

Die Erfassung nicht dissoziierter Fettsäuren kann sich mit basenkatalysierten Vorgängen der Formulierung überlagern und eine Fehlinterpretation der Ergebnisse wäre in Abhängigkeit des gewählten pH-Wertes für die Rücktitration die Folge. Eine vollständige Deprotonierung und Detektion aller freien Fettsäuren ist aufgrund der komplexen Medien und infolge der nicht einschätzbaren pK_S -Werte der langkettigen Fettsäuren bei einem bestimmten pH-Wert nicht vorzusetzen. Die Rücktitration ist aufgrund dieser Ergebnisse für die anschließende Erfassung der undissoziierten Fettsäuren bei der pH-stat Methode nicht geeignet.

4.1.10 Einfluss von Orlistat auf das Verdauungssystem und den Verdau von Cetyl-palmitatnanopartikeln

Orlistat (Tetrahydrolipstatin) ist ein selektiver Lipaseinhibitor für den Fettverdau. Es wird gegen Adipositas eingesetzt und besitzt antihypercholesterolemische Aktivität [161]. Orlistat bindet kovalent an die pankreatische Lipase [161], wobei die hohe Selektivität von Orlistat zu der Lipase durch die Konzentration zur Hemmung weiterer Enzyme, wie z. B. Esterasen, ersichtlich wird [162]. Diese liegt um den Faktor 1000 höher als die notwendige

Konzentration für die Lipase [162]. Neben der Auswirkung der Lipaseaktivität auf mittelkettige Triglyceride (MCT) untersuchten Fernandez *et al.* die Effekte der Lipase auf PEG-Ester sowie Mono- und Diglyceride [28]. In der Studie zeigte die Lipase eine sehr niedrige Aktivität für Labrasol®, PEG-Ester und Monoglyceride [28]. Die Letztgenannten weisen gleichfalls wie das in dieser Studie verwendete CP nur eine einfache Esterbindung auf und sind Substrate der Enzyme CEH und PLRP2 [28]. In Studien von Müller *et al.* und Olbrich *et al.* hingegen wurde mittels isolierter Lipasen die Aktivität auf CP-SLN nachgewiesen [163, 164]. Ausgehend von diesen Beobachtungen wurde angenommen, dass der Abbauprozess von CP-SLN mehreren Enzymen unterliegt.

In der vorliegenden Studie ist der Anteil des Abbaus von der pankreatischen Lipase in dem Pankreatinenzymgemisch auf CP-SLN P188 untersucht worden. Aufgrund der hohen Titrationseffizienz wurde bei den CP-SLN P188 nur mit dem pH-stat System gearbeitet.

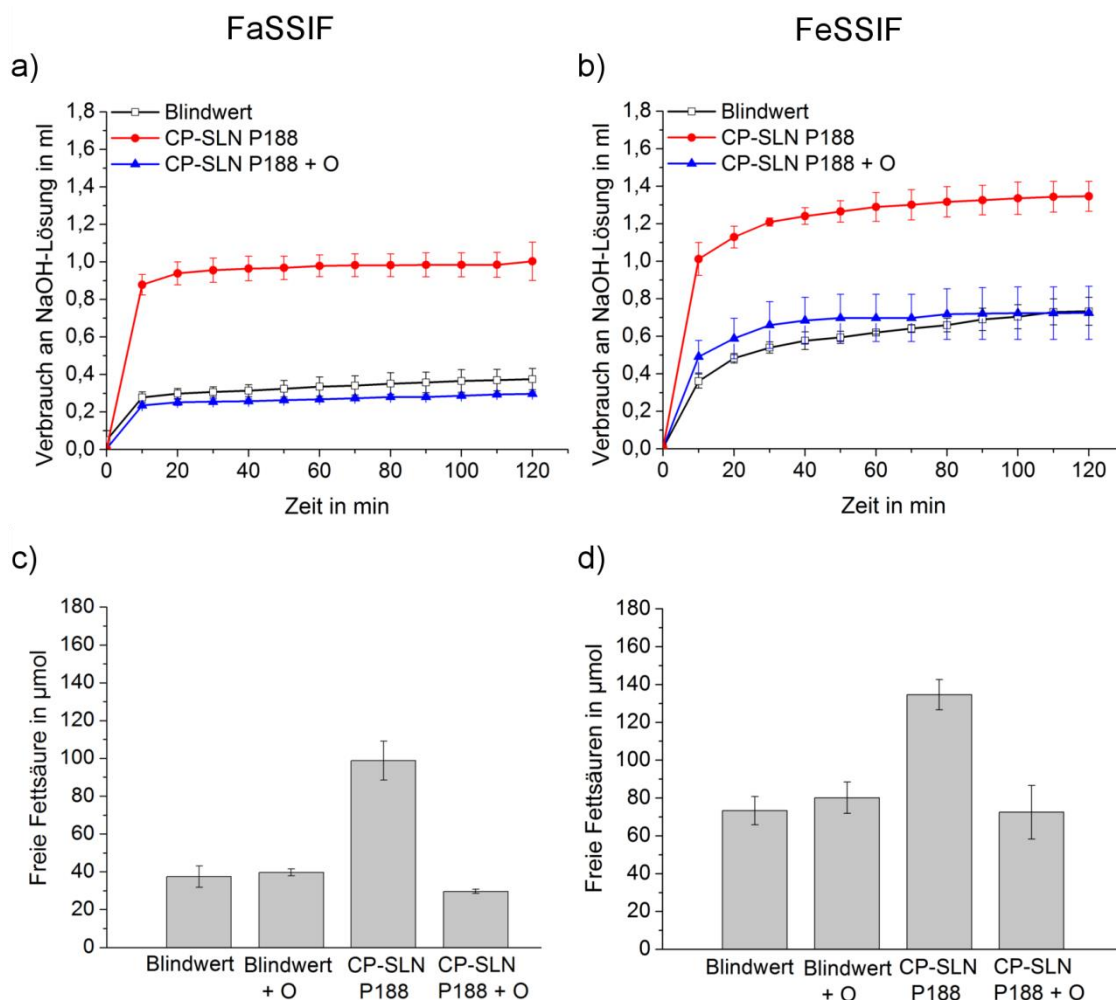


Abb. 24 Zeitlicher Verlauf des Verdaus von der Probe CP-SLN P188+O im Vergleich zu CP-SLN P188 mit der pH-stat Methode über 120 min (a und b). Ergebnisse des Verdaus nach 120 min (c und d) im FaSSIF (a und c) sowie FeSSIF (b und d).

Das Verdauexperiment über 120 min mit der Probe CP-SLN P188+O im Vergleich zu den CP-SLN P188 ist in Abb. 24a und b dargestellt. Der Verlauf der Verdaukurve von

CP-SLN P188+O ist mit dem Verlauf des Blindwertes im FaSSIF sowie im FeSSIF vergleichbar und es konnte kein Verdau der Formulierung CP-SLN P188+O festgestellt werden. Es findet eine vollständige Hemmung des Abbauprozesses statt.

Zur Überprüfung des Einflusses des Orlistats auf den enzymatischen Verdau des Blindwertes wurde in Vorversuchen eine ethanolische Orlistatlösung hergestellt. An dem Verdau von einer MCT-Nanoemulsion wurde nachgewiesen, dass die ethanolische Orlistatlösung zur Hemmung des Abbaus der Nanoemulsion führt. Diese Lösung wurde anschließend vor Beginn des Verdauexperimentes zu den Medien dazugegeben und über 120 min beobachtet (Blindwert+O). Zur besseren Übersicht wurden die Menge der detektierten Fettsäuren dieser Formulierung nach 120 min Verdau im Vergleich zu den orlistatfreien Blindwerten sowie den Proben CP-SLN P188 und CP-SLN P188+O in Abb. 24c und d dargestellt. Es wird ersichtlich, dass keine Differenzen zwischen den Blindwerten mit und ohne Orlistatzugabe auftreten und der Wert des Blindwertes durch Orlistat nicht beeinflusst wird.

Es kann davon ausgegangen werden, dass bei einem Enzymgemisch nur die pankreatische Lipase für den Abbau von CP verantwortlich ist und die weiteren enthaltenen Enzyme keinen Einfluss haben. Bisherige Studien mit CP haben die Lipase als isoliertes Enzym zum Abbau von CP untersucht [163, 164]. In dieser Studie wurden zusätzlich weitere pankreatische Enzyme, die im Enzymgemisch vorliegen, verwendet. Die Lipase wurde als einziges am Abbau von CP beteiligtes Enzym herausgestellt. Die Vermutung, dass weitere Enzyme wie z. B. CEH oder PRPL2 wegen der breiten Substratspezifität und Aktivität bei Monoglyceriden und weiteren einfachen Estern [28] hauptverantwortlich für den Abbau von CP sind, wurde nicht bestätigt. Die Studie zeigt somit deutlich, dass neben den Triglyceriden auch einfache Esterbindungen, wie bei CP, Ausgangssubstrate für die Lipase sind.

4.1.11 Abbau von Cetylpalmitatnanopartikeln

Für die Proben CP-SLN P188 und CP-SLN PS80 wurden die prozentualen Abbauwerte, bezogen auf den CP-Einsatz im Verdaumedium, errechnet (Tab. 13).

Bei den Formulierungen wurden der Blindwert sowie der Verdau des Emulgators PS80 berücksichtigt und von den entsprechenden Werten subtrahiert. Die Ergebnisse zeigen den unvollständigen Abbau der CP-SLN. Für SLN aus Wachsen wird übereinstimmend ein verminderter Abbau im Vergleich zu Lipidemulsionen und SLN aus Triglyceriden beschrieben [136]. Hochkristalline Substanzen, hochschmelzende Glyceride und Wachse werden aufgrund des erschwerten Abbaus von dichten Kristallen oftmals nur teilweise oder gar nicht verdaut [4].

Die Formulierung CP-SLN P188 weist vergleichbare Werte von etwa 30 % im FaSSIF und FeSSIF mit der pH-stat Methode und der HPTLC auf. Der Abbau der Formulierung erfolgt aufgrund dessen unabhängig von der Gallensalz/Phospholipid-Konzentration der Medien.

Bei den CP-SLN PS80 zeigt sich im FaSSIF ein geringerer Abbau mit der pH-stat Methode und der HPTLC von 24 %. Im FeSSIF ist im Vergleich der beiden Methoden ein verminderter Abbau bei der pH-stat Methode zu erkennen. Das HPTLC Ergebnis weist einen wesentlich erhöhten Verdau auf und die Differenz zeigt die ungenügende Erfassung der freien Fettsäuren bei der Titration der pH-stat Methode. Bei dieser Probe wird ein Unterschied zwischen den Medien auch eindeutig ersichtlich.

Tab. 13 Prozentuale Abbauwerte der Formulierungen CP-SLN P188 und CP-SLN PS80 mit der pH-stat Methode und der HPTLC. Die Blindwerte sowie der Verdau des Emulgators PS80 wurden bei den Formulierungen berücksichtigt und von den entsprechenden Werten subtrahiert.

Abbau in %	FaSSIF		FeSSIF	
	pH-stat	HPTLC	pH-stat	HPTLC
CP-SLN P188	29,4 ± 3,3	30,8 ± 4,4	29,5 ± 3,8	30,1 ± 6,6
CP-SLN PS80-PS80	24,7 ± 3,0	23,5 ± 2,6	23,9 ± 4,4	43,7 ± 5,7

Müller *et al.* untersuchten den Abbau von Natriumcholat-stabilisierten CP-SLN mit isolierter Lipase durch den Trübungsgrad und Olbrich *et al.* überprüften den Abbau von CP-SLN mit verschiedenen Emulgatoren (Cholsäure, Lecithin, Poloxamer 407 sowie PS80) durch ein Fettsäure-Nachweiskit. Hier wurde jeweils bei den Natriumcholat- bzw. Cholsäure-stabilisierten NP ein maximaler Abbau von 28 % [164] und 30 % [163] festgestellt. In der vorliegenden Studie sind die CP-SLN P188 mit diesen Ergebnissen vergleichbar, da Cholsäure/ Natriumcholat bzw. artverwandte Stoffe als Bestandteile im Gallensalz-Gemisch in den Medien enthalten sind und P188 keine weiteren Effekte auf den Verdau der Partikel zeigt. Mit dem Emulgator PS80 wurden bei Olbrich *et al.* ein geringerer Abbau von 20-25 % gemessen [163]. Aufgrund der fehlenden Zugabe weiter Gallensalze zu der isolierten Lipase und Colipase ist dieses Ergebnis mit dem FaSSIF-Status vergleichbar.

Bei LBDDS findet im FeSSIF durch die erhöhte Solubilisierungskapazität der freien Fettsäuren infolge der erhöhten Gallensalz/Phospholipid-Konzentration oftmals ein erhöhter Verdau statt. Die hemmenden Fettsäuren werden im FeSSIF von der LWG besser solubilisiert und die Lipase besitzt die Möglichkeit zur Fortsetzung der Lipolyse. Sek *et al.* konnten dies für den Verdau von Formulierungen mit langkettigen Fettsäuren nachweisen und zeigten für diese einen 2-fach höheren Verdau im FeSSIF als unter nüchternen Konditionen [45]. Diese Erhöhung ist in der vorliegenden Studie bei der Formulierung CP-SLN PS80 zu erkennen.

Die Differenzen im Abbau zwischen den beiden Formulierungen können in dem unterschiedlichen Verhalten der verwendeten Emulgatoren begründet sein. Die Rolle von Emulgatoren in dem Verdauprozess wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Bei Feeney *et al.* werden

von zwei gegensätzlichen Effekten für ethoxylierte nichtionogene Emulgatoren berichtet, die in der Literatur bei dem Verdau von LBDDS mit langkettigen Fettsäuren beobachtet worden sind [65]. Durch die Emulgatoren wird eine erhöhte Solubilisierung von hemmenden Abbauprodukten in Form von Mizellen oder komplexen Strukturen im Zusammenspiel mit Gallensalzen und Phospholipiden erreicht [44]. Im Gegensatz hierzu wird von einer Hemmung der Lipolyse durch die Emulgatoren selbst berichtet [65]. Erste Untersuchungen auf diesem Feld unternahm Borgström und Erlanson [165]. Die hemmenden Effekte von Emulgatoren werden auf das Verdrängen der Lipase von der LWG zurückgeführt [23, 159], wobei die Anordnung und die Orientierung der Substratmoleküle verändert und infolge dessen die Enzymadsorption beeinflusst werden können [160]. Bei ethoxylierten Emulgatoren, wie bei den verwendeten Emulgatoren P188 und PS80, kann durch die vorherrschende Hülle auch die Bindung des Lipase/Colipase-Komplexes verhindert werden [23]. Aufgrund der sterischen Barriere der Emulgatoren um den Lipidtröpfchen bzw. -partikel ist deren Entfernung zumindest teilweise zur Anlagerung des Lipase/Colipase-Komplexes erforderlich. Die Entfernung der sterisch stabilisierenden und stark adsorbierten Emulgatoren ist für die Gallensalze umso schwieriger, je größer die Grenzfläche ist, die diese einnehmen [158]. Dies wird in den Studien von Perez *et al.* verdeutlicht, in denen Poloxamer 407 (mit einer höheren Anzahl an Polyethylenoxid- und Polypropylenoxid) im Vergleich zu P188 eine stärkere Hemmung aufweist [158]. Abbaustudien von langkettigen Lipiden mit P188 zeigten bei Sek *et al.* kein verändertes Abbauprofil (weder Hemmung noch Förderung) zu emulgatorfreien Lipidsystemen, welches mit der Hydrophilie des Emulgators mit einem HLB-Wert (*Hydrophilic-Lipophilic Balance*) von 29 im Vergleich zu anderen Poloxameren mit niedrigeren HLB-Werten erklärt wird [44]. Der Einfluss des P188 auf den Abbau von Lipidsystemen scheint in Übereinstimmung mit den vorliegenden Ergebnissen gering zu sein. Dies wird zusätzlich durch die vergleichbaren Abbauwerte der CP-SLN in den Studien von Müller *et al.* [164] und Olbrich *et al.* [163] bestätigt. PS80 hingegen wird als Hemmstoff der Pankreaslipase bei Christiansen *et al.* [160] beschrieben. Dies könnte die geringeren Abbauwerte der Formulierung CP-SLN PS80 im Vergleich zu den CP-SLN P188 im FaSSIF erklären, welche ebenfalls durch die Untersuchungen von Olbrich *et al.* bestätigt werden [163]. Zusätzlich unterliegt PS80 selbst dem enzymatischen Abbau, wodurch ein komplexes Abbauprofil der stabilisierten Formulierung entsteht. Ausgehend von den Ergebnissen in Tab. 13 mit der HPTLC zeigt sich im FaSSIF (24 %) somit eine Hemmung und im FeSSIF (44 %) eine Erhöhung des Verdaus von CP-SLN PS80 im Vergleich zur P188-stabilisierten Formulierung. Die Auswirkungen auf den Verdau von Lipidformulierungen sind bei diesem Emulgator durch verschiedene Einflüsse geprägt und müssen dahingehend eingängig und abhängig vom vorliegenden System mit verschiedenen Messmethoden untersucht werden.

Zusammenfassend konnte der unvollständige Verdau der CP-SLN mit der vorliegenden Studie bestätigt werden. Herauszuheben ist der Einfluss der Lipase in dem Abbauprozess als alleiniges Enzym im Pankreatingemisch und die Möglichkeit zur Hemmung des Abbaus durch Orlistat sowie der emulgatorabhängige Verdau der CP-SLN. Die Ergebnisse können in weiterführenden Studien für eine effektive Anwendung der CP-SLN als Arzneistofftransportsysteme je nach gewünschtem Anwendungsziel unter Einbeziehung bzw. Umgehung des Abbaus im GIT herangezogen werden. Gleichfalls wurde die Effektivität der pH-stat Methode im Vergleich zur HPTLC sowie zur Rücktitration überprüft. Es wurde herausgefunden, dass besonders bei Formulierungsbestandteilen und Hilfsstoffen mit langkettigen Fettsäuren die Aussagekraft der pH-stat Methode kritisch zu betrachten und zu überprüfen ist. Die Studie legt dar, wie wichtig die ständige Evaluation bzw. Weiterentwicklung von schon etablierten *in vitro* Tests wie der pH-stat Methode ist.

4.2 *In vitro* Verdaustudien mit Polymernanopartikeln²

Für die Untersuchung von Polymer-NP wurden diese aus dem Polymer PLGA hergestellt. Bei PLGA handelt es sich um einen Polyester, der durch die Esterbindungen, ebenfalls wie CP, das Potential besitzt dem enzymatischen Verdau im GIT zu unterliegen. Die PLGA-NP wurden mit in der Literatur häufig verwendeten Emulgatoren bei der Nanopräzipitationsmethode stabilisiert. Neben P188 (PLGA-NP P188) sind des Weiteren PS80 (PLGA-NP PS80), PEG (PEG-PLGA-NP) oder das nicht verdaubare Polymer PVA [106] (PLGA-NP PVA) als übliche Stabilisatoren für die Untersuchungen ausgewählt worden [167, 168]. In Tab. 14 werden von den verwendeten Stabilisatoren für die Nanopräzipitationsmethode die in der Literatur eingesetzten Konzentrationsbereiche aufgelistet. PVA wird in einem breiteren Bereich von 0,15 %-5 % als P188 und PS80 mit 0,15-1,0 % eingesetzt. Um diesem Aspekt bei den Untersuchungen gerecht zu werden, wurde bei P188 und PS80 0,6 % und bei PVA verschiedene Mengenanteile sowie diverse Molekulargewichte bei der Herstellung und im Verdautest untersucht. Für die Charakterisierung der PLGA-NP mit PVA wurde PVA I (Gohsenol[®] EG 05 PW; Tab. 3) (PLGA-NP PVA I) in der Menge 0,1 % ausgewählt. Zur Erläuterung zur Auswahl dieser Probe wird auf Kapitel 4.2.7 verwiesen. Als weiteres Ziel der Studie wurden Untersuchungen zum Anteil der Lipase am Abbauprozess von PLGA-NP vorgenommen. Hierfür wurden orlistathaltige Partikel mit P188 (PLGA-NP P188 + O) hergestellt.

Tab. 14 Beispiele für Art und Menge der Stabilisatoren bei PLGA-NP mit der Präzipitationsmethode.

Stabilisator	verwendete Menge	Referenz
P188	0,5 %	[169]
P188	0,5 %	[170]
PVA	0,25-1 %	[171]
PVA	2,0 %	[172]
P188 oder PVA	1 %	[173]
PVA; P188; PS80 und andere	0,5 %	[174]
PS80 oder PVA und andere	0,15 %	[175]
PVA	1 %	[176]
PVA	5 %	[177]
P188 und PS80	0,4 %	[178]
PVA und andere	1 %	[179]
PVA	1%; 3 %	[180]
PVA	0,5-2,5 %	[181]

² Ergebnisse dieses Kapitels, die in Kooperation mit Anika Gloge (geb. Mante) [166] entstanden sind, wurden veröffentlicht in: Mante A, Heider M, Zlomke C, Mäder K (2016) PLGA nanoparticles for peroral delivery: How important is pancreatic digestion and can we control it? Eur J Pharm Biopharm 108:32–40

4.2.1 Partikelgrößenanalytik

Das Erscheinungsbild der Proben ist opaleszent und makroskopisch partikelfrei (Abb. 25). Die Größencharakterisierung wurde mittels PCS und NTA durchgeführt. Die LD wurde aufgrund des nötigen hohen Materialeinsatzes des zur Verfügung stehenden Gerätes für diese Partikel nicht durchgeführt. Zur Erkennung und zum Ausschluss größerer Partikel wurden die Proben bei der Evaluierung des Herstellungsprozesses zusätzlich mit dem Lichtmikroskop betrachtet, wobei keine Partikel im Mikrometerbereich gefunden wurden.

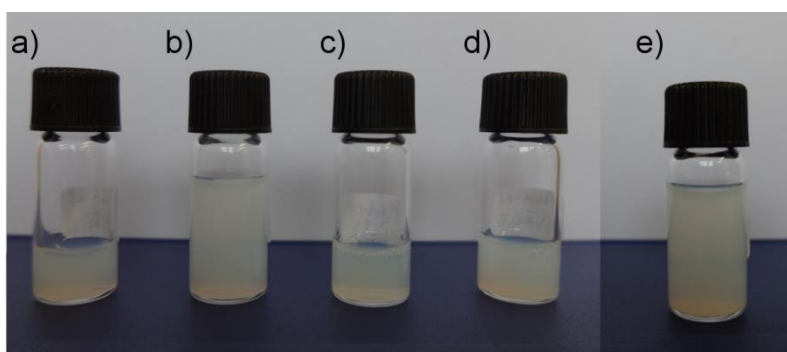


Abb. 25 Fotografische Aufnahmen der Vials mit den PLGA-Proben. a) PLGA-NP P188; b) PLGA-NP P188+O; c) PLGA-NP PS80; d) PLGA-NP PVA I; e) PEG-PLGA-NP.

Die Partikel wurden mit der PCS hinsichtlich der Größenverteilung (Abb. 26) und des Z-Averages sowie des PDI (Tab. 15) untersucht. Die Proben PLGA-NP P188 und PLGA-NP PS80 weisen vergleichbare Verteilungen auf, wohingegen die PLGA-NP PVA einen größeren Z-Average von 165 nm besitzen. Durch die für diese Partikel verwendete Herstellungsweise wurde bei den PEG-PLGA-NP ein Z-Average um 60 nm gemessen. Das Auftreten kleinerer Partikel bei pegylierten Polymeren ist bei der Nanopräzipitationsmethode ebenfalls von Ameller *et al.* für PLGA und weitere Polymere wie PLA und Poly- ϵ -caprolacton beschrieben [182]. Aufgrund des Größeneinflusses bei dem Verdauungsprozess bei Lipiden [139–141] wurde zur Minimierung größenbedingter Aspekte die Herstellungsmethode geringfügig modifiziert. Die resultierenden Partikel zeigen einen Z-Average von 145 nm. Der PDI um 0,1 zeigt die monomodale Verteilung der Proben an. Die orlistatfreien und orlistathaltigen Partikel weisen ebenso vergleichbare Messwerte auf, so dass die Zugabe des Orlistats im Herstellungsprozess keinen Einfluss auf die Größenverteilung der Partikel besitzt. Mit der Herstellungstechnik der Nanopräzipitation werden NP mit enger Größenverteilung und kleinen PDI erhalten [5], welches mit den vorliegenden Ergebnissen bestätigt werden konnte.

Bei der Vermessung der Proben mit der NTA sind die erhaltenen Mittelwerte, wie bei den CP-SLN, geringer als der Z-Average. Die Streuung der Mittelwerte (99-111 nm) ist ebenfalls kleiner als bei der PCS (116-165 nm). Differenzen zwischen den Messmethoden können, wie in der Literatur [148, 149] und in Kapitel 4.1.3 beschrieben, auftreten. Legt man erneut die anzahlgewichtete Messung des Zetasizers zugrunde, besitzen 95-99 % dieser Polymerpartikel

eine Größe unter 220 nm, womit die Wahrscheinlichkeit der Erfassung sehr großer Partikel mit der NTA gering ist und die gemessenen Unterschiede erklärbar sind. Die Monomodalität und enge Größenverteilung der Proben wird durch die Ergebnisse der NTA und der PCS bestätigt.

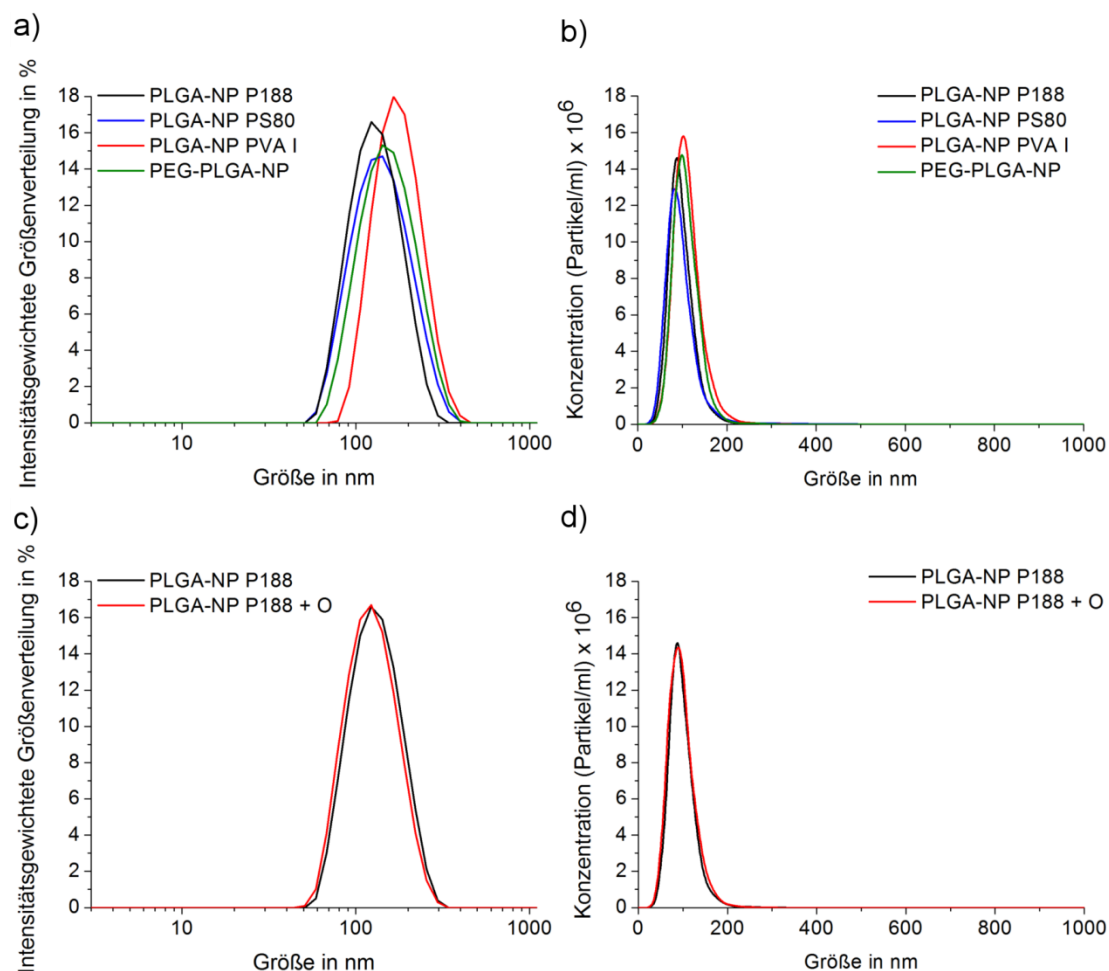


Abb. 26 Größenmessung der PLGA-NP mit der PCS (a und c) und der NTA (b und d).

Tab. 15 Ergebnisse der Größencharakterisierung mit PCS und NTA.

Probe	PCS		NTA	
	Z-Average in nm	PDI	Mittelwert in nm	Modus in nm
PLGA-NP P188	122,0	0,093	99,1	87,8
PLGA-NP P188 + O	116,3	0,095	99,4	98,9
PLGA-NP PS80	129,8	0,126	97,0	82,8
PLGA-NP PVA I	165,4	0,083	111,2	102,2
PEG-PLGA-NP	144,7	0,106	118	99,1

4.2.2 Zetapotential

Das ZP von PLGA-NP wird oftmals mit einer negativen Oberflächenladung angegeben [183–186]. Dieses kann auf die Anwesenheit von deprotonierten Carboxylgruppen auf der Oberfläche der NP zurückgeführt werden [167], welche hydrolysebedingt oder produktionsbedingt auftreten können. Es besteht die Möglichkeit mit der Nanopräzipitationsmethode Partikel ohne Stabilisator herzustellen, welche nur eine begrenzte Stabilität aufweisen [126]. PLGA-NP ohne Stabilisator zeigen nach der Herstellung bis zur Aggregation eine Haltbarkeit von 2-3 Tagen. Das ZP dieser Partikel beträgt $-39,4$ mV und diese sind somit stärker negativ geladen als mit den verwendeten Stabilisatoren (Tab. 16). In Übereinstimmung mit der Literatur wurden bei den stabilisierten PLGA-NP, im Besonderen bei einer Pegylierung der NP [90, 107], eine Abschwächung der Ladung beobachtet. Dieser Effekt könnte auf eine mögliche Abschirmung der Carboxylgruppen und damit einhergehend der Oberflächenladung zurückzuführen sein [80].

Tab. 16 Erhaltene Messwerte für das ZP der PLGA-NP.

Probe	ZP in mV
PLGA-NP ohne Stabilisator	$-39,4 \pm 0,9$
PLGA-NP P188	$-31,8 \pm 0,8$
PLGA-NP P188+O	$-24,9 \pm 0,8$
PLGA-NP PS80	$-23,4 \pm 1,0$
PLGA-NP PVA	$-21,4 \pm 0,7$
PEG-PLGA-NP	$-18,1 \pm 0,7$

4.2.3 Transmissionselektronenmikroskopie

In den elektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigen die PLGA-NP ein rundes Erscheinungsbild (Abb. 27), welches für PLGA-NP auch in der Literatur bestätigt wird [187–189]. Im Gegensatz zu den CP-SLN (Kapitel 4.1.2.) wurden keine plättchenförmigen oder anderweitig geformten Partikel gefunden. Die Oberfläche der Partikel weist in den Bildern eine glatte Beschaffenheit auf. Auch bei Shakweh *et al.* [80] sowie bei Win und Feng [190] werden im Besonderen für PVA-stabilisierte PLGA-NP die runde Form und die glatte Oberfläche bestätigt. Bedingt durch die Herstellung mit der Nanopräzipitationsmethode wirken NP im Widerspruch zu dem gemessenen PDI im Elektronenmikroskopbild polydispers [147]. Bei TEM Darstellungen wird im Gegensatz zur PCS nur ein kleiner Bildausschnitt mit wenigen Partikeln betrachtet. Durch die Angabe des hydrodynamischen Durchmessers der Partikel ist der mit der PCS gemessene Z-Average größer als der Partikeldurchmesser in den Elektronenmikroskopbildern, bei dem es sich um getrocknete Partikel handelt [191].

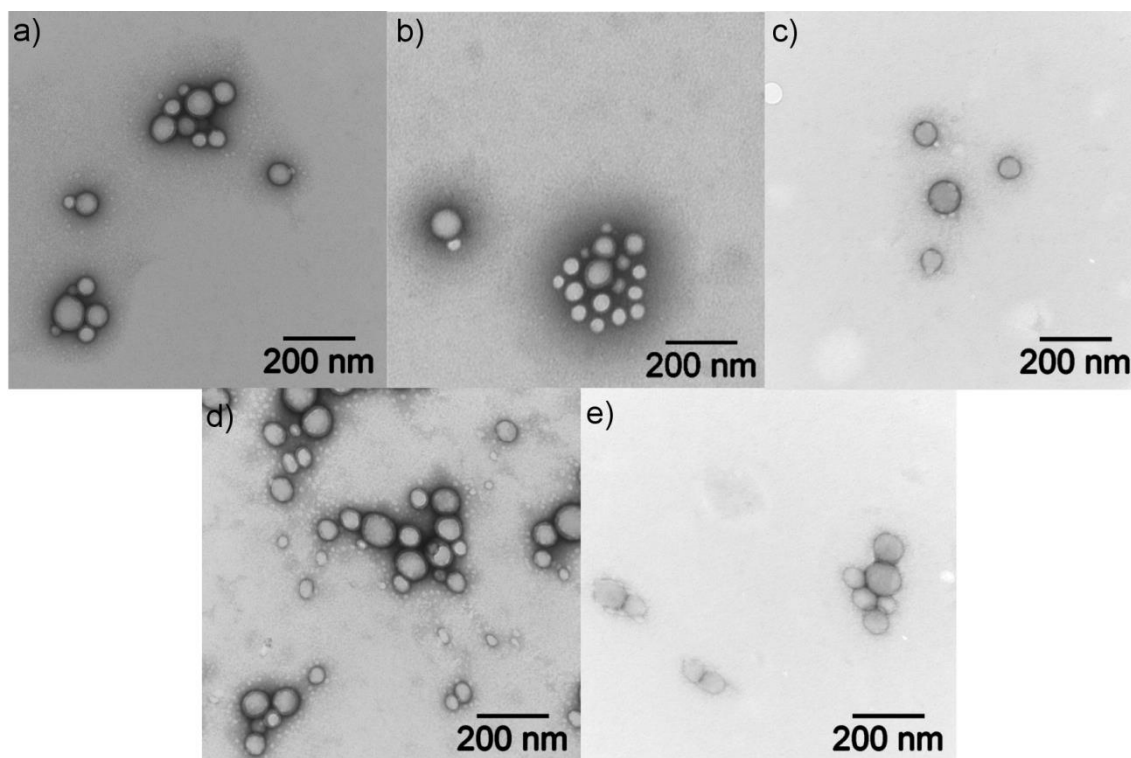


Abb. 27 Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Proben. a) PLGA-NP P188; b) PLGA-NP PS80; c) PLGA-NP P188 + O; d) PLGA-NP PVA I; e) PEG-PLGA-NP.

4.2.4 Stabilitätsmessungen

PLGA ist ein bioabbaubares Polymer, das im wässrigen Milieu der Hydrolyse durch die Spaltung von Estergruppen unterliegen kann. Die Stabilitätsmessungen wurden ausführlich für die PLGA-NP P188 bei der Lagerung im Kühlschrank auf Größen- und pH-Wertänderungen untersucht (Tab. 17). Die P188-stabilisierten PLGA-NP weisen nach der Herstellung einen Z-Average von 124,7 nm und einen PDI von 0,052 auf. Die Lagerung im Kühlschrank zeigt nur messbedingte Abweichungen von der Größe an, obwohl der pH-Wert über 3 Monate um 0,6 sinkt. Die entstehenden Säuren können zur Autokatalyse im Inneren des PLGA-Systems beitragen, wobei der Effekt bei größeren Arzneistoffträgersystemen ausgeprägter ist als bei NP [192]. Der geringe Einfluss der Lagerung auf die Größe der NP im Kühlschrank konnte mit den vorliegenden Ergebnissen gezeigt werden.

Die Einflüsse der Lagerung bei Raumtemperatur (RT) und bei 37 °C auf die PLGA-NP P188 wurden im Folgenden untersucht (Tab. 18). Die erhaltenen Werte ergeben speziell für die Lagerung bei 37 °C eine Erhöhung des Z-Averages durch Aggregation um 40 nm, einen erhöhten PDI von 0,400 sowie einen stärkeren Abfall des pH-Wertes um 1,4. Die Proben wurden aufgrund der Veränderungen im Kühlschrank gelagert, innerhalb weniger Tage analysiert (2-3 d) und für die Verdautests verwendet. Die Werte zeigen, dass der pH-Abfall in dem

relevanten Zeitraum 0,1 pH-Einheiten beträgt, welcher als tolerierbar erachtet wurde. Für eine erhöhte Lagerfähigkeit sollten die PLGA-NP lyophilisiert werden. Diese Methode zeigt bei Holzer *et al.* gute Erfolge für die erhöhte Stabilität bei PLGA-NP [189].

Tab. 17 Größen- und pH-Wertänderungen von PLGA-NP P188 über 3 Monate bei der Lagerung im Kühlschrank bei 4-8 °C.

Zeit	Z-Average in nm	PDI	pH-Wert
0 d	124,7	0,052	4,43
1d	124,4	0,090	4,37
2d	124,1	0,070	4,33
3 d	124,5	0,060	4,31
7 d	124,6	0,065	4,24
10 d	124,8	0,074	4,23
20 d	125,9	0,065	4,09
30 d	126,0	0,062	4,05
2 Monate	124,4	0,060	3,89
3 Monate	124,1	0,065	3,78

Tab. 18 Vergleich unterschiedlicher Lagerungsbedingungen der Formulierung PLGA-NP P188 nach der Lagerung über den Zeitraum von 3 Monaten.

Lagerung	Z-Average in nm	PDI	pH-Wert
4-8 °C	124,1	0,065	3,78
RT	120,4	0,081	3,45
37 °C	162,0	0,400	2,35

4.2.5 Hydrolyse der Polymernanopartikel in den Verdaumedien

Im Gegensatz zu CP besitzt PLGA als Polyester sehr viele Esterbindungen in einem Molekül und kann als Folge über länger-kettige Oligomere zu den kurz-kettigen Säuren Milchsäure und Glykolsäure abgebaut werden. Diese senken den pH-Wert des Mediums und werden durch den Verbrauch der Maßlösung zur Aufrechterhaltung des pH-Wertes bei der pH-stat Methode erfasst. Durch die gute Mischbarkeit dieser Säuren mit Wasser [193, 194] und einem pK_S von 3,86 (Milchsäure [195]) und 3,83 (Glykolsäure [196]) sollte die Erfassung bei pH 6,8, im Gegensatz zu langkettigen Fettsäuren, vollständig erfolgen. Aufgrund der Komplexität der Medien können eine Beeinflussung des pK_S -Wertes oder die Erfassung von Oligomeren nicht ausgeschlossen werden, weswegen zur Überprüfung als Referenzmethode ein spezifischer L-Lactat-NW verwendet wurde.

Die Blindwerte der pH-stat Methode wurden, analog zu den vorherigen Versuchen mit CP, mit den Medien in Abhängigkeit der Pankreatinzugabe über 120 min detektiert (Abb. 28a). Die Medien ohne Pankreatin weisen selbst geringe pH-Wertänderungen über den Zeitraum auf.

Zur Untersuchung der möglichen erhöhten Hydrolyse der Formulierung während des Verdauprozesses bei 37 °C wurden die Medien mit der Probe PLGA-NP P188 versetzt und ebenfalls über den Zeitraum von zwei Stunden beobachtet. Im FaSSIF Medium ist kein Unterschied zu detektieren. Im FeSSIF sind die erhaltenen Werte geringfügig höher (8,0 µmol), welche einer sehr geringen Hydrolyse der Partikel entsprechen. Nach der Zugabe des Pankreatins erfolgt ein Verdau der Medien, welcher jeweils als Blindwert gekennzeichnet wurde (Abb. 28b). Die Ergebnisse der Formulierung PLGA-NP P188 werden im Kapitel 4.2.6 eingehend betrachtet.

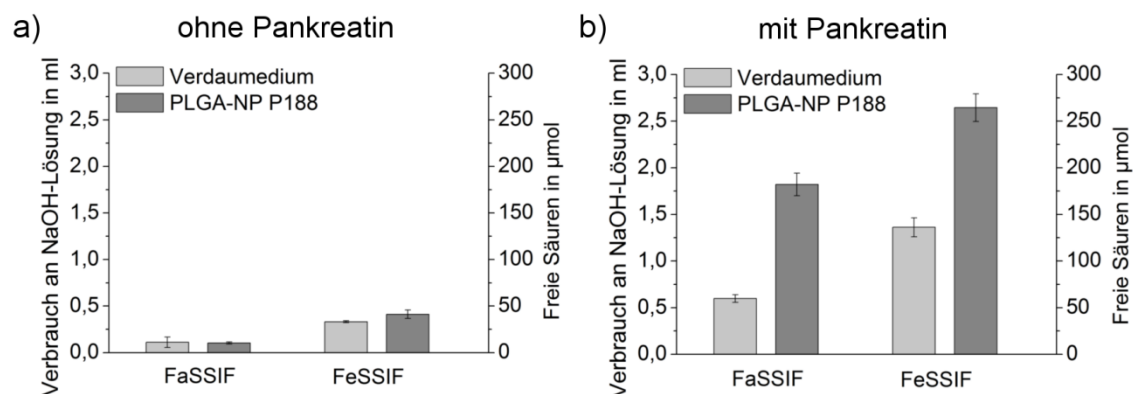


Abb. 28 a) Nicht enzymatische Hydrolyse ohne Pankreatinzugabe und b) Verdau mit Pankreatinzugabe der Medien und der PLGA-NP P188 nach 120 min, bestimmt mit der pH-stat Methode.

Die Medien mit Pankreatinzugabe (Blindwert) sowie die Medien mit der Formulierung PLGA-NP P188 ohne Pankreatinzugabe (entsprechend der Hydrolyse der Formulierung) wurden mit dem L-Lactat-NW untersucht (Abb. 29).

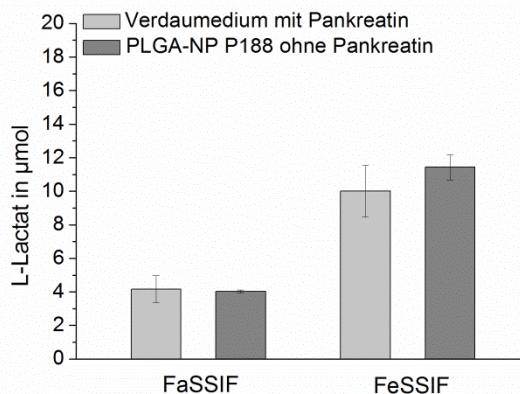


Abb. 29 L-Lactat Gehalt im Medium mit Pankreatinzugabe und der Hydrolyse der PLGA-NP P188 ohne Pankreatinzugabe nach 120 min im FaSSIF und FeSSIF, ermittelt mit dem L-Lactat-NW.

Entgegen der Erwartungshaltung wurde in den reinen Medien mit Pankreatineinsatz ebenfalls L-Lactat festgestellt. Die erhaltenen L-Lactat Ergebnisse sind auf schon im Vorfeld vorhandene Verunreinigungen des Gallensalzgemisches zurückzuführen, die unabhängig von der Pankreatinzugabe sind. Die Werte im FeSSIF sind im Vergleich zum FaSSIF dreifach erhöht, welches dem Gallensalz-Faktor der Medien (FaSSIF 5 mmol/l, FeSSIF 15 mmol/l) entspricht.

Zur Ermittlung der Hydrolyse wurden die Medien mit der Probe PLGA-NP P188 ohne Pankreatinzusatz untersucht. Vergleichbar mit den pH-stat Versuchen zeigt sich im FaSSIF kein und im FeSSIF nur ein sehr geringer Unterschied zum reinen Medium. Der geringe Einfluss der Hydrolyse bei der pH-stat Methode konnte bestätigt werden.

4.2.6 Einfluss der Lipase im Abbauprozess von Polymernanopartikeln

Zur Untersuchung der Abbaufähigkeit von PLGA-NP und des Einflusses der Lipase in diesem Prozess wurden die Probe PLGA-NP P188 und die orlistathaltige Probe PLGA-NP P188+O in beiden Medien untersucht. P188 zeigte in vorherigen Versuchen keinen Einfluss auf den Abbau von CP-SLN und wurde deswegen für die Grundcharakterisierung des enzymatischen Verdaus der Polymer-NP gewählt.

Die Abbaustudien der Partikel wurden mit der pH-stat Methode (Abb. 30a und b) und dem L-Lactat-NW (Abb. 30c und d) über 120 min betrachtet. Die PLGA-NP P188 zeigen im FaSSIF und im FeSSIF erhöhte Werte im Vergleich zu den Blindwerten auf. Die Zugabe des Pankreatingemisches führt zum enzymatischen Verdauprozess der Polymer-NP, welcher in einem gesteigerten Verbrauch an NaOH-Maßlösung bzw. in der Entstehung von freiem L-Lactat resultiert.

Abzüglich der jeweiligen Blindwerte wurden für die pH-stat Methode 122,3 μmol (FaSSIF) und 128,3 μmol (FeSSIF) sowie für den L-Lactat-NW 24,9 μmol (FaSSIF) und 23,9 μmol (FeSSIF) detektiert. Aufgrund der geringen Unterschiede zwischen den Medien ist der Abbau bei diesen NP unabhängig von der Gallensalzkonzentration. Durch die gute Wasserlöslichkeit der entstehenden Milch- und Glykolsäuren [193, 194] führt die Erhöhung der Gallensalz-/Lecithinkonzentration zu keiner verbesserten Solubilisierung und infolge dessen zur erhöhten Detektion der freien Säuren.

Durch das stöchiometrische Vorkommen des L-Lactates von 25 % in dem Polymer werden die erhaltenen Ergebnisse im Vergleich mit der pH-stat Methode entsprechend durch eine Vervierfachung angepasst. Auf den jeweiligen rechten Skalen der Diagramme sind die erhaltenen Werte in μmol aufgetragen und direkt vergleichbar. Auftretende Differenzen zwischen den Methoden können durch die Erfassung von Oligomeren bei der pH-stat Methode im Gegensatz zur spezifischen L-Lactat Erfassung begründet sein.

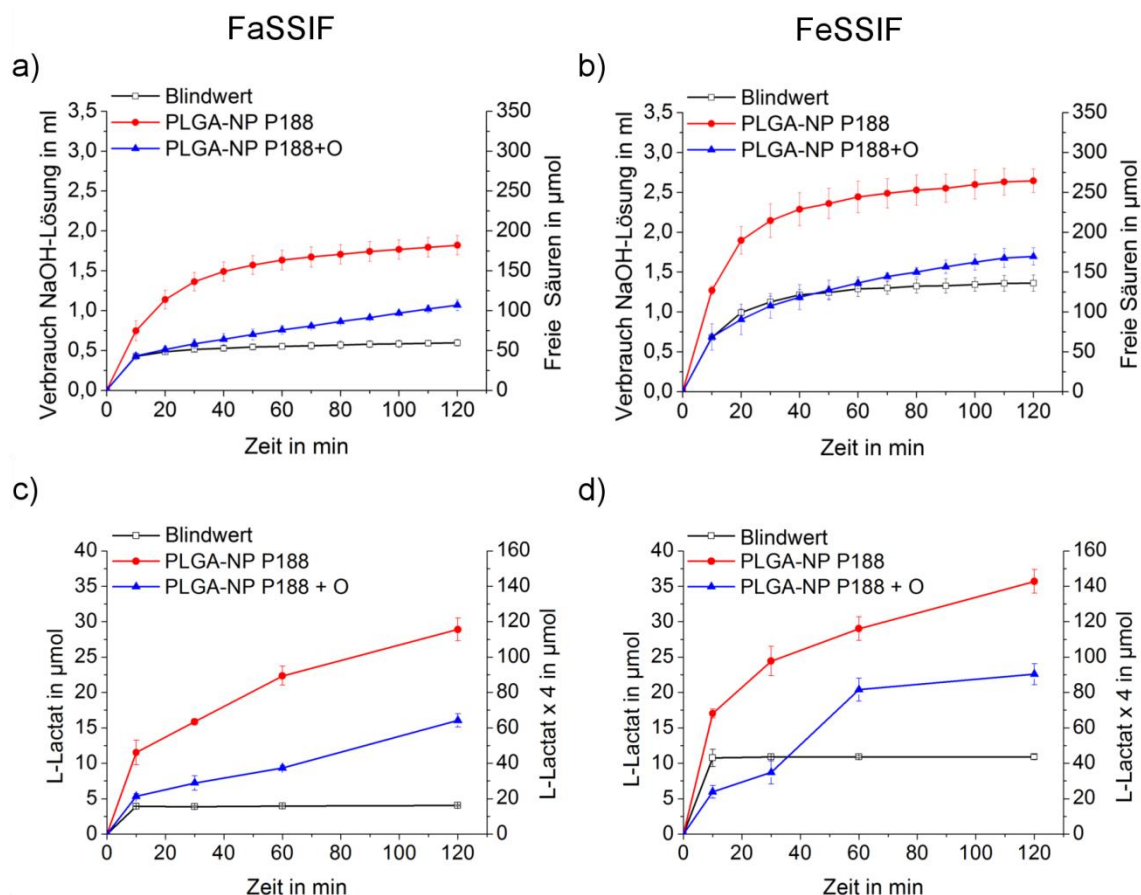


Abb. 30 Verlauf der Freisetzung freier Säuren bzw. von L-Lactat während des Verdaus der orlistathaltigen Partikel (PLGA-NP P188+O) im Vergleich zu den Partikeln ohne Lipasehemmer (PLGA-NP P188) mit der pH-stat Methode (a und b) und dem L-Lactat-NW (c und d) in den Medien FaSSIF (a und c) und FeSSIF (b und d).

Bei der Vermessung der Probe PLGA-NP P188+O reduzieren sich die detektierten freien Säuren durch die von Orlistat verursachte Hemmung der Lipase in beiden Methoden (Abb. 30). Im Widerspruch zu der abweichenden Struktur des Polymermoleküls von anderen Substraten der Lipase konnte diese als wichtiges Enzym im Abbauprozess der PLGA-NP identifiziert werden. Durch die anteilige Hemmung sind schlussfolgernd weitere Enzyme neben der Lipase am Abbau der PLGA-NP beteiligt.

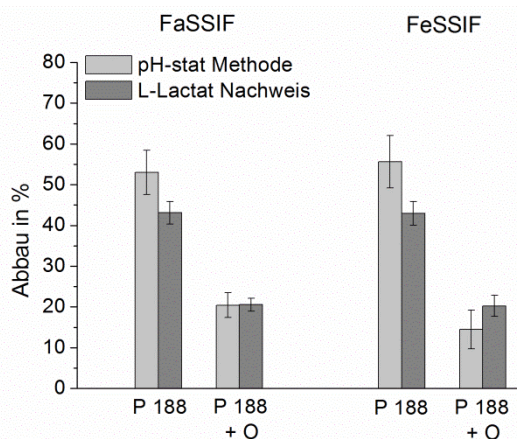


Abb. 31 Abbau der Partikel PLGA-NP P188 und der orlistathaltigen PLGA-NP P188+O nach 120 min.

In Abb. 31 werden die prozentualen Abbauwerte, gemessen an dem eingesetzten PLGA der Proben PLGA-NP P188 und PLGA-NP P188+O, dargestellt. Die NP unterliegen einem unvollständigem Verdau zu 52-55 % (pH-stat Methode) bzw. zu 42-43 % (L-Lactat-NW) durch das Pankreatingemisch. Der Abbau der orlistathaltigen Proben wurde mit 14-20 % (pH-stat Methode) und mit 20-21 % (L-Lactat-NW) bestimmt. Legt man die Werte des L-Lactat-NW aufgrund der höheren Spezifität zugrunde ergibt sich eine Hemmung von annähernd 50 % durch den Lipasehemmer. Die Lipase ist dementsprechend für einen Großteil des enzymatischen Abbaus der PLGA-NP verantwortlich. Landry *et al.* führten den Verdau von Polymer-NP auf einen Erosionsabbau an der Oberfläche der Partikel aufgrund des hohen Molekulargewichtes der Lipase (38 000) zurück [104]. Dieser ist es im Gegensatz zu Wasser, nicht möglich in das Innere der Partikel vorzudringen [104]. Um den Verdauprozess genauer zu verstehen, wurden TEM-Aufnahmen der Partikel PLGA-NP P188 nach dem Verdautest im FaSSIF angefertigt (Abb. 32). Diese weisen im Vergleich zu den unverdauten Partikeln noch intakte NP mit unregelmäßiger Oberfläche auf. Weiterhin sind Ablagerungen von dem Medium (Gallensalze u. a.) im TEM-Bild erkennbar.

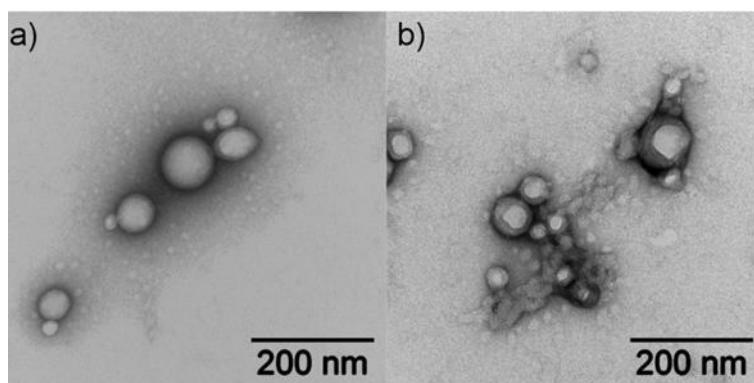


Abb. 32 TEM-Aufnahmen von a) den PLGA-NP P188 vor und b) nach dem Verdau von 120 min im FaSSIF.

Landry *et al.* haben bei der Untersuchung von PLA-NP mit isolierter gealterter und somit in der Aktivität geminderter Lipase gleichfalls einen verminderten Abbau feststellen können [104]. In der vorliegenden Studie konnte übereinstimmend der Abbau von Polymer-NP aus PLGA durch das Pankreatingemisch sowie der Einfluss und im Besonderen das Ausmaß der Lipase für diese Partikel im Verdauprozess gezeigt und bestimmt werden.

4.2.7 Untersuchung der Konzentrationsabhängigkeit von PVA als Stabilisator von Polymernanopartikeln

In folgenden Studien wurde der Einfluss von PVA auf die Herstellung und den Verdau der stabilisierten PLGA-NP mit variierenden Mengenanteilen von 0,1-3,0 % während des Herstellungsprozesses untersucht. Die Größenverteilung der resultierenden Partikel wurde mit der PCS vermessen (Abb. 33). Die Messungen zeigen ab einem Mengenanteil von 3,0 %

einen erhöhten Z-Average sowie PDI-Wert. Die Proben mit 0,1-1,0 % resultierten in vergleichbaren Größenverteilungen. Der Anstieg in der Partikelgröße könnte durch die ansteigende Viskosität bei zunehmendem PVA-Anteil und der einhergehenden langsameren Diffusion des Lösungsmittels (Aceton) in die wässrige Phase bei der Herstellung verbunden sein. Murakami *et al.* haben den Einfluss von PVA hinsichtlich des Polymerisations- sowie Hydrolysegrades und der Konzentration auf die Größe von PLGA-NP untersucht. Die Ergebnisse zeigen übereinstimmend einen Anstieg der Partikelgröße mit zunehmender Konzentration an PVA [197]. Hingegen wurde bei Sahoo *et al.* eine Verkleinerung der Partikelgröße mit steigendem PVA-Anteil festgestellt [167]. Die gegensätzlichen Beobachtungen könnten in der Anwendung unterschiedlicher Herstellungsmethoden und Lösungsmittel begründet sein. In der vorliegenden Studie sowie bei Murakami *et al.* wurden PLGA-NP mithilfe der Lösungsmitteldiffusion (*Solvent Displacement*) mit wassermischbarem Aceton hergestellt [197], wohingegen bei Sahoo *et al.* das Emulsionsverfahren mit wasserunlöslichen Lösungsmitteln wie Chloroform verwendet wurde [167].

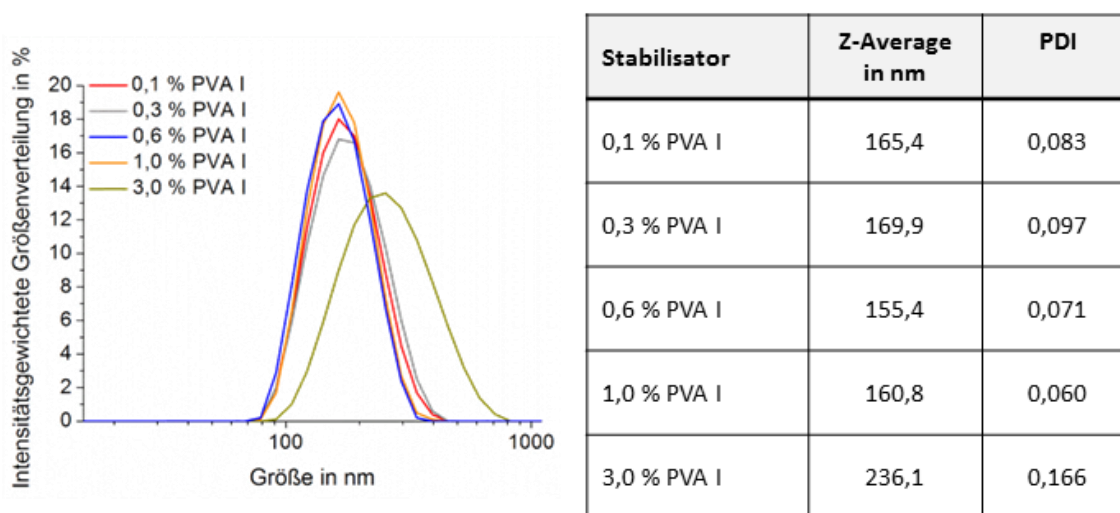


Abb. 33 Größenmessung der PLGA-NP mit unterschiedlichem PVA Gehalt, gemessen mit der PCS.

Zur Untersuchung der Abbaubarkeit des PVA wurden separate Vorversuche durchgeführt. Hierbei wurde die gleiche Menge PVA, wie in der Probe PLGA-NP PVA 3,0 % vorhanden ist, zu den Medien hinzugefügt und über 120 min beobachtet. Es wurden keine Differenzen zu den Blindwerten festgestellt. Die Werte zeigen keine Hemmung des Verdaus von den Medien selbst und belegen die fehlende Bioabbaubarkeit des PVA im GIT.

Weiterführend wurden die Partikel mit der pH-stat Methode und dem L-Lactat-NW auf Unterschiede im Verdauprozess untersucht (Abb. 34). Mit beiden Methoden wurde bei den PLGA-NP PVA I mit 0,1 % ein enzymatischer Abbau festgestellt. Die Proben mit höherem PVA-Anteil weisen einen vergleichbaren Verlauf wie die Blindwerte auf. Als Folge ist mit steigendem PVA-Anteil ein Abfall der Abbaubarkeit in den enzymatischen Medien zu beobachten. Durch die Zugabe der Proben zu dem Verdaumedium findet eine Verdünnung der

PLGA-NP sowie des PVA-Anteils statt, wobei die Endkonzentration im Verdaumedium stets 1/3 des Anteils während der Herstellung beträgt.

Die experimentellen Daten belegen, dass bei der Probe PLGA-NP PVA I nur bei einer Menge von 0,033 % PVA (= 0,1 % in der Herstellung) ein Abbau stattfindet. Die Charakterisierungen sowie weitergehende Untersuchungen der Proben mit PVA-Stabilisierung wurden daher mit dieser Probe durchgeführt.

Übereinstimmend zeigten Landry *et al.* an PVA- und Albumin-stabilisierten PLA-NP, dass im Gegensatz zu einer Albumin-Stabilisierung bei der Verwendung von PVA kein Abbau und eine verminderte Freisetzung inkorporierter Stoffe erfolgte. Hier wurde für die Herstellung nach dem Emulsionsverfahren eine jeweils 1 %ige Stabilisatorlösung verwendet [106].

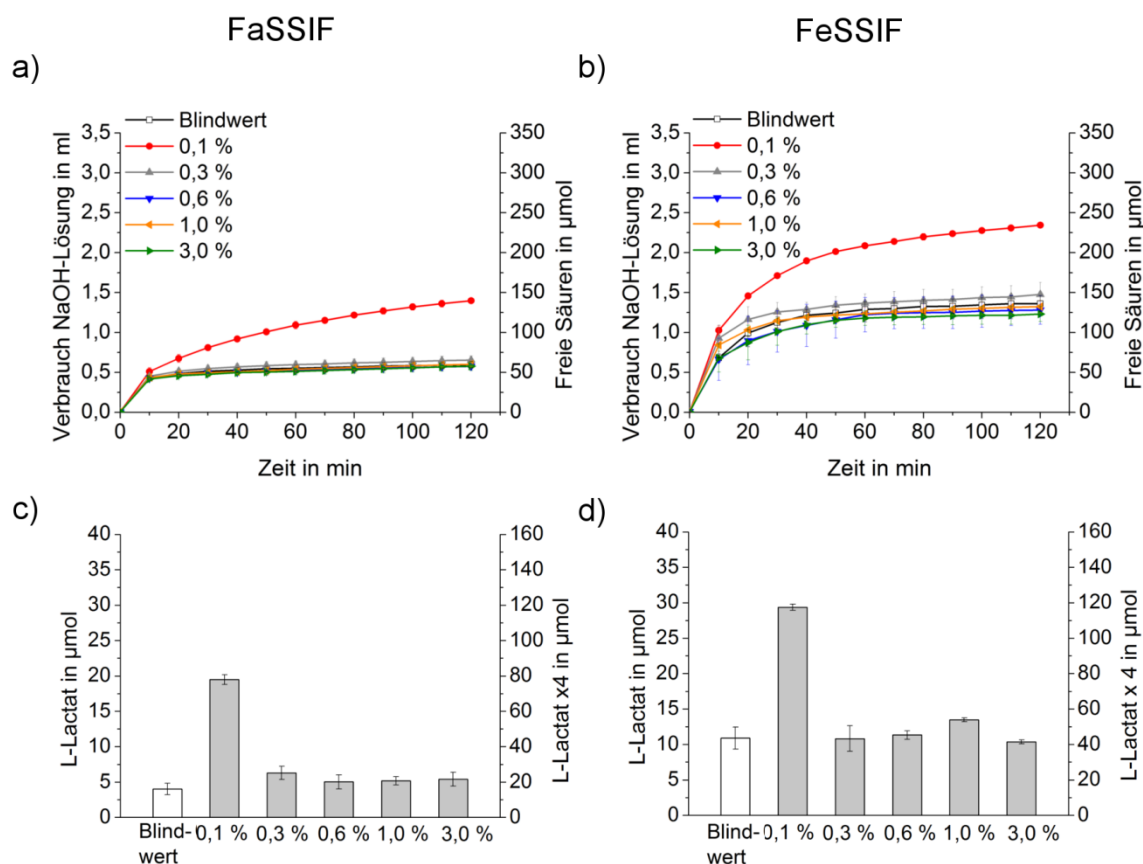


Abb. 34 Ergebnisse der pH-stat Methode (a und b) und des L-Lactat-NW (c und d) nach 120 min im FaSSIF (a und c) und FeSSIF (b und d). Die Prozentangaben geben das Mengenverhältnis von PVA I im Herstellungsprozess der NP an.

PVA ist den Ergebnissen zufolge ein Hemmer des pankreatischen Enzymverdaus. Im Besonderen gilt dies auch für die Lipase, deren Einfluss auf den Abbau von PLGA-NP bereits gezeigt wurde (Kapitel 4.2.6). Aufgrund der großen Strukturunterschiede zwischen PVA und potentiellen Lipasehemmern wird eine direkte Hemmung im katalytischen Zentrum der Lipase als unwahrscheinlich angesehen [95]. Näher in Betracht könnte eine verringerte Bindung bzw. Anlagerung des Lipase/Colipase-Komplexes sowie eine verminderte Aktivierung der Lipase an der Partikeloberfläche aufgrund der PVA-Stabilisierung kommen [95]. PVA bildet

während des Herstellungsprozesses ein stabiles Netzwerk auf der Oberfläche der Partikel und bleibt, im Besonderen nach dem Einsatz von wasserlöslichen organischen Lösungsmitteln, wie Aceton, an der Oberfläche der NP durch Interaktionen mit dem PLGA haften [167]. Mit steigender PVA Konzentration zur Stabilisierung der NP erhöht sich gleichfalls der Anteil an PVA auf der Partikeloberfläche, wodurch die Partikel eine erhöhte Hydrophilie besitzen [167]. Ein Verbleiben von PVA auf der Oberfläche konnte auch nach mehrfachen Wasch- bzw. Verdünnungsschritten nachgewiesen werden [80, 167, 198]. Als Folge kann der Polymerkern durch die Stabilisierung mit dem nicht bioabbaubaren PVA vor dem Einfluss von hydrolytischen Enzymen geschützt werden, welches in einem vermindertem Abbau resultiert [106, 198]. Um diesen Effekt zu erzielen, wird in der vorliegenden Studie eine Konzentration von 0,3 % bei der Herstellung (= 0,1 % in den Verdaumedien) benötigt. Für weitere eingehende Aussagen zum Mechanismus sind detailliertere Untersuchungen notwendig, obwohl diese aufgrund der komplexen Zusammensetzung des Enzymgemisches sowie der trüben Erscheinung im wässrigen Milieu wegen unlöslicher Bestandteile (z. B. Kollagenrückstände) und einer Aktivitätsminderung durch Aufbereitungsschritte (z. B. Filtration) schwierig durchzuführen sind [95].

4.2.8 Einfluss des unterschiedlichen Molekulargewichtes von PVA als Stabilisator von Polymernanopartikeln

Zur Untersuchung des Einflusses des Molekulargewichtes wurden PLGA-NP PVA mit unterschiedlichen Molekulargewichten (PVA I-PVA V, Tab. 3) bei gleichbleibendem Hydrolysegrad von 88 % und einer Konzentration von 0,1 % hergestellt.

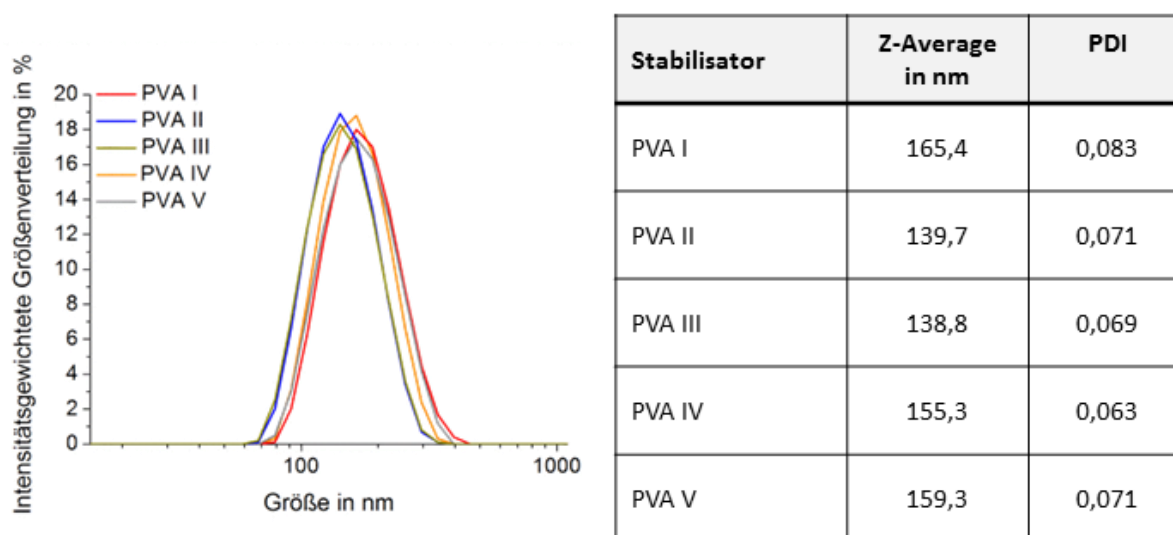


Abb. 35 PCS Größenanalytik der PLGA-NP Proben mit unterschiedlichen Molekulargewichten.

Die resultierenden Partikel wurden zur Größenbestimmung mit der PCS vermessen (Abb. 35) und besitzen vergleichbare Größenverteilungen, PDI und Z-Averages. Durch die Anwendung der verschiedenen Molekulargewichte ist im Gegensatz zu Murakami *et al.* [197] kein Einfluss auf die Größencharakteristika der PLGA-NP mit PVA zu erkennen.

Die Partikel wurden anschließend im Verdauexperiment mit der pH-stat Methode sowie dem L-Lactat-NW untersucht (Abb. 36). Die Kurvenverläufe der pH-stat Methode sowie die Endergebnisse beider Methoden untereinander nach 120 min weisen im FaSSIF und im FeSSIF nur geringe Unterschiede auf und dementsprechend ist der Einfluss des Molekulargewichtes auf den enzymatischen Abbau der PLGA-NP marginal.

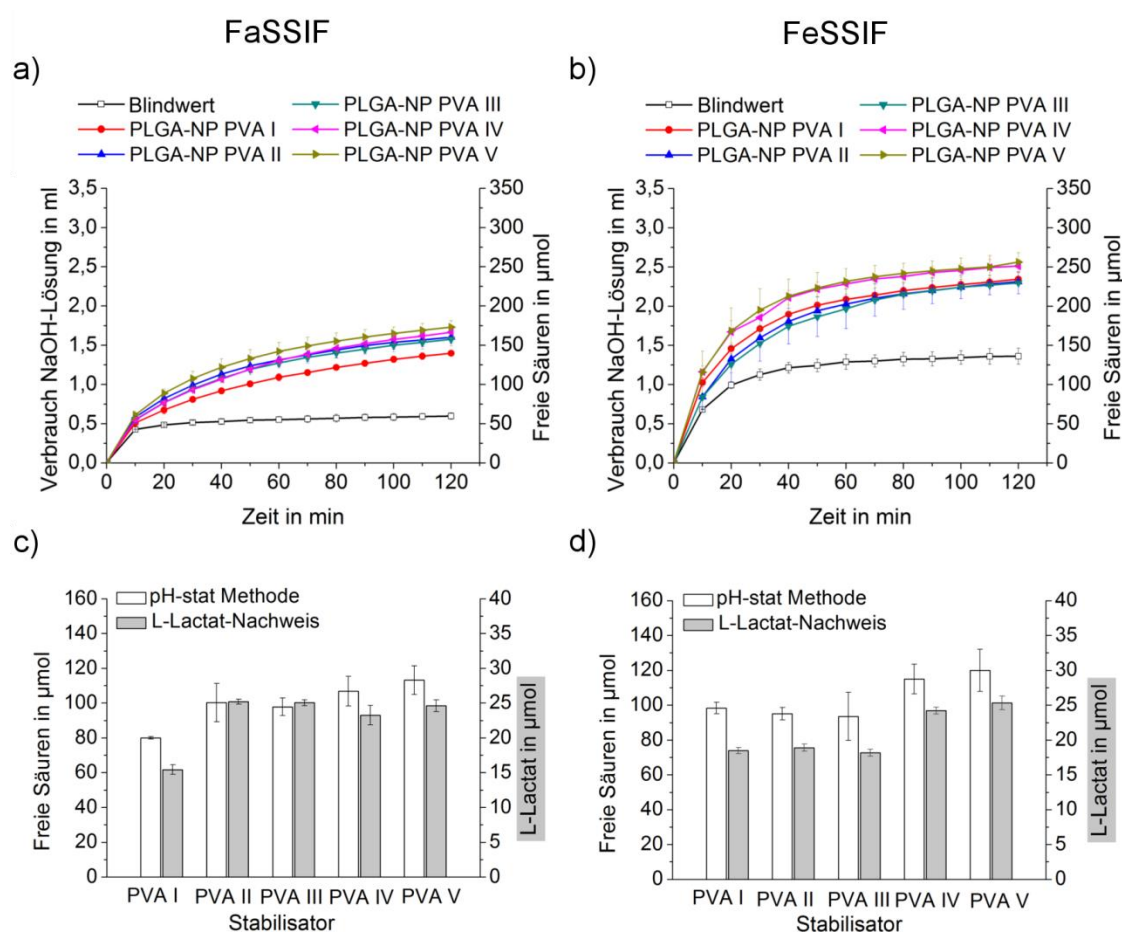


Abb. 36 Verdaustudien mit der pH-stat Methode über 120 min (a und b). Vergleich der Endergebnisse mit der pH-stat Methode und dem L-Lactat-NW nach 120 min (c und d). Die entsprechenden Blindwerte wurden berücksichtigt und von den erhaltenen Werten subtrahiert. Die Versuche wurden im FaSSIF (a und c) und im FeSSIF (b und d) durchgeführt.

4.2.9 Einfluss der unterschiedlichen Stabilisatoren auf den Abbau von Polymernanopartikeln

Zur Untersuchung des Einflusses unterschiedlicher Stabilisierungen der PLGA-NP auf den Verdauprozess wurden zusätzlich zu den P188- und PVA-stabilisierten Partikeln PLGA-NP mit PS80 und aus PEG-PLGA-NP hergestellt.

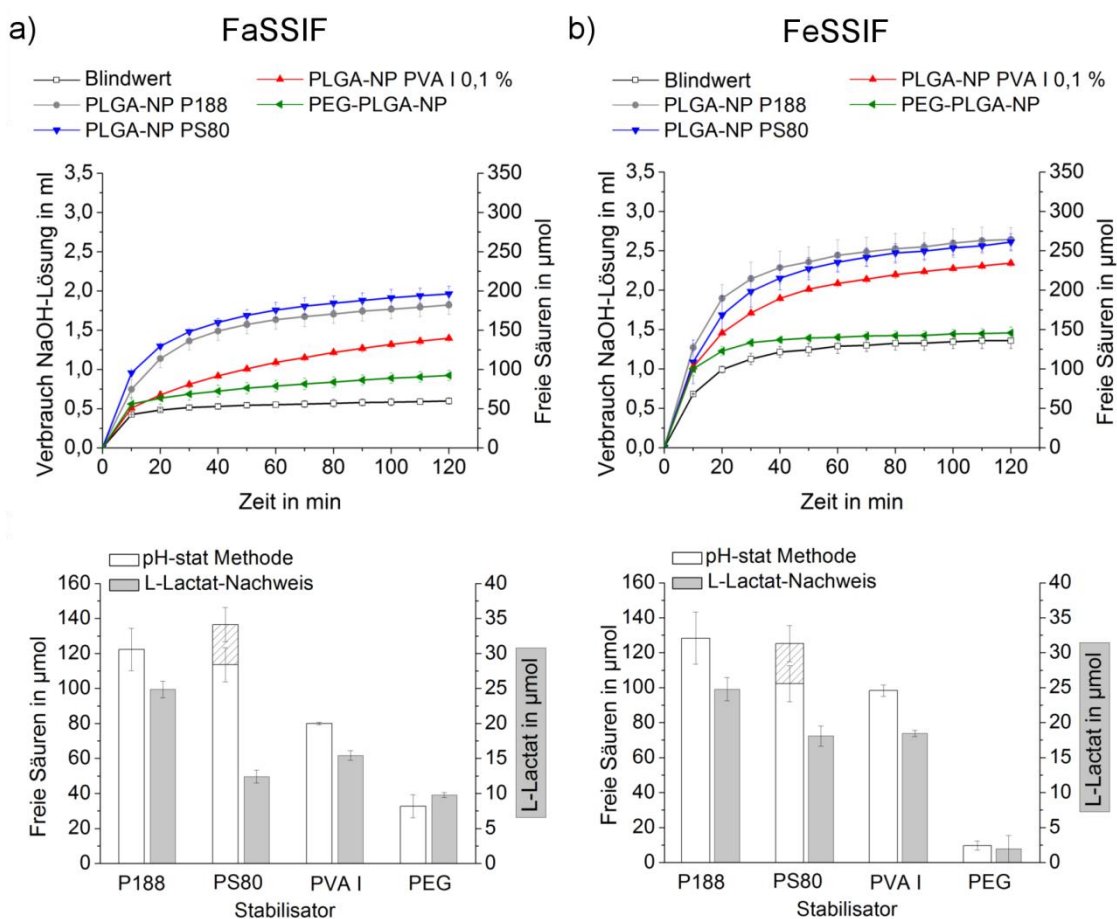


Abb. 37 Verdaustudie der PLGA-NP mit unterschiedlichen Stabilisatoren, charakterisiert mit der pH-stat Methode (a und b). Vergleich der Endergebnisse mit der pH-stat Methode und dem L-Lactat-NW nach 120 min (c und d) unter Berücksichtigung und Subtraktion des jeweiligen Blindwertes für die Methoden. Der Verdau des Emulgators PS80 wurde bei der pH-stat Methode berücksichtigt und wird entsprechend durch die Schraffierung dargestellt. Die Versuche wurden im FaSSIF (a und c) und im FeSSIF (b und d) durchgeführt.

Die Partikel wurden für die Verdauxperimente mit der pH-stat Methode (Abb. 37a und b) untersucht und mit den Ergebnissen des L-Lactat-NW nach 120 min vergleichend dargestellt (Abb. 37c und d). Der Verdau der PLGA-NP P188 und der PLGA-NP PVA I 0,1 % wurde ausführlich in den Kapiteln 4.2.6 und 4.2.7 beschrieben. Die PS80-stabilisierten Partikel zeigen über 120 min mit der pH-stat Methode einen vergleichbaren Verlauf wie die PLGA-NP P188, wobei sich dieses Ergebnis durch die Verdaubarkeit des PS80 (Kapitel 4.1.7) aus dem Abbau des Emulgators sowie der PLGA-NP zusammensetzt. Der Anteil der durch den Emulgator verursachten freien Fettsäuren bei der pH-stat Methode wurde separat bestimmt und durch eine Schraffierung dargestellt. Im Vergleich der beiden Methoden weisen die PLGA-NP PS80 größere Differenzen auf, welche durch die Verdaubarkeit des Emulgators sowie der begrenzten Aussagekraft des pH-stat Modells bei Hilfsstoffen mit langkettigen Fettsäuren bedingt sein können.

Gegenüber der Partikel mit externen Stabilisierungszusätzen ist bei den PEG-PLGA-NP ein verminderter Verdau im FaSSIF und im Besonderen im FeSSIF auffällig.

Die prozentualen Abbauwerte der PLGA-NP mit den verschiedenen Stabilisatoren wurden in Abhängigkeit des jeweiligen Einsatzes des PLGA bzw. PEG-PLGA berechnet und sind in Tab. 19 aufgelistet. Durch die PS80-Stabilisierung zeigt sich, wie auch bei den CP-SLN, ein verminderter Abbau im Vergleich zur P188-Stabilisierung, welcher durch die Hemmung des PS80 auf die Lipase verursacht sein kann [160].

Die PLGA-NP PVA weisen, im Speziellen mit dem L-Lactat-NW, vergleichbare Werte zu den PLGA-NP PS80 auf. Der geringste Abbau ist bei den PEG-PLGA-NP mit 15-18 % im FaSSIF und 3-4 % im FeSSIF festgestellt worden.

Tab. 19 Abbau der PLGA-NP mit der pH-stat Methode und dem L-Lactat-NW. Der Blindwert der Medien sowie der Verdau des Emulgators PS80 wurden bei den Formulierungen berücksichtigt und von den entsprechenden Werten subtrahiert, so dass die Werte dem Verdau der PLGA-NP entsprechen.

Abbau in %	FaSSIF		FeSSIF	
	pH-stat	L-Lactat-NW	pH-stat	L-Lactat-NW
PLGA-NP P188	53,0 ± 5,4	43,1 ± 2,8	55,6 ± 6,4	43,0 ± 2,9
PLGA-NP PS80	49,2 ± 4,3	21,5 ± 1,6	44,3 ± 4,4	31,3 ± 2,6
PLGA-NP PVA I 0,1%	34,7 ± 0,4	26,8 ± 1,2	42,6 ± 1,4	32,0 ± 0,8
PEG-PLGA-NP	15,2 ± 3,1	18,2 ± 0,7	4,5 ± 3,5	3,6 ± 3,2

PEG zeichnet sich als nicht abbaubares [199] und nicht immunogenes Polymer aus, welches durch eine hohe Mobilität in der wässrigen Phase und damit durch einen großen hydrodynamischen Durchmesser gekennzeichnet ist [65]. Aus diesem Grund findet dieses vielfältige biologische Anwendungen, besonders in der Nanomedizin, wobei durch eine PEG-Stabilisierung eine verlängerte Halbwertszeit durch Verhinderung der Opsonierung und Phagozytose im Blutkreislauf erreicht wird [65]. Erstmals wurde dieser Effekt bei pegylierten Liposomen („Stealth-Liposomen“) von Allen und Hansen beschrieben [200], welche seit dem intensiv untersucht werden [201]. Im Gegensatz ist bis jetzt nur wenig über das Verhalten von pegylierten NP bekannt, wenn diese p.o. verabreicht werden [79]. Feeney *et al.* untersuchten die PEG vermittelte Inhibierung des Verdau von Lipidformulierungen und zeigten eine Hemmung in Abhängigkeit des Molekulargewichtes und der Packungsdichte der PEG-Ketten auf der Partikeloberfläche. Diese wurden „oral stealth“ Formulierungen benannt, die aufgrund der hydrophilen Ummantelung nicht spezifische Proteinbindungen, wie den Lipase/Colipase-Komplex, unterbinden können [65]. Tobio *et al.* zeigten dies erstmals an mit I125 Tetanustoxoid-radiomarkierten pegylierten Polymer-NP (PEG-PLA-NP), deren Abbau im enzymhaltigen SIF untersucht wurde. Der Verdau dieser Partikel war mit 3 % ebenfalls sehr gering [107]. In den vorliegenden Untersuchungen wird die verminderte Abbaufähigkeit ebenso für PEG-PLGA-NP bestätigt. PEG stabilisiert effektiv die NP in gastrointestinalen

Flüssigkeiten [107] und kann besonders unter FeSSIF Bedingungen den Verdau stark vermindern.

Weiterhin wird mit den vorliegenden Untersuchungen verdeutlicht, dass der Einfluss des verwendeten Stabilisators der PLGA-NP Auswirkungen auf das Verhalten im GIT hat. Je nach gewünschtem Therapieziel kann durch die Wahl der Stabilisierung eine Beeinflussung des Abbaus der NP erreicht werden. Dies bietet die Voraussetzung zur zielgerichteten Entwicklung von p. o. verabreichten Polymer-NP als Arzneistoffträgersysteme.

4.3 *In vivo* Verhalten der Polymernanopartikel im Mausmodell mittels multispektraler Fluoreszenzbildgebung

Um das *in vitro* beobachtete Verhalten genauer zu evaluieren, wurden die PLGA-NP *in vivo* im Mausmodell untersucht. Hierbei sollte eine einfach anzuwendende nicht invasive Verlaufskontrolle der Proben mit der Möglichkeit des Abbaus der Partikel unter physiologischen Bedingungen mit anschließender *ex vivo* Untersuchung erfolgen. Für die folgenden Experimente wurden die Proben PLGA-NP PVA I 0,1 % sowie PEG-PLGA-NP aufgrund der häufigen Anwendung dieser Stabilisierungen bei *in vivo* p.o. applizierten PLGA-NP [80, 82, 89, 107, 113, 202] und des unterschiedlichen Verhaltens *in vitro*, im Besonderen im FeSSIF, ausgewählt.

Hierzu wurden von beiden Partikelarten fluoreszenzmarkierte Partikel mit inkorporierten DFR hergestellt. Die Partikel wurden unter der Annahme betrachtet, dass bei einem erhöhten Verdau der PVA-stabilisierten Partikel eine größere Menge an Farbstoff freigesetzt wird. Um die Aufnahme des Farbstoffes DFR in den systemischen Kreislauf zu verifizieren, wurde eine DFR-Lösung (DFR HS-15) hergestellt und ebenfalls p.o. verabreicht. Vielfach wird in der Literatur auch eine Partikelaufnahme beschrieben [7–9], die gleichfalls in der Studie eingehender betrachtet werden sollte, um mögliche Signale im systemischen Kreislauf einer Farbstoff- oder Partikelaufnahme zuordnen zu können. Hierfür wurde die Probe PLGA-NP PVA über eine schwer spaltbare Amidbindung mit dem Farbstoff DY 780 kovalent gelabelt, so dass bei möglichen Messsignalen im systemischen Kreislauf von einer Aufnahme von intakten Partikeln ausgegangen werden kann. Eine Partikelaufnahme aus dem GIT [82, 84] bzw. nach der i.v.-Gabe [81, 147] wird meist im Zusammenhang mit einem deutlichen Signal in den Ausscheidungsorganen Leber und Niere beschrieben. Zur Verifizierung wurde die kovalent gelabelte Probe zusätzlich i.v. verabreicht. Die hergestellten Proben sind als Übersicht in Tab. 20 aufgelistet.

Tab. 20 Übersicht über die *in vivo* Proben und deren Applikationsweise.

Formulierung	Stabilisator	Farbstoff	Applikation
PLGA-NP DFR	PVA I 0,1 %	DFR inkorporiert	p. o.
PLGA-NP 780	PVA I 0,1 %	DY-780 gelabelt	p. o.
PLGA-NP 780 i. v.	PVA I 0,1 %	DY-780 gelabelt	i. v.
PEG-PLGA-NP DFR	-	DFR inkorporiert	p. o.
DFR-HS 15	Kolliphor® HS 15	DFR solubilisiert	p. o.

4.3.1 *In vitro* Verhalten der Polymernanopartikel im simulierten Magensaft

Voraussetzung für eine eingehende Betrachtung der Partikel nach p. o. Gabe ist eine ausreichende gastrische Stabilität. Zur Einschätzung des Verhaltens im Magen *in vivo* wurden die Proben PLGA-NP PVA I 0,1 % und PEG-PLGA-NP zusätzlich im SGF untersucht.

Im Gegensatz zu dem *in vitro* beobachteten Verdau im FaSSIF und FeSSIF war hier eine Größenmessung aufgrund des klaren Mediums möglich. Pepsin ist in verdünnter Salzsäure löslich, Pankreatin hingegen bildet in den verwendeten Medien eine trübe Suspension.

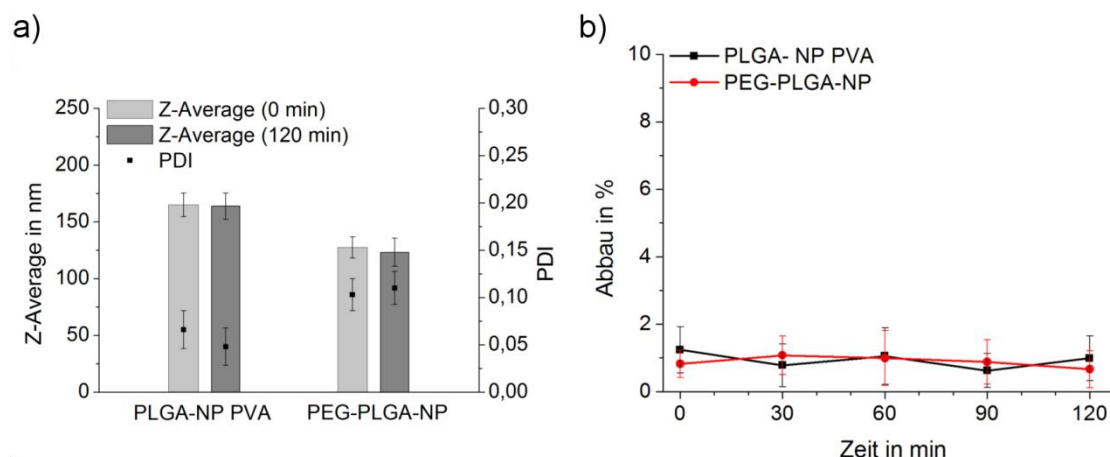


Abb. 38 Untersuchung der PLGA-NP PVA I 0,1 % und PEG-PLGA-NP in SGF über 120 min. a) Größenmessung mit der PCS, b) Abbau der NP mit dem L-Lactat-NW.

Zur Überprüfung wurde das reine Medium mit Pepsin unverdünnt mit der PCS untersucht und es wurden keine Partikel detektiert. Die NP wurden direkt nach der Zugabe des Mediums (0 min) und nach 120 min vermessen (Abb. 38a). Über diesen Zeitraum erfolgte bei den Proben keine Größenveränderung. Die Detektion des Abbaus mittels L-Lactat-NW wurde im 30-minütigen Abstand über denselben Zeitraum durchgeführt (Abb. 38b). Nach der Zugabe von SGF wurde anfänglich ein L-Lactat Wert bei beiden Proben detektiert, der einem 1 %igen Abbau entspricht und wahrscheinlich durch vorherige Hydrolyse verursacht wurde. Dieser Wert stieg über 120 min nicht an. Die Ergebnisse zeigen schlussfolgernd keinen Abbau und keine Größenveränderung im SGF. Die Stabilität von Polymer-NP gegenüber simulierten Magensäften wurde bereits in der Literatur mehrfach erwähnt. Landry *et al.* stellten keinen Abbau von PLA-NP über 8 h mit einem L-Lactat-NW sowie mithilfe von Größenauschluss-Chromatographie fest [104] und ebenso konnten Tobio *et al.* bei der Untersuchung von PLA-NP und PEG-PLA-NP mittels des L-Lactat-NW im Vergleich zum SIF keinen Abbau nachweisen [107]. Garinot *et al.* zeigten auch die Stabilität von PEG-PLGA-NP gegenüber Salzsäure (0,1 N) hinsichtlich Abbau und Größenänderung [90]. Die vorliegenden Ergebnisse befinden sich daher im Einklang mit vorherigen Beobachtungen in der Literatur und belegen die gastrische Stabilität der PLGA-NP und PEG-PLGA-NP gegenüber niedrigen pH-Werten und Pepsin.

4.3.2 Charakterisierung der *in vivo* angewendeten Proben

Im Vorfeld der Versuche wurden die Emissionsspektren der Farbstoffe DFR sowie DY-780 und der hergestellten Proben mit dem Fluoreszenzmikroskop aufgenommen (Abb. 39).

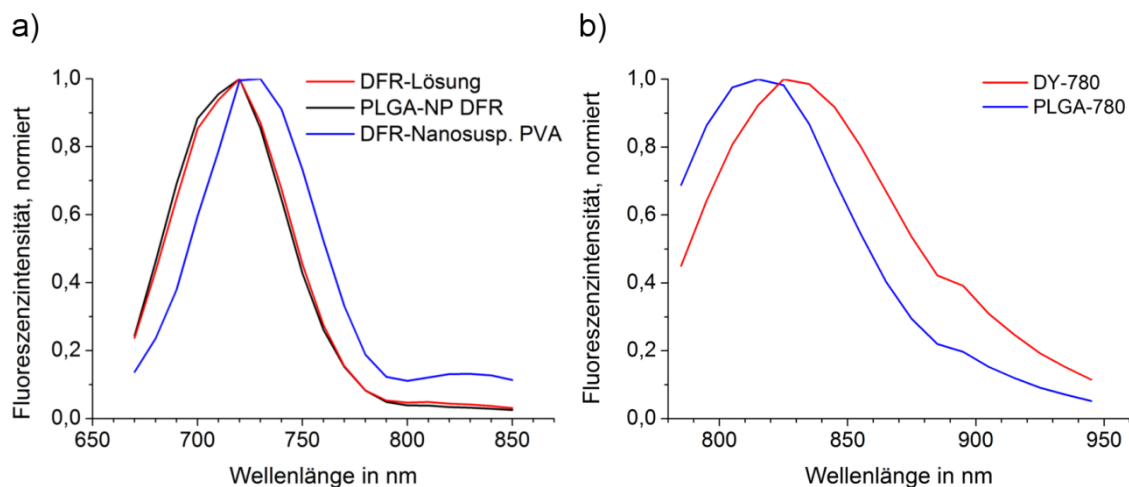


Abb. 39 Aufgenommene Spektren mit dem Fluoreszenzmikroskop. a) Vergleich der Spektren der Formulierungen PLGA-NP DFR (schwarz), einer DFR-Nanosuspension mit PVA (blau) sowie einer DFR-Lösung in Ethanol (rot), aufgenommen im roten Spektralbereich. b) Vergleich der Spektren von der Farbstofflösung von DY-780 (rot) und dem gelabelten PLGA mit DY-780 (blau) in Dichlormethan, aufgenommen im NIR-Bereich.

Es ist zu erkennen, dass der Farbstoff DFR im gelösten Zustand in Ethanol den gleichen spektralen Verlauf wie in den Partikeln PLGA-NP DFR aufweist (Abb. 39a). Eine separate Farbstoffzubereitung (gleiche Herstellungsschritte wie bei den NP) wurde nur mit DFR (ohne Polymer) in PVA Lösung hergestellt (DFR Nanosusp. PVA). Die Größen-analyse in der PCS zeigte bei dieser Zubereitung messbare Partikel (Z-Average: 89,6 nm; PDI 0,029), so dass hierbei von einer Nanosuspension ausgegangen werden kann. Durch die Verschiebung des Spektrums des Farbstoffes im Suspensionszustand und des vergleichbaren Spektralverlaufes der Farbstofflösung und der PLGA-NP DFR kann dementsprechend von dem Lösungszustand des Farbstoffes in den Partikeln ausgegangen werden.

In weiteren Vorversuchen wurde mittels Zentrifugation an Ultrafiltrationsmembranen eine vollständige Partikelabtrennung der Formulierung PLGA-NP DFR erreicht, welche durch Vermessen des Filtrates mit der PCS und NTA überprüft wurde. Das erhaltene Filtrat wies keine messbare Fluoreszenz auf, was für eine hohe Inkorporationsrate des Farbstoffes DFR in die PLGA-NP DFR spricht.

Die erfolgreiche kovalente Markierung des PLGA mit dem Farbstoff DY-780 konnte, wie auch in der Literatur angegeben [203, 204], durch eine Verschiebung des Emissionsmaximums des gelabelten Polymers (PLGA-780) im Vergleich zu dem des freien Farbstoffes (DY-780) in Dichlormethan gezeigt werden (Abb. 39b).

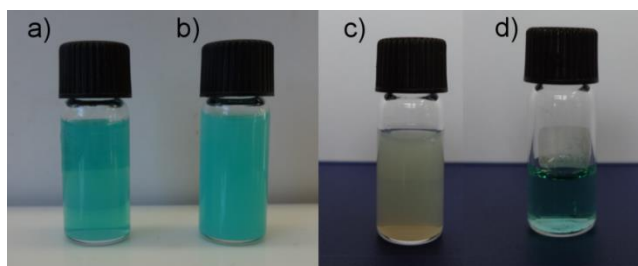
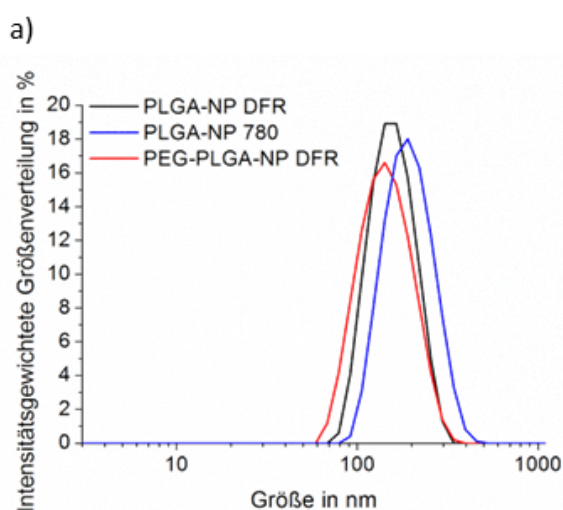
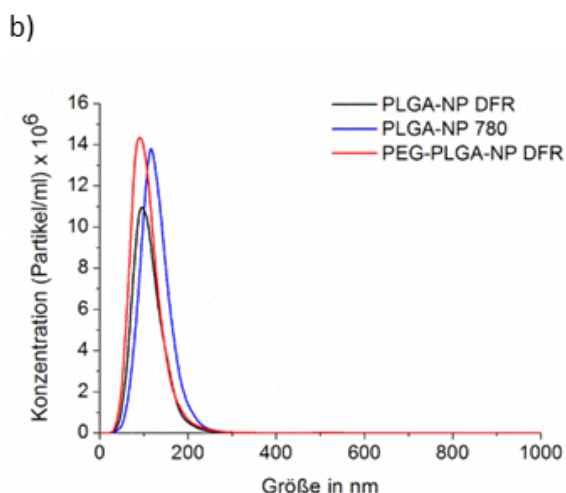


Abb. 40 Fotografische Aufnahmen der Vials mit den *in vivo* applizierten Proben. a) PEG-PLGA-NP DFR b) PLGA-NP DFR c) PLGA-NP 780 d) DFR-HS 15.

Die Inkorporierung von DFR verleiht den PLGA-Proben ein blaues, opaleszentes Erscheinungsbild, die Lösung hingegen ist transparent und ebenfalls von blauer Färbung (Abb. 40). Die Probe PLGA-NP 780 ist opaleszent und besitzt eine grünlische Färbung.



Probe	Z-Average in nm	PDI
PLGA-NP DFR	152,3	0,046
PLGA-NP 780	178,9	0,058
PEG-PLGA-NP DFR	135	0,088



Probe	Mittelwert in nm	Modus in nm
PLGA-NP DFR	110,7	95,4
PLGA-NP 780	130,9	118,3
PEG-PLGA-NP DFR	106,6	90,6

Abb. 41 Größenverteilung der p.o. applizierten Formulierungen PLGA-NP DFR, PLGA-NP 780 und PEG-PLGA-NP DFR, gemessen mit a) PCS und b) NTA. Dargestellt sind jeweils die repräsentativen Werte der Probe 1.

Es wurden jeweils 2 Proben von jeder Formulierung hergestellt, die für die Tierversuche verwendet wurden. Bei der Vermessung der Lösung DFR-HS 15 mit der PCS und NTA wurden mit beiden Methoden keine Partikel festgestellt, so dass von einer ausreichenden

Solubilisierung des DFR durch den Emulgator ausgegangen werden kann. Durch die Solubilisierung sollte eine erhöhte Aufnahme des DFR aus dem GIT erreicht werden.

Die Ergebnisse der Größenanalyse der p. o. applizierten Partikel sind in Abb. 41 dargestellt. Fluoreszierende Partikel können unter Umständen Einfluss auf das Messergebnis der PCS haben, welches sich in einem erhöhten Basislinienrauschen im Korrelogramm zeigt [205]. Die Bewertung des Einflusses des Basislinienrauschens kann mithilfe des Intercept-Wertes getroffen werden, welcher für aussagekräftige Messungen über 0,8 liegen sollte [205]. Bei den Partikelmessungen wurde daher stets auf einen ausreichenden Intercept-Wert >0,8 geachtet. Die Fluoreszenzmarkierungen hatten in den verwendeten Konzentrationen keine Auswirkungen auf die PCS Messungen. Im Vergleich zu den nicht fluoreszenzmarkierten Proben weisen die DFR inkorporierten NP einen vergleichbaren Z-Average (± 15 nm) auf. Wobei die DFR-Proben geringere und die kovalent gelabelten Proben erhöhte Werte zu den nicht fluoreszenzmarkierten Partikeln aufweisen. Die PDI der vermessenen Proben liegen unterhalb von 0,1, welche enge Größenverteilungen anzeigen.

Diese werden auch durch die Messungen mit der NTA bestätigt. Die inkorporierten Proben weisen bei den Mittelwerten, bestimmt mit der NTA, im Vergleich zu den nicht fluoreszenzmarkierten Partikeln nur geringfügige Veränderungen auf. Bei den vermessenen Mittelwerten zeigen die gelabelten Partikel ebenfalls einen höheren Wert. Im Vergleich der Mittelwerte der NTA und den Z-Averages der PCS treten erneut Differenzen auf 4.2.1). Die Spanne der mit der NTA vermessenen Proben (106-130 nm) ist geringer als bei den mit der PCS vermessenen Proben (135-178 nm).

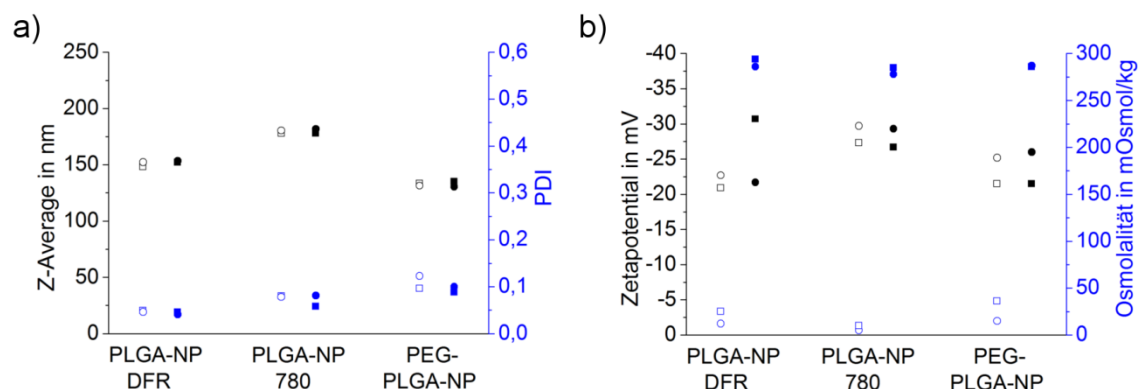


Abb. 42 Änderung der Parameter (Z-Average, PDI, ZP und Osmolalität) der p. o. applizierten Proben PLGA-NP DFR, PLGA-NP 780 und PEG-PLGA-NP DFR im Zusammenhang mit der Einstellung der physiologischen Werte der Osmolalität. Es wurden jeweils 2 Proben hergestellt (1. Probe: Quadrat, 2. Probe: Kreis). Offene Symbole: vor Einstellung der Osmolalität; gefüllte Symbole: nach der Einstellung der Osmolalität.

Vor der Applikation wurde bei allen Proben durch Zusatz von Glukosemonohydrat die Osmolalität auf 286 mOsmol/kg (± 8 mOsmol/kg) angehoben. Zusätzlich wurden die Auswirkungen der Angleichung auf das ZP, den Z-Average und den PDI überprüft (Abb. 42). Die gemessenen ZP der p. o. applizierten Proben (PLGA-NP DFR, PLGA-NP 780,

PEG-PLGA-NP DFR) liegen im negativen Bereich von -21 bis -30 mV und weisen jeweils stärker negative Werte als die nicht fluoreszenzmarkierten Partikel auf. Die pH-Werte der p. o. applizierten Formulierungen liegen zwischen pH 4,9-5,9. Die Angleichungen an die physiologischen Bedingungen hatten keine Auswirkungen auf die Partikelgröße und dessen Verteilung sowie auf das ZP.

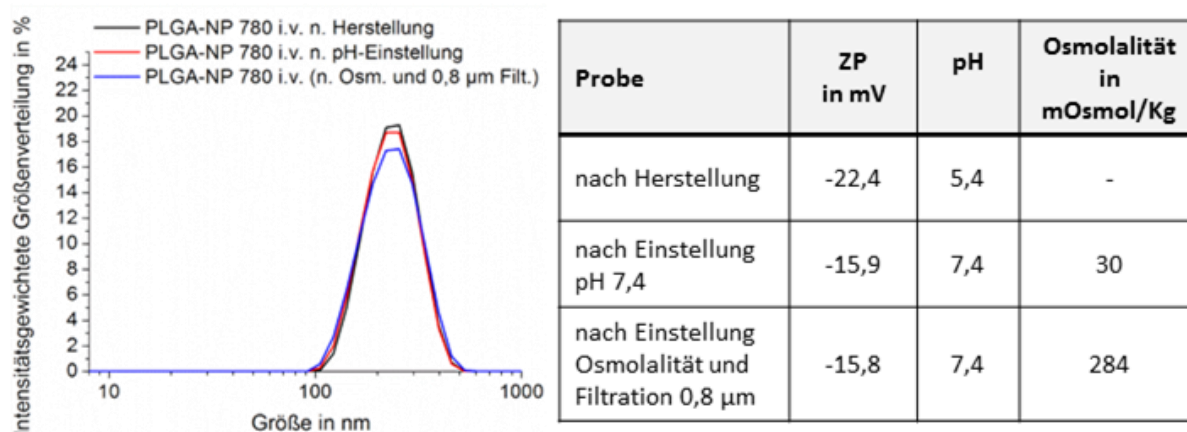


Abb. 43 Größenverteilung, gemessen mit der PCS, sowie charakterisierte Werte (ZP, pH-Wert und Osmolalität) der i. v. applizierten Probe PLGA-NP 780 i.v.. Dargestellt sind beispielhaft die Werte für die erste Probe. Die zweite Probe wies vergleichbare Werte auf.

Bei den i. v. applizierten Proben (PLGA-NP 780 i.v.) wurde zusätzlich der pH-Wert auf den physiologischen Wert von 7,4 eingestellt. Weiterhin wurden diese Proben vor der i. v. Anwendung durch einen 0,8 µm Filter gegeben, um mögliche Verunreinigungen im Mikrometerbereich unter möglichst geringem Einfluss auf die Größenverteilung der Partikel abzutrennen. Durch die Einstellung der physiologischen Werte veränderte sich nur das ZP geringfügig. Auf die Größenverteilung waren keine Auswirkungen festzustellen (Abb. 43).

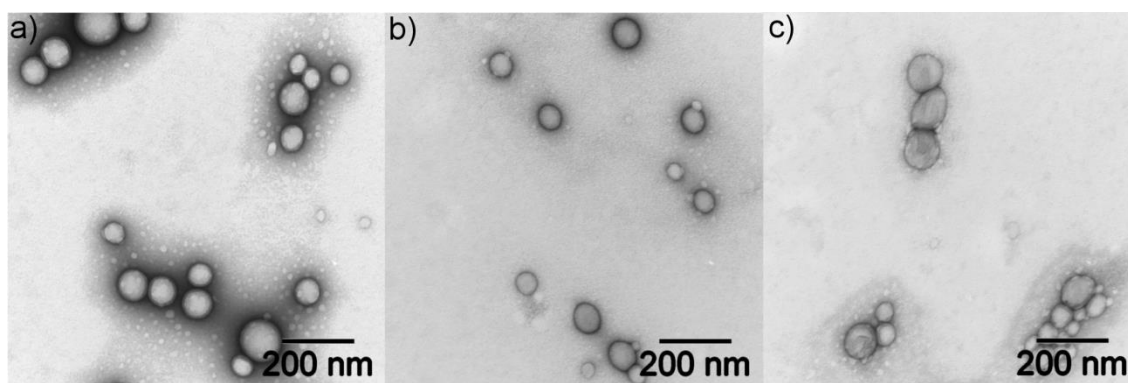


Abb. 44 Elektronenmikroskopische Aufnahmen. a) PLGA-NP DFR b) PLGA-NP 780 c) PEG-PLGA-NP DFR.

Die mittels TEM aufgenommenen Bilder zeigen die runde Form der hergestellten NP (Abb. 44). Das Erscheinungsbild und die Form der Partikel werden durch die Inkorporierung des Farbstoffes DFR oder durch die Markierung mit DY-780 nicht beeinflusst und die Proben sind mit den nicht fluoreszenzmarkierten Partikeln vergleichbar.

4.3.3 Versuche zur Evaluierung der Tiermodellparameter und Auswertung

In Abb. 45 sind die Spektren der *in vivo* applizierten Proben dargestellt, die mittels des Maestro™ Imagers aufgenommen worden sind. Die Proben PLGA-NP DFR, PEG-PLGA-NP DFR sowie die Lösung DFR-HS 15 weisen alle denselben Verlauf sowie ein Emissionsmaximum bei 730 nm in den Tieren auf. Das Spektrum der Probe PLGA-NP 780 liegt erwartungsgemäß im NIR-Bereich mit einem Maximum von 830 nm.

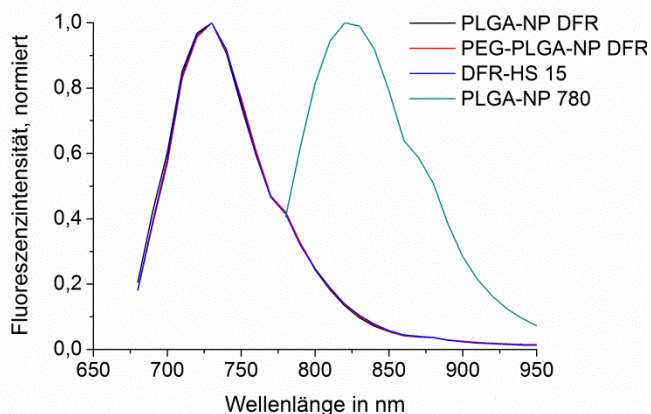


Abb. 45 *In vivo* Spektrenverlauf der p.o. applizierten Proben PLGA-NP DFR, PEG-PLGA-NP DFR, DFR-HS 15 und PLGA-NP 780 in den Versuchstieren. Die Spektren wurden getrennt nach jeweiligem Spektralbereich (rot und NIR) mit dem Maestro™ Imager aufgenommen.

Ziel der Versuche war die Entwicklung eines Tiermodells für die nicht invasive Verlaufskontrolle der NP und die Durchführung von Studien zu den optimierten Zeitpunkten und der Menge der zu verabreichenden NP. Diese sollten an das Magenvolumen der Mäuse angepasst sein, welches maximal 1-1,5 ml [109] entspricht. Für die Verlaufskontrolle der Partikel wurde jeweils die gesamte Maus in ventraler Lage mittels msFI betrachtet. Die Versuche ergaben ein ausreichend nachvollziehbares Fluoreszenzsignal bei einer Einmalgabe der NP von 2 mg Polymer mit einem entsprechenden Farbstoffgehalt von 10 µg (= 200 µl Partikelsuspension) bei den DFR-Proben. Analog wurde ebenfalls die gleiche Menge an gelabelten PLGA-NP 780 eingesetzt. Durch die Schlündelung der Tiere sollte die Applikation der gewünschten Menge an Formulierung sowie eine Umgehung der linguale Lipase der Tiere [14, 206] sichergestellt werden. Vorversuche erfolgten über einen Zeitraum von 24 h. Nach 12 h war in den Tieren nur noch eine geringe und nach 24 h keine Fluoreszenz mehr detektierbar. Nach 6 bzw. 12 h konnte ein Fluoreszenzsignal im Kot dargestellt werden. Diese Angaben können auch durch die physiologischen Werte in der Literatur belegt werden. Nach einer Körnermahlzeit erscheint diese nach 3-5 h im Kot [110]. Unter Umständen kann diese erst nach einem Tag beendet sein, wobei die Bestimmung des Endzeitpunktes aufgrund der Kophrophagie der Mäuse erschwert wird [110]. Der Untersuchungszeitraum wurde daher auf maximal 8 h begrenzt.

Tab. 21 Auflistung der verabreichten Proben und Anzahl der untersuchten Tiere sowie Entnahmezeitpunkte der Tiere aus der Studie.

Formulierung	untersuchte Entnahmezeitpunkte	Anzahl der Tiere	Spektralbereich
PLGA-NP DFR (p. o.)	4 und 8 h	6 (je 3 pro Zeitpunkt)	rot
PLGA-NP 780 (p. o.)	4 und 8 h	6 (je 3 pro Zeitpunkt)	NIR
PLGA-NP 780 (i. v.)	24 h	3	NIR
PEG-PLGA-NP DFR (p. o.)	4 und 8 h	6 (je 3 pro Zeitpunkt)	rot
DFR-HS 15 (p. o.)	4 h	3	rot
Unbehandelte Mäuse	sofort	3	rot und NIR

Eine Übersicht über die Formulierungen sowie angewendeten Parameter ist in Tab. 21 aufgelistet. Die Bildaufnahmezeiten wurden verteilt über den Anwendungszeitraum wie folgt festgelegt:

- p. o. bei 4 h Beobachtungszeitraum: nach Applikation; 1 h; 3 h; 4 h
- p. o. bei 8 h Beobachtungszeitraum: nach Applikation; 1 h; 3 h; 5 h, 8 h
- i. v. bei 24 h Beobachtungszeitraum: nach Applikation; 24 h.

Die Analyse der DFR-Proben *in vivo* erfolgte mittels Vergleich der Spektren von PLGA-NP DFR sowie der Autofluoreszenz der Tiere und des Hintergrundes.

Im NIR-Bereich war aufgrund der Ähnlichkeit der Spektren sowie der Signalintensität der Partikel mit der Autofluoreszenz der Mäuse eine angemessene Trennung der aufgenommenen Werte nicht möglich. Die Analyse der Proben erfolgte mit den Spektren der PLGA-NP 780 und des Hintergrundes. Zur Vermeidung von Fehlinterpretationen wurde jeweils eine nicht behandelte Maus zur Analyse in der *Compare Image* Funktion der Software hinzugezogen.

In Abb. 46 ist der Vergleich eines *in vivo* Bildes von PLGA-NP 780 und einer unbehandelten Maus dargestellt. Im Vergleich zu der Formulierung PLGA-NP 780 wurde bei den Referenztieren kein Fluoreszenzsignal detektiert. Die Signalintensität der Probe war ausreichend groß, um die erhaltenen Signale den Partikeln zuordnen zu können.

Diese Probleme entstanden ebenso bei der Analyse der Organe (GIT, Leber, Niere) bei PLGA-NP 780 im NIR-Spektralbereich und bei dem GIT der DFR-Proben im roten Spektralbereich aufgrund des vergleichbaren Spektrenverlaufs des verwendeten Futters und der Proben. Bei der Analyse dieser Proben wurde die gleiche Verfahrensweise der simultanen Referenzanalyse angewendet.

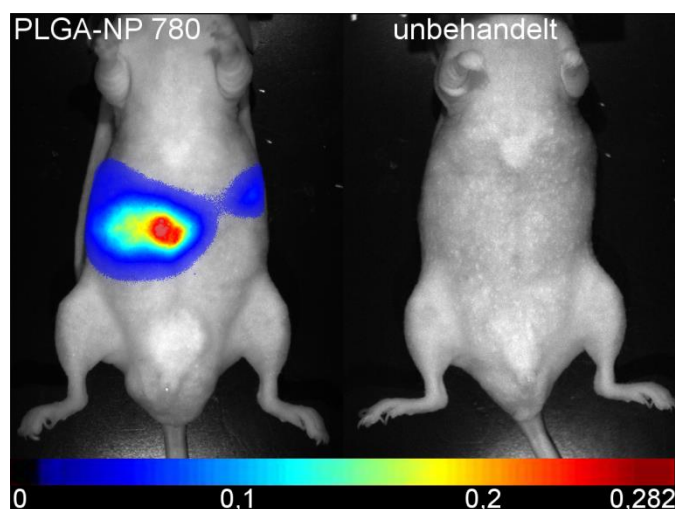


Abb. 46 *In vivo* msFI mit dem Maestro™ Imager der Formulierung PLGA-NP 780 und einer unbehandelten Maus. Die spezielle Auswertung der PLGA-NP 780 Versuchstiere erfolgte stets im Vergleich zur unbehandelten Maus in der *Compare Image* Funktion der Maestro™ Software.

4.3.4 *In vivo* Verlaufskontrolle der p. o. und i. v. applizierten Nanopartikel

In Abb. 47 ist die Probe PLGA-NP DFR kurz nach der Applikation der Partikelsuspension im Vergleich zur anatomischen Lage des GIT dargestellt. Der Magen der Versuchstiere liegt in der linken oberen Bauchseite. Anschließend folgt der Dünndarm (etwa 20 cm), wobei dieser im rechten Teil der Bauchregion in mehreren Schlingen verläuft [109] und das verhältnismäßig große Caecum mit einer Länge von etwa 3 cm sowie das Colon mit etwa 12 cm [110]. Die Partikel zeigen schon kurz nach der Gabe ein deutliches Signal im Magen und in den oberen Dünndarmabschnitten. Im Ileum, Caecum und Colon ist noch kein Signal erkennbar.

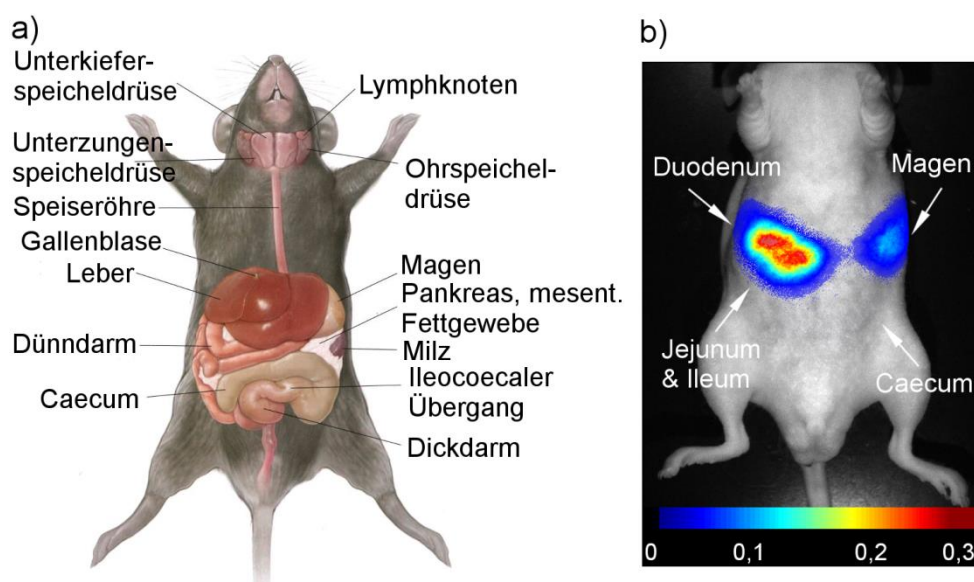


Abb. 47 a) Anatomische Lage der zum GIT gehörenden Organe der Maus im Vergleich zu b) den *in vivo* msFI-Aufnahmen mit dem Maestro™ Imager kurz nach der Applikation der Formulierung PLGA-NP DFR. Abbildung a) ist modifiziert nach [108].

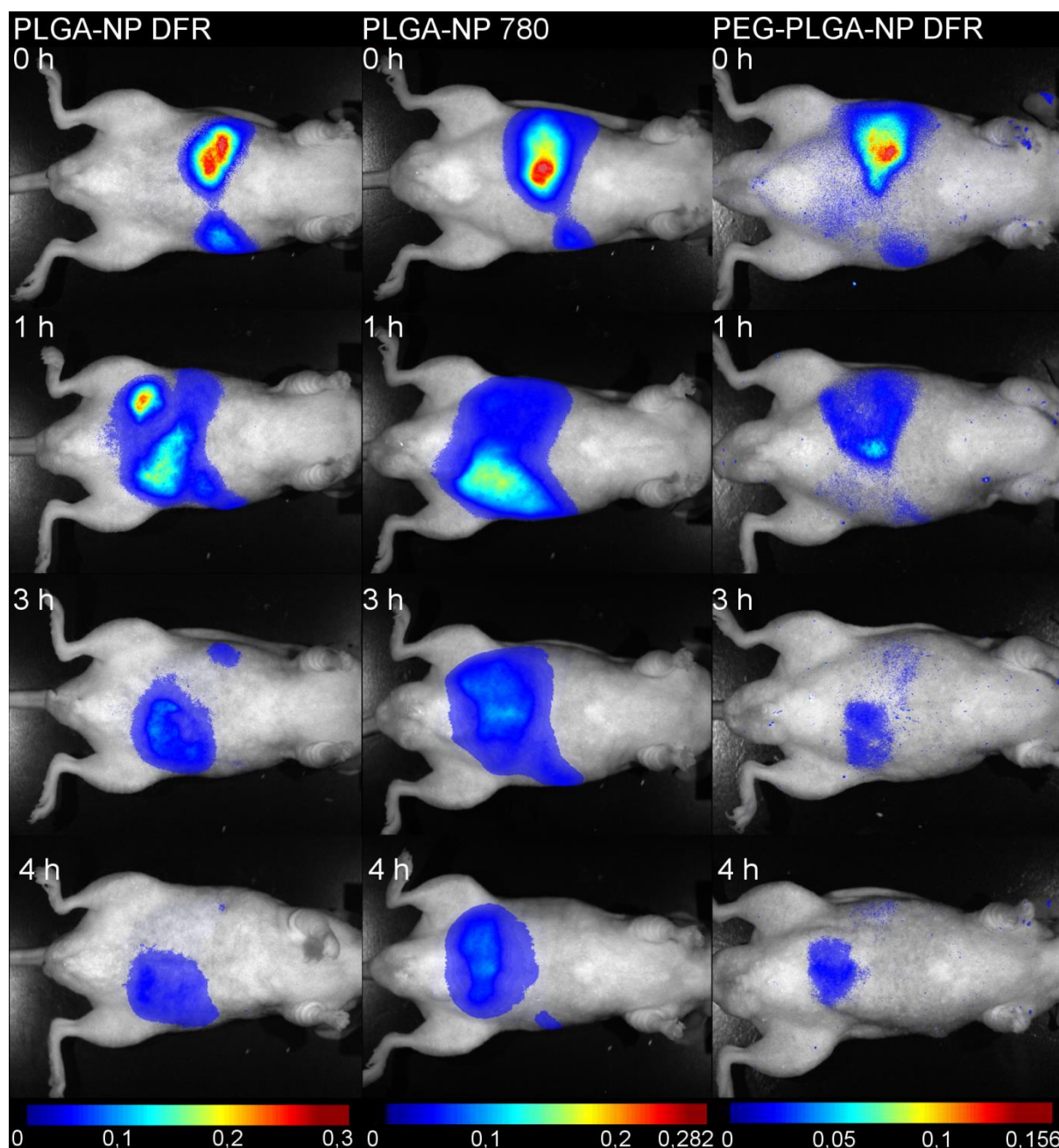


Abb. 48 *In vivo* msFI mit dem Maestro™ Imager der p.o. verabreichten Proben PLGA-NP DFR, PLGA-NP 780 und PEG-PLGA-NP DFR über 4 h Beobachtungszeit. Es wurde jeweils ein Tier aus der Versuchsgruppe ausgewählt und dargestellt.

Als Übersichtsbilder sind in den Abb. 48 und Abb. 49 der Verlauf der Partikel über die Zeiträume von 4 h und 8 h dargestellt. Bei den Formulierungen ist ein Auftreten der Signale im Magen und im oberen Dünndarm kurz nach der Applikation erkennbar. Hierdurch wird eine schnelle Entleerung des Magens gezeigt, welche auch mit 15-30 min nach der Aufnahme des Futters in der Literatur angegeben ist [110]. Nach einer 1 h haben sich die Signale über den Bauchraum verteilt und lassen schlussfolgernd auf einen sehr schnellen Transit der Partikel durch den GIT schließen. Mit zunehmender Beobachtungsdauer nimmt die Intensität der Signale ab und verlagert sich zu den unteren Darmabschnitten im Caecum und Colon.

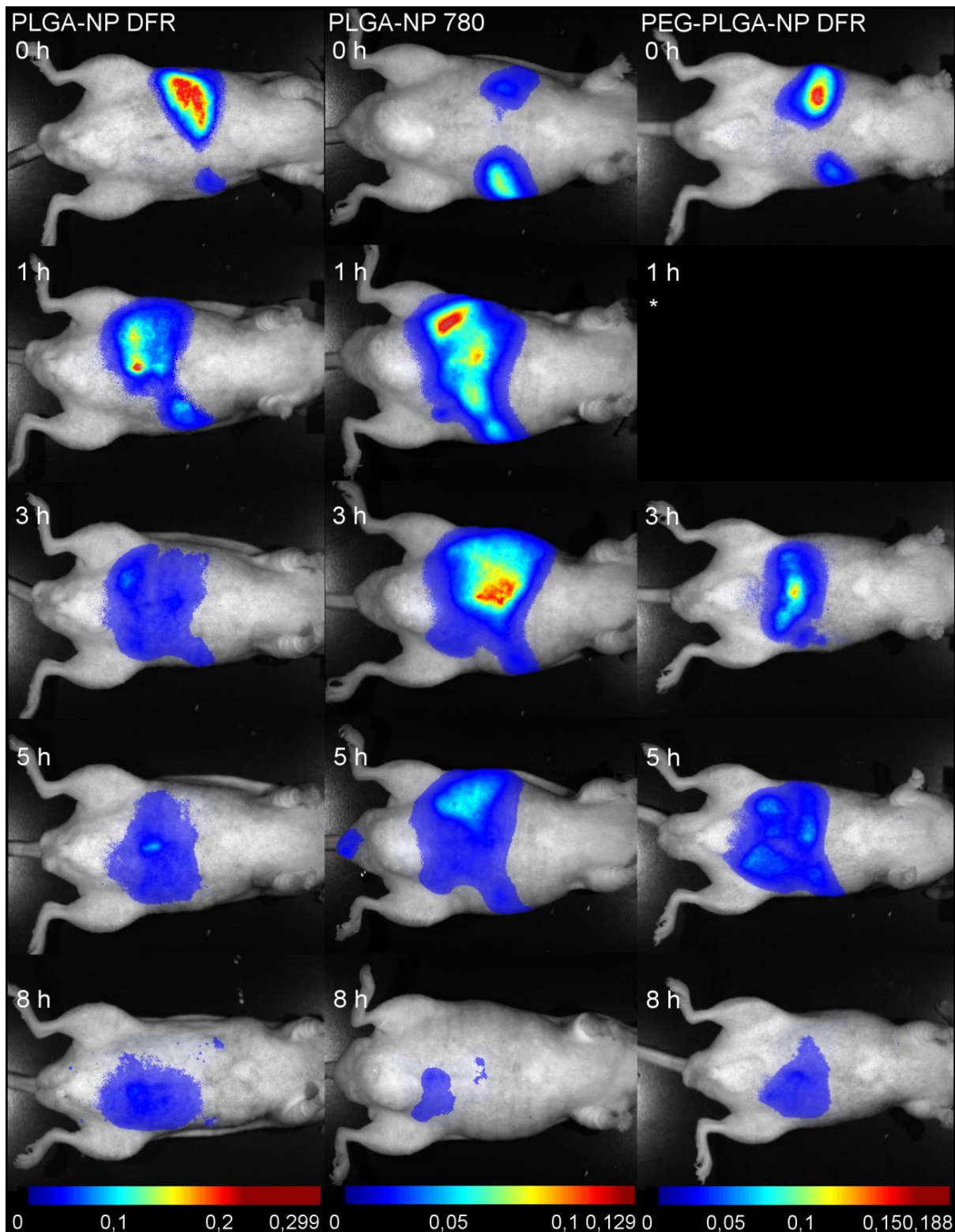


Abb. 49 *In vivo* msFI-Aufnahmen mit den Maestro™ Imager der p.o. verabreichten Proben PLGA-NP DFR, PEG-PLGA-NP DFR und PLGA-NP 780 über 8 h Beobachtungszeit. Es wurde jeweils ein Tier aus der Versuchsgruppe ausgewählt und dargestellt. * Wert wurde nicht aufgenommen.

Im Besonderen wurden nach 3-5 h noch Signale im Magen erhalten, welche auf eine lange Verweildauer der Partikel hindeuten. Durch den Abbau und die Ausscheidung der Partikel ist nach 8 h bei allen Formulierungen nur ein geringes Signal detektierbar. Die Formulierungen

PLGA-NP DFR bzw. 780 und PEG-PLGA-NP DFR weisen ein vergleichbares Verhalten und ähnliche Transit-Zeit-Profile im GIT *in vivo* auf.

Die Formulierung PLGA-NP 780 wurde zusätzlich i. v. verabreicht und über 24 h beobachtet (Abb. 50). Nach der Applikation ist eine schnelle Verteilung der Partikel im gesamten Körperkreislauf der Versuchstiere zu erkennen. Bei der ventralen Lage des Tieres zeigt sich die Anreicherung der Partikel in der Leber. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgt im Zusammenhang mit der Betrachtung der *ex vivo* Untersuchungen in dem Kapitel 4.3.5.

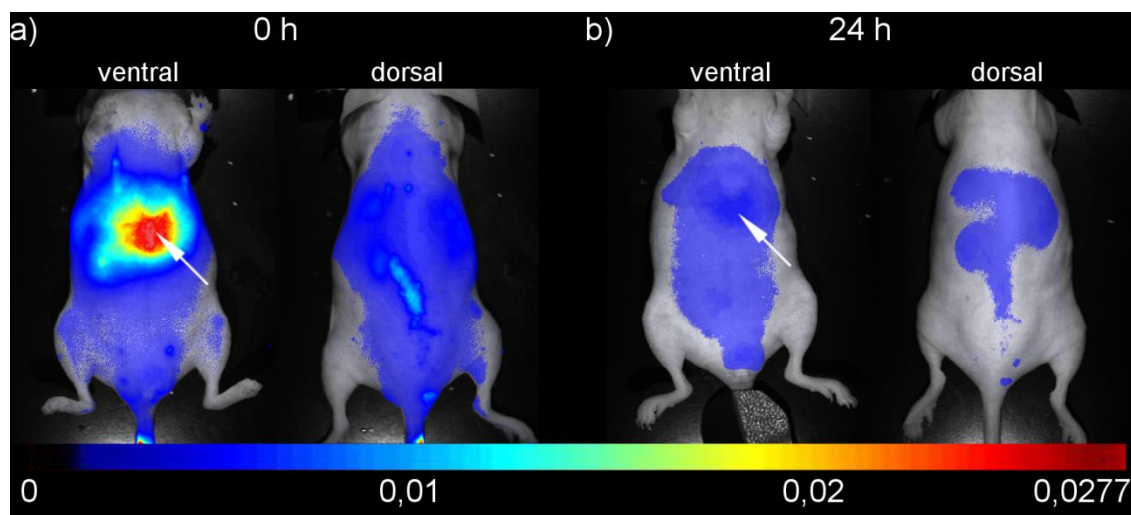


Abb. 50 *In vivo* msFI-Aufnahmen der i. v. verabreichten PLGA-NP 780 a) nach der Applikation und b) nach 24 h in dorsaler und ventraler Lage, aufgenommen mit dem Maestro™ Imager. Der Pfeil markiert die Lage der Leber. Es wurde jeweils ein Tier aus der Versuchsgruppe ausgewählt und dargestellt. Die Einstichstelle im Schwanz des Versuchstieres wurde bei Bedarf abgedeckt.

Durch das nicht invasive msFI konnte der Verlauf der Partikelformulierungen nachvollzogen werden. Ein *in vivo* Modell für Transitstudien von p. o. verabreichten Partikeln mit der Betrachtung des enzymatischen Abbaus ist essentiell, um schon im frühen Entwicklungsstadium der Arzneistoffträgersysteme das Verhalten der Partikel im humanen GIT abschätzen zu können. Bisher wurden zumeist *ex vivo* Modelle verwendet, die eine höhere Anzahl an Versuchstieren pro Studie aufgrund der Kontrolle von den einzelnen Zeitpunkten mit separaten Tieren benötigen [117]. Die Vergleichbarkeit bei diesen Studien ist durch die hohen individuellen Schwankungen bei der GIT Passage erschwert. Weiterhin ist ein häufig genutztes Modell zur Untersuchung der Arzneistoffresorption, Adhäsivität sowie für Transit- und Verteilungsstudien von p. o. applizierten Partikeln das *in situ* Perfusionsmodell [114–118]. Hierbei wird der GIT des narkotisierten Tieres vorsichtig freigelegt, um die intakte Blutzufuhr zu gewährleisten [207]. Das zu untersuchende Darmsegment wird isoliert und unter Zuhilfenahme von Spritzen mit einem Zufluss und Abfluss versehen, so dass die Formulierung direkt in den Darm injiziert werden kann [207].

Je nach Anwendungsziel kann das Teilstück des Darmes oder die Aufnahme in den Blutkreislauf untersucht werden. Zur Unterbindung des enterohepatischen Kreislaufes sowie der Gallensekretion in das untersuchte Darmstück, wird der Gallengang oftmals abgebunden

[208]. Resultierend wird auch bei diesem Modell der Verdauung von Partikeln nicht betrachtet. Bei Langzeitnarkosen sind zusätzlich die Darmbewegungen signifikant reduziert [209]. Durch die Narkose wird der grundlegende elektrische Rhythmus des migrierenden motorischen Komplexes (*migrating myo-electrical complex*, MMC) deutlich verlangsamt [210]. Auch zeigt die Laparotomie als chirurgischer Eingriff an dem Versuchstier eine Hemmung der Darmbewegungen [209]. Als Folge wird der physiologische Verdauvorgang bei dem Perfusionsmodell stark beeinträchtigt. Durch den fehlenden Einfluss der enzymatischen Abbauvorgänge kann es zu Fehleinschätzungen bei den Verteilungs- und Adhäsivitätsstudien kommen. Im Gegensatz zu diesen Methoden bietet das nicht invasive msFI den Vorteil der einfachen Anwendung und Vermeidung chirurgischer Eingriffe. Zur Narkotisierung wird eine inhalative Kurzzeitnarkose für den Zeitraum der Bildaufnahme verwendet, um den Einfluss der Narkose auf die Verdauung so gering wie möglich zu halten. Ein weiterer Vorteil besteht in der Möglichkeit die Formulierung individuenspezifisch über den Versuchszeitraum untersuchen zu können.

Die Möglichkeit der Quantifizierung der fluoreszenzmarkierten Proben *in vivo* ist bei dieser Methode aufgrund der gegebenen Signaltiefe im GIT und der 2D-Darstellung des vorliegenden Maestro™ Imagers nur eingeschränkt möglich. Detailliertere Betrachtungen könnten mithilfe der 3D-Fluoreszenztomographie gekoppelt mit der Mikro-Computertomographie durchgeführt werden, welche durch die verbesserte Darstellung tiefer liegender Fluoreszenzsignale in Kombination mit der anatomischen Darstellung des Versuchstieres die Quantifizierung einzelner spezifischer Regionen erlaubt [119, 211].

In der Studie wurde jedoch das nicht invasive msFI erfolgreich für Verteilungsstudien von PLGA-NP bzw. PEG-PLGA-NP eingesetzt und es konnten mittels des Verfahrens Transit-Zeit-Profile für die Formulierungen über 8 h erstellt werden. Durch das Modell konnte der Verlauf der NP unter Einbeziehung des Verdauens unter physiologischen Bedingungen erfolgen. Detaillierte Betrachtungen der Verteilung der Partikelformulierungen im GIT, in der Leber und der Niere unter besonderer Beachtung des Verdauens werden mit den *ex vivo* Untersuchungen in den folgenden Kapiteln ergänzt.

4.3.5 Ex vivo Untersuchung der Studientiere bei peroral applizierten Polymer-nanopartikeln

Ex vivo Untersuchungen der Lebern und Nieren

Im Weiteren erfolgten *ex vivo* Untersuchungen der Organe Leber und Niere. Im Vergleich zur *in vivo* auftretenden Problematik der Quantifizierung (s. Kapitel 4.3.4) wurde diese bei den isolierten Organen durchgeführt, da der Einfluss der 2D Darstellung des Maestro™ Imagers aufgrund der geringen Schichtdicke der Organe und der homogenen Gewebebeschaffenheit

gering ist. Dadurch konnte eine Bewertung der Fluoreszenzsignale unter Einbeziehung aller Studientiere durchgeführt werden.

Bei der Betrachtung und Analyse der Leber sollte ein möglicher Abbau der Partikel PLGA-NP DFR bzw. PEG-PLGA-NP DFR und somit die Aufnahme des freigewordenen Farbstoffes DFR untersucht werden. Im Gegensatz dazu steht die Aufnahme der intakten Partikel, welche mit der Formulierung der kovalent gelabelten PLGA-NP 780 näher betrachtet werden sollte. Als jeweiliger Positivvergleich wurden die Formulierungen DFR-HS 15 (p. o.) und PLGA-NP 780 (i. v.) herangezogen.

Die Leber nimmt eine zentrale Rolle als Stoffwechselorgan ein, weswegen es in diesem Organ im Besonderen zur Anreicherung vieler körperfremder Stoffe und vor allem von Partikeln kommt. Dies kann mit der Größe der NP begründet werden. Wohingegen die Filtration der Niere auf Partikel <10 nm beschränkt ist, besteht bei der Leber die Möglichkeit der Anreicherung von Partikeln über 100 nm [212]. Aufgrund der Größe der verabreichten NP (Kapitel 4.3.2) ist eine Anreicherung in der Leber wahrscheinlich.

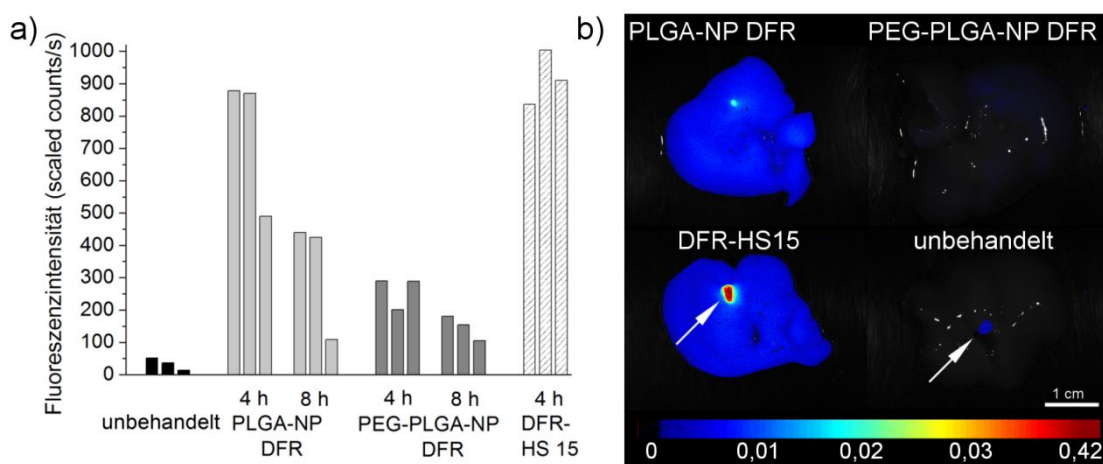


Abb. 51 a) Fluoreszenzwerte der Lebern der Versuchstiere sowie b) repräsentative Fluoreszenzbilder der Lebern nach 4 h nach der p. o. Gabe von den Formulierungen PLGA-NP DFR, PEG-PLGA-NP DFR und DFR-HS 15 im Vergleich zu den unbehandelten Tieren. Die Werte wurden mit dem Maestro™ Imager im roten Spektralbereich gemessen. Der Pfeil markiert die sichtbare Lage der Gallenblasen.

Die Fluoreszenzwerte der Versuchsgruppen sowie repräsentative Fluoreszenzbilder einzelner Versuchstiere der Formulierungen PLGA-NP DFR, PEG-PLGA-NP DFR sowie der Kontrollgruppe DFR-HS 15 im Vergleich zu den unbehandelten Tieren sind in Abb. 51 dargestellt. Bei den unbehandelten Tieren ist im roten Spektralbereich, wie bei Frangioni beschrieben, ein geringes Signal in der Gallenblase detektiert worden [213]. Bei den PLGA-NP DFR sowie bei der Lösung DFR-HS 15 finden sich erhöhte Fluoreszenzwerte in der Leber. Durch die Signalgebung bei der Lösung DFR-HS 15 konnte eine Aufnahme des freien Farbstoffes in die Leber durch den GIT gezeigt werden. Beide Formulierungen erreichen ähnliche Maxima. Die Werte der Lösung könnten theoretisch höhere Werte erreichen, da der vollständige

Abbau der Partikel und infolge dessen die Freisetzung der gleichen Menge an Farbstoff nach den *in vitro* Ergebnissen als unwahrscheinlich gilt. Diese Beobachtung kann mit einer limitierten Absorption des Farbstoffes durch aktive carrier-vermittelte Aufnahme oder mit einer maximal messbaren Fluoreszenzintensität der Leber begründet werden. Zur genaueren Aussage sind weitere Untersuchungen nötig. Im Vergleich zu den PLGA-NP DFR ist bei der Formulierung PEG-PLGA-NP DFR ein um 66 % geringeres Signal detektiert worden, wenn zur Berechnung die jeweiligen Mittelwerte nach 4 h zugrunde gelegt werden. Bei beiden Proben nehmen die Intensitäten von 4 h auf 8 h durch den Abbau des Farbstoffes in der Leber ab.

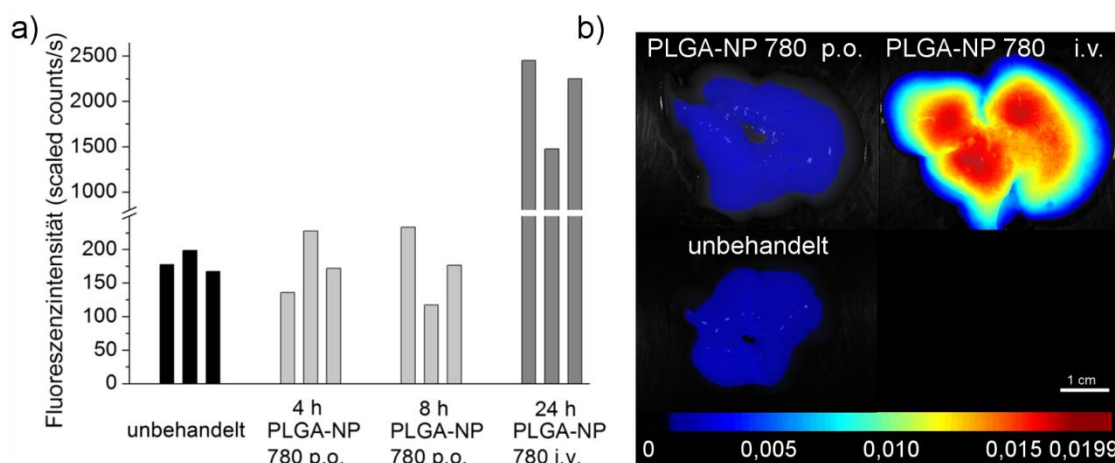


Abb. 52 a) Fluoreszenzwerte der Lebern der Versuchstiere sowie b) repräsentative Fluoreszenzbilder der Lebern von der Formulierung PLGA-NP 780 nach 4 h (p.o.) und 24 h (i.v.) im Vergleich zu den unbehandelten Tieren. Die Werte wurden mit dem Maestro™ Imager im NIR Spektralbereich gemessen.

Die Fluoreszenzwerte und -bilder der Formulierung PLGA-NP 780 nach p.o. und i.v. Gabe sind in Abb. 52 dargestellt. Das Signal in der Leber der Formulierung PLGA-NP 780 p.o. im NIR-Bereich ist auf das ähnliche Spektrum und die Signalintensität der Partikel und des Gewebes zurückzuführen, so dass der Maestro™ Imager auswertungsbedingt hier einen falsch-positiven Wert detektiert. Im Vergleich zu der unbehandelten Leber treten keine erhöhten Fluoreszenzwerte auf. Dies bestätigt die bei Yin *et al.* beschriebene Stabilität der Amidbindung bei der kovalenten Markierung in gastrointestinalen Studien [186] und spricht infolge dessen gegen eine Aufnahme von intakten Partikeln aus dem GIT. Bei der Positivkontrolle der i.v. applizierten Partikel wurde ein stark erhöhtes Signal detektiert und zeigt die Anreicherung der Partikel in der Leber bei Vorhandensein im systemischen Kreislauf.

Die Fluoreszenzwerte der Nieren der DFR-Proben in Abb. 53 zeigen nur ein geringfügig höheres Signal als von den unbehandelten Tieren. Es ist keine sinkende Tendenz zwischen den 4 h und 8 h Werten der Formulierungen PLGA-NP DFR und PEG-PLGA-NP DFR zu erkennen. Die Beobachtungen belegen, dass der Farbstoff DFR nur in einer sehr geringen Menge über die Nieren ausgeschieden wird.

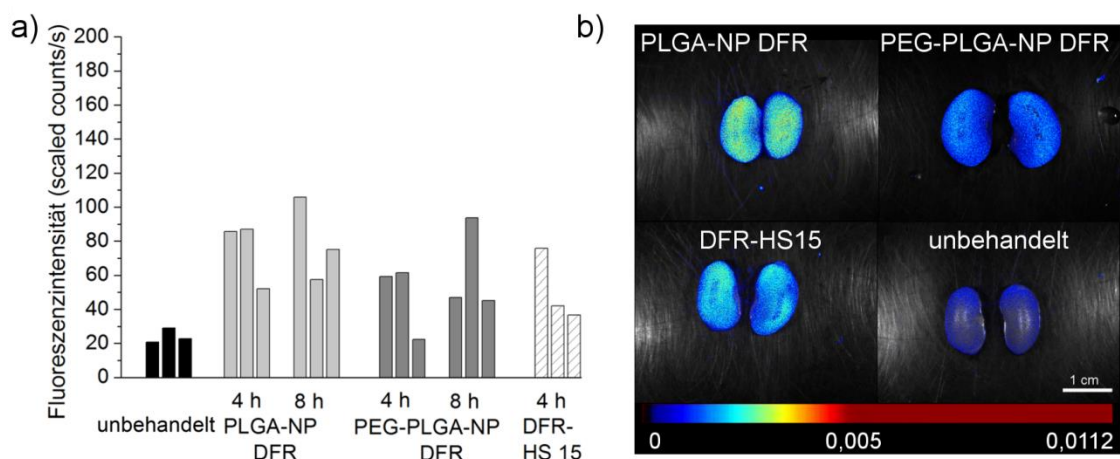


Abb. 53 a) Fluoreszenzwerte der Nieren aller Versuchstiere sowie b) repräsentative Fluoreszenzbilder der Nieren nach 4 h nach der p.o. Gabe von den Formulierungen PLGA-NP DFR, PEG-PLGA-NP DFR und DFR-HS 15 im Vergleich zu den unbehandelten Tieren. Die Werte wurden mit dem Maestro™ Imager im roten Spektralbereich gemessen.

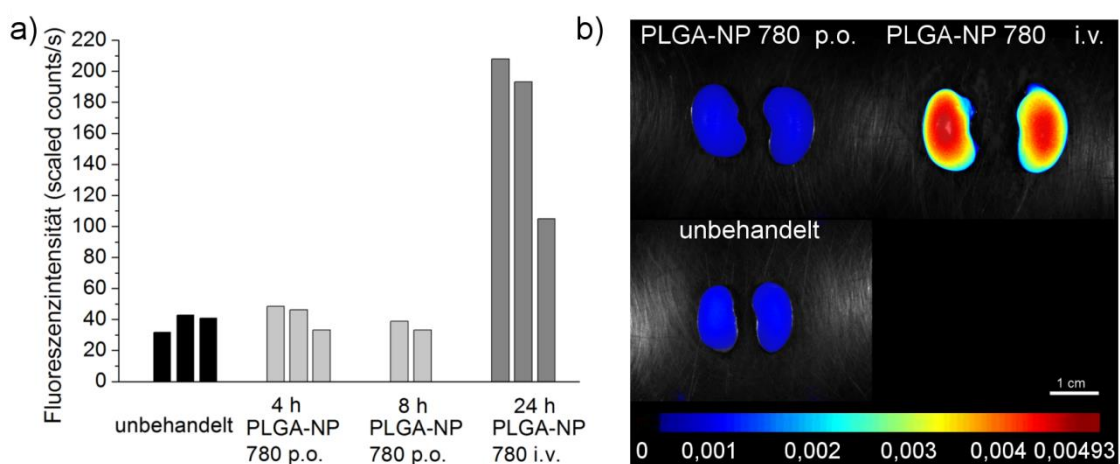


Abb. 54 a) Fluoreszenzwerte der Nieren der Versuchstiere sowie b) repräsentative Fluoreszenzbilder der Nieren von der Formulierung PLGA-NP 780 nach 4 h (p.o.) und 24 h (i.v.) im Vergleich zu den unbehandelten Tieren. Die Werte wurden mit dem Maestro™ Imager im NIR Spektralbereich gemessen. Ein Messwert von PLGA-NP 780 p.o. 8 h wurde nicht aufgenommen.

Bei der Formulierung PLGA-NP 780 p.o. zeigt sich bei den Fluoreszenzwerten und -bildern im Vergleich zu den unbehandelten Tieren kein erhöhtes Signal (Abb. 54). Die i.v. applizierten Partikel (Mittelwert: 168 scaled count/s) weisen im Vergleich zur Leber (Mittelwert: 2056 scaled counts/s) geringfügig erhöhte Fluoreszenzwerte auf, welche somit nur eine geringe Ausscheidung der PLGA-NP über die Niere anzeigen. In der Literatur wird für die i.v. Gabe von Polymer-NP ebenso nur eine geringe Anreicherung in den Nieren gezeigt [84, 183, 214, 215] und bestätigt die Vermutung der Anreicherung und des Abbaus der NP aufgrund der Größe in der Leber.

Zusammenfassend konnte die Farbstofffreisetzung durch den Verdau und infolge dessen die Aufnahme aus dem GIT bei den PLGA-NP DFR und im geringen Maße bei den PEG-PLGA-NP DFR nachgewiesen werden. Eine messbare Partikelaufnahme der PLGA-NP 780 aus dem GIT findet hingegen nicht statt (Tab. 22).

Tab. 22 Zusammenfassung der Lebersignalmessung.

Proben	Markierung	Signal in Leber	Resultat
PLGA-NP DFR p. o.	inkorporiert	ja	Farbstoffaufnahme aus GIT
PLGA-NP 780 p. o.	kovalent	nein	keine Aufnahme der Partikel aus GIT
PEG-PLGA-NP DFR p. o.	inkorporiert	ja (gering)	geringe Farbstoffaufnahme aus GIT
Positivproben			
PLGA-NP 780 i. v.	kovalent	ja	Aufnahme der Partikel aus systemischen Kreislauf
DFR-Lösung p. o.	solubilisiert	ja	Aufnahme des Farbstoffes aus GIT

Ex vivo Analyse des Gastrointestinaltraktes der Versuchstiere

Zur weiteren Analyse und genaueren Bewertung der Anreicherung der Partikel wurde der gesamte GIT der Tiere nach 4 h bzw. 8 h entnommen. Der GIT wurde, wie in Abb. 55a gezeigt, vorbereitet und erneut mittels des Maestro™ Imagers analysiert. Zusammenhängend sind der Magen, die verschiedenen Dünndarmabschnitte, das Caecum sowie anschließend das Colon mit sichtbarer Kotpellettbildung präpariert worden. Hierbei wird auch die deutliche Trennung des Magens in Vor- und Hauptmagen sichtbar (Abb. 55b und c).

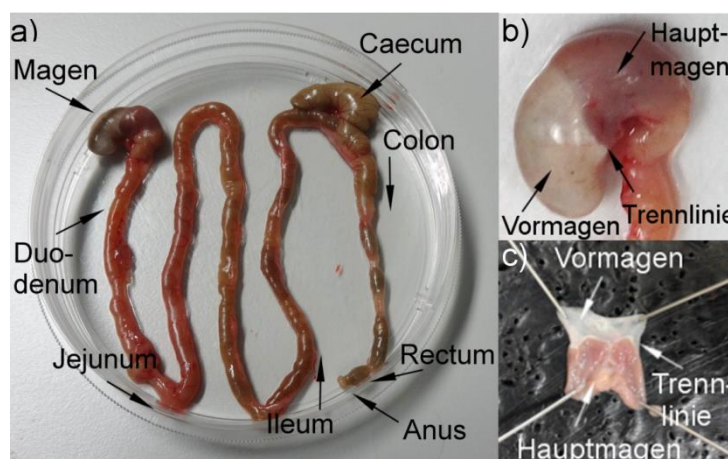


Abb. 55 GIT der Mäuse. a) Darstellung und anatomische Beschriftung des gesamten GIT. b) geschlossener Magen der Mäuse c) aufgespannter Magen auf einer Präparationsplatte.

Die isolierten GIT von je einem Tier pro Versuchsgruppe und Zeitpunkt sind im Vergleich zu den unbehandelten Tieren in Abb. 56 dargestellt. Im roten Spektralbereich (Formulierungen

PLGA-NP DFR und PEG-PLGA-NP DFR) befindet sich bei den unbehandelten Tieren ein schwaches Signal im Magen, welches auf pflanzliche Futterbestandteile mit demselben Spektrenverlauf wie die Partikel zurückzuführen ist. Aufgrund der starken Intensitätsunterschiede, besonders beim Zeitpunkt von 4 h, kann eine Bewertung der Verteilung der Partikelsuspension vorgenommen werden. Im NIR-Spektralbereich (PLGA-NP 780) zeigen die unbehandelten Tiere kein Signal.

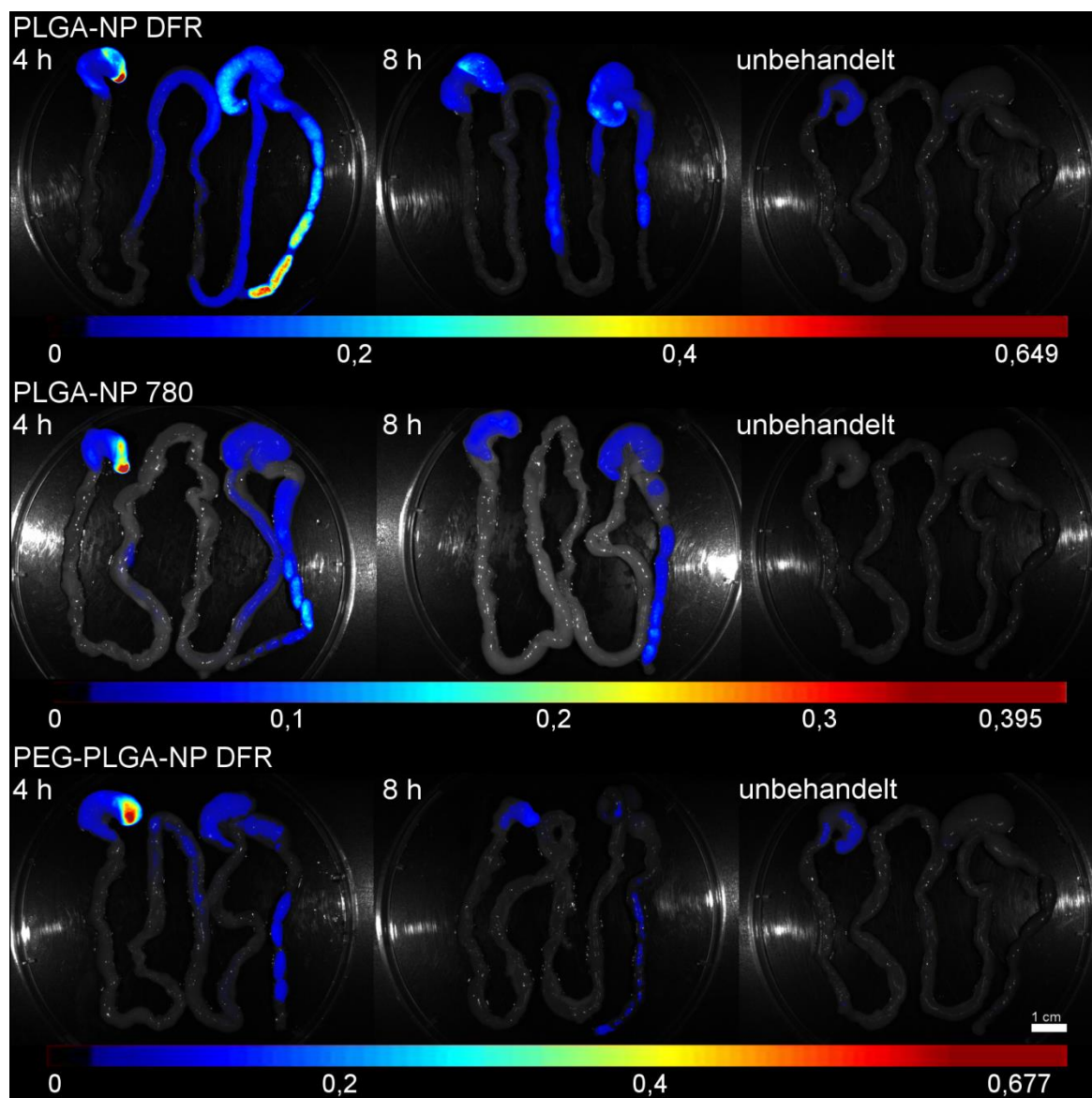


Abb. 56 *Ex vivo* Analyse des GIT mit dem Maestro™ Imager. Dargestellt ist jeweils der GIT der Tiere nach p.o. Gabe der Formulierungen PLGA-NP DFR, PLGA-NP 780 und PEG-PLGA-NP DFR nach 4 h und 8 h. Es wurde jeweils ein repräsentatives Fluoreszenzbild pro Formulierung und Zeitpunkt aus der Versuchsgruppe ausgewählt und dargestellt.

Bei allen Formulierungen ist eine starke Anreicherung im Magen, besonders im Bereich des Vormagens nach 4 h und bei den PLGA-NP DFR und 780 auch nach 8 h zu erkennen, die über die Signalintensität der unbehandelten Tiere hinausgeht. Nach 4 h sind die Formulierungen innerhalb des gesamten GIT verteilt und befinden sich bereits in den Kotpellets, welches an den deutlichen Signalen im distalen Kolon zu erkennen ist.

Im weiteren Verlauf, nach 8 h, nimmt die Signalintensität aller Formulierungen ab und die verbleibenden Signale können im Ileum, Caecum und Colon detektiert werden. Nach diesen Untersuchungen wird der *in vivo* beobachtete schnelle Transit der Partikelformulierungen durch den GIT bestätigt und mit Ausnahme des Magens ist von keinen Interaktionen der NP mit der Schleimhaut auszugehen. Für detailliertere Betrachtungen wurden Gewebeproben für fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen entnommen.

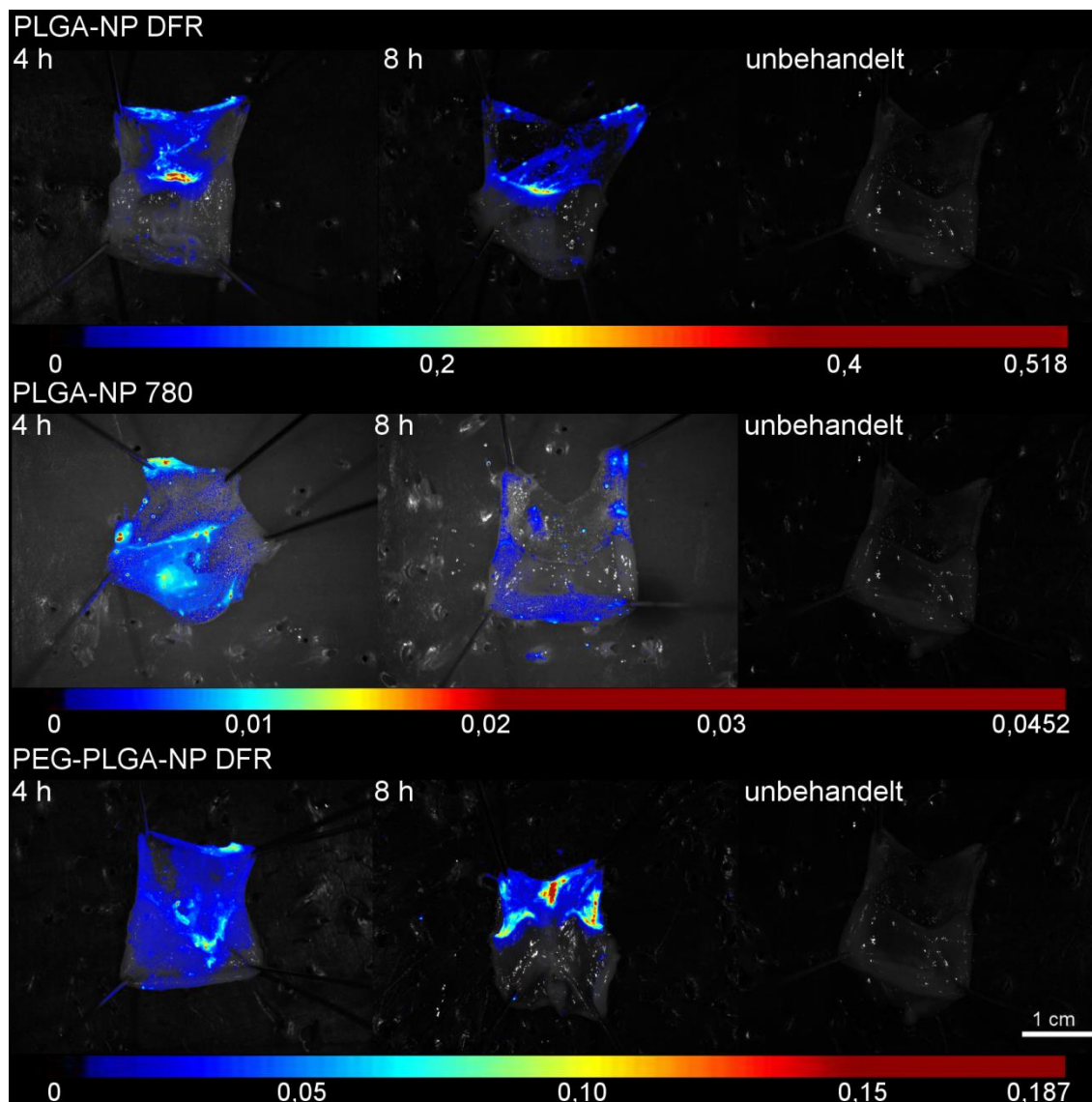


Abb. 57 *Ex vivo* Analyse der isolierten Mägen der Versuchstiere mit dem Maestro™ Imager. Dargestellt sind die Organe nach p.o. Gabe der Formulierungen PLGA-NP DFR, PEG-PLGA-NP DFR und PLGA-NP 780 nach 4 h und 8 h im Vergleich zu den unbehandelten Tieren. Es wurde jeweils ein Tier pro Formulierung und Zeitpunkt aus der Versuchsgruppe ausgewählt und dargestellt.

Zur genaueren Untersuchung des Magens wurde dieser anschließend abgetrennt und durch mehrfache Spülungen mit Phosphatpuffer von anhaftenden Futterresten befreit. Durch diese Vorgehensweise sollte sichergestellt werden, dass auftretende Fluoreszenzsignale auf Interaktion der Partikel mit der Schleimhaut und nicht auf im Chymus verbliebene Partikel zurückgeführt werden können.

Die Formulierungen PLGA-NP DFR bzw. 780 und PEG-PLGA-NP zeigen über den Magen verteilt Fluoreszenzsignale an, wohingegen bei den unbehandelten Tieren keine Signale detektiert worden sind (Abb. 57). Besonders im Bereich des Vormagens sind stärkere Signale als im Hauptmagen zu beobachten, welche über den Zeitraum von 8 h sichtbar bleiben. Neben den DFR-inkorporierten Proben zeigt auch die kovalent gelabelte Probe PLGA-NP 780 erhöhte Fluoreszenzsignale, welches auf eine direkte Interaktion der Partikel und nicht die des Farbstoffes DFR schließen lässt.

Fluoreszenzmikroskopie von Gewebeproben des Gastrointestinaltraktes

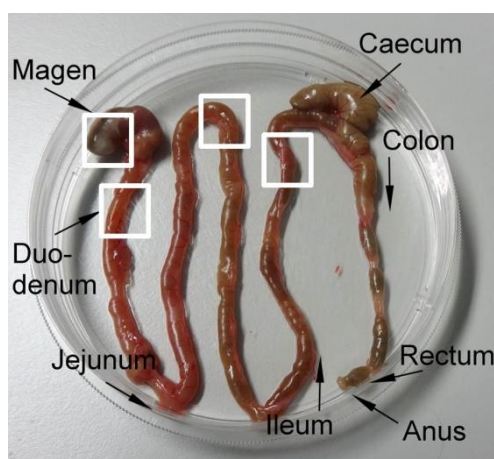


Abb. 58 Entnommener GIT der Versuchstiere. Ausgewählte Abschnittsbereiche für die Entnahme der Proben für die Fluoreszenzmikroskopie sind mit einem weißen Viereck markiert.

Im Weiteren wurden Gewebeproben des Vormagens, des Duodenums, Jejunums sowie Ileums für die Fluoreszenzmikroskopie vorbereitet und zur Untersuchung von Interaktionen der Partikelsuspensionen mit der Schleimhaut und dem Chymus genauer betrachtet (Abb. 58).

Die entnommenen Gewebeproben wurden zur Entfernung von anhaftenden Futtermittelresten mehrfach mit Phosphatpuffer gespült und auf einen Objektträger präpariert.

Repräsentative Gewebebilder der Proben PLGA-NP DFR bzw. 780 und PEG-PLGA-NP DFR 4 h nach der Applikation der Formulierungen sind in Abb. 59 dargestellt. In der Übersicht der Partikelproben ist bei den Formulierungen ein deutliches Fluoreszenzsignal im Vormagen zu erkennen. Die Partikel haften an den Gewebeproben flächendeckend an der Schleimhaut. In den weiteren Dünndarmabschnitten wurden nur vereinzelt Signale gefunden, wie bei den Proben PEG-PLGA-NP DFR in Jejunum und PLGA-NP 780 im Ileum sichtbar ist. Auch nach sorgfältigem Waschen der Proben könnte es sich hierbei um anhaftende Futtermittelreste handeln.

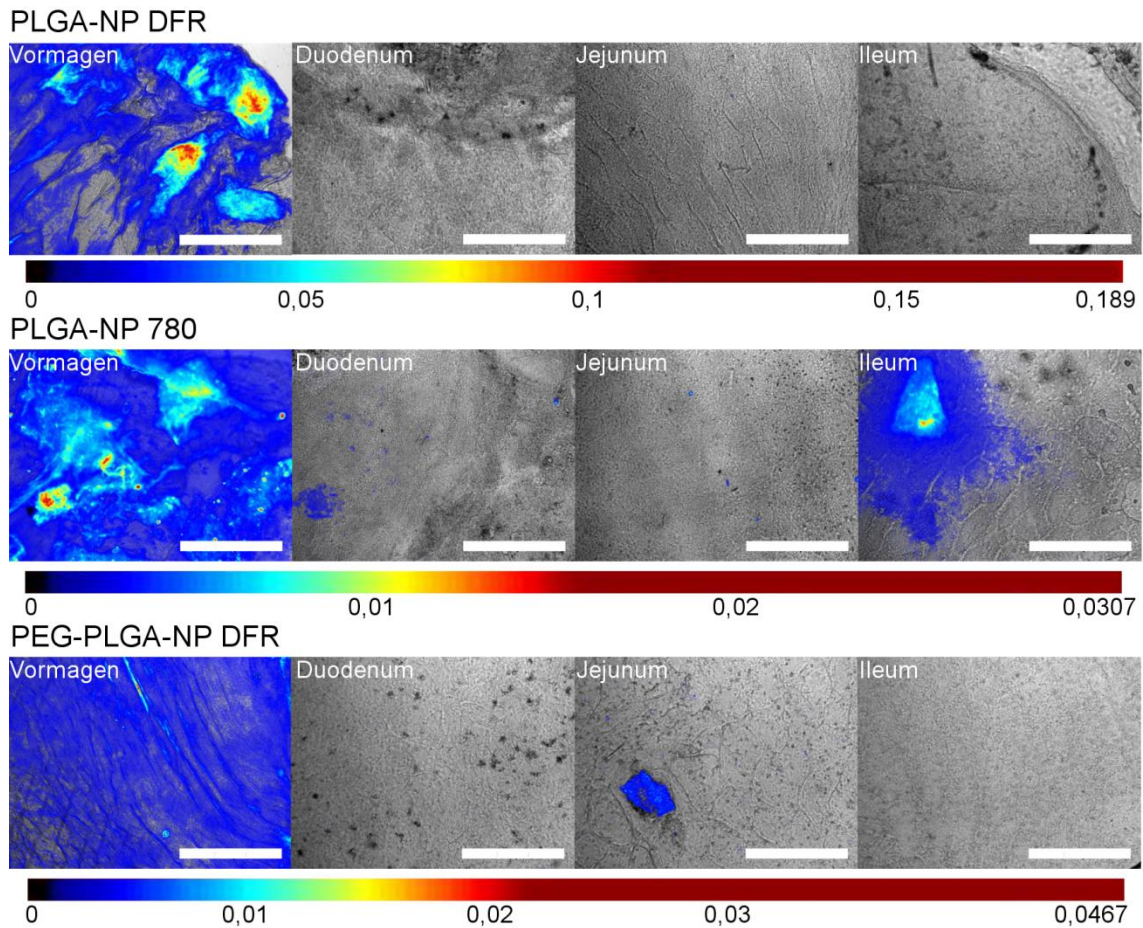


Abb. 59 Fluoreszenzbilder des Vormagens und der Dünndarmabschnitte. Die Proben wurden jeweils von demselben Tier nach 4 h Versuchsdauer entnommen. Der Balken entspricht einer Größe von 500 μm .

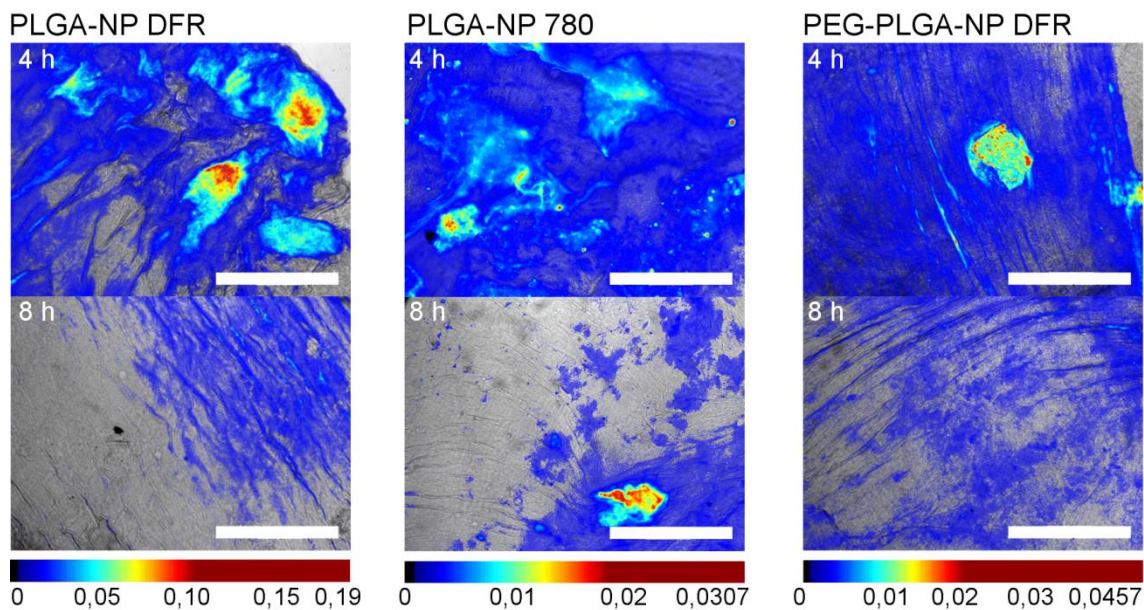


Abb. 60 Der Vormagen im Vergleich zwischen 4 h und 8 h nach p. o. Gabe der Formulierungen. Die Größe des Balkens entspricht 500 μm .

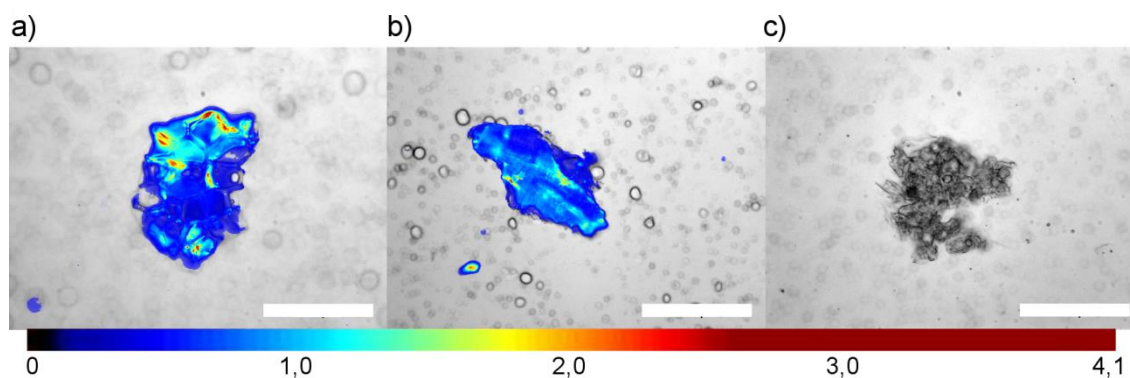


Abb. 61 Anreicherung der Formulierungen in den Futterpellets der Tiere. a) und b) mit PLGA-NP DFR präpariertes Futter; c) Futter ohne Behandlung. Die Größe des Balkens entspricht 200 µm.

Der zeitliche Vergleich der Gewebeproben im Vormagen zwischen 4 h und 8 h zeigt die Signalabnahme über den gemessenen Zeitraum, wobei ein Haften der Formulierung nach 8 h noch über größere Flächen nachweisbar ist (Abb. 60).

Zur Identifizierung der signalgebenden Strukturen im Dünndarm wurden Futterpellets mit PLGA-NP DFR inkubiert und nach mehrfachen Waschvorgängen unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet (Abb. 61). Die verwendeten Futterpellets zeigen eine Anreicherung der Partikelsuspension im Gegensatz zum unbehandelten Futter und gleichen denen im Dünndarmabschnitten gefunden Strukturen. Resultierend konnte ein Haften der Partikel an den Darmwänden nicht festgestellt werden und die Signale im Dünndarm werden durch Interaktionen der Partikel mit dem Chymus verursacht.

Untersuchung der Aufnahme von peroral applizierten PLGA-NP mit gelabelten und inkorporierten Fluoreszenzfarbstoffen

Zur Untersuchung des Aufnahmeverhaltens im GIT wurden die PLGA-NP mit dem Farbstoff DFR versehen sowie zusätzlich kovalent mit dem Farbstoff DY-780 gelabelt. Beide Formulierungen weisen bei dem nicht invasiven msFI *in vivo* sowie bei der Verteilung im GIT nach 4 h und 8 h das gleiche Transitverhalten auf. Bei der *ex vivo* Untersuchung der Leber wurden Unterschiede festgestellt. Im Gegensatz zu den kovalent gelabelten Partikeln war nur bei den PLGA-NP DFR nach p.o. Gabe ein Fluoreszenzsignal in der Leber zu detektieren. Zur Überprüfung wurde zusätzlich zu den oral applizierten Partikelformulierungen als jeweilige Positivkontrolle die Farbstofflösung DFR-HS 15 p.o. sowie die Formulierung PLGA-NP 780 i.v. verabreicht. Es wurde bei diesen Formulierungen ebenso erhöhte Signale in der Leber der Versuchstiere festgestellt. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde die Aufnahme des Farbstoffe DFR aus dem GIT sowie die Aufnahme von PLGA-NP aus dem Blutkreislauf in die Leber bestätigt. Die Ergebnisse der Studie sprechen gegen eine Aufnahme von PLGA-NP

aus dem GIT und stattdessen wurde die Aufnahme des freigesetzten Farbstoffes DFR nachgewiesen.

Die Aufnahme von NP wird vielfach in der Literatur diskutiert [6–10]. In Tierstudien (im Besonderen bei Mäusen, Ratten, Schafen, Schweinen und Kühen [7]) wurde gezeigt, dass die Aufnahme über M-Zellen der PP sowie über Enterozyten möglich ist [107].

Die M-Zellen sind auf den Transport von Antigenen spezialisiert [96]. Aufgrund dessen ist die Aufnahme über diese Zellart ebenso für NP und MP wahrscheinlich [96]. Für die Aufnahme von Partikeln müssen bestimmte Voraussetzungen gegeben sein. Shakweh *et al.* haben bei PVA-stabilisierten PLGA-NP und MP eine größenabhängige Aufnahme über die PP und eine Assoziation im PP freiem Gewebe gezeigt, wobei die NP eine bessere Aufnahme erzielen konnten als die MP [80]. Bei Desai *et al.* werden Größenordnungen von 100-200 nm für eine erhöhte Aufnahme der NP angegeben [86]. Die verwendeten NP-Formulierungen in der vorliegenden Studie zeigen deswegen die benötigte Partikelgröße sowie die in der Literatur angegebene Versuchsdauer zur Aufnahme der NP, welche schon innerhalb einer Stunde nach Applikation stattfinden kann [6]. In der Literatur sind u. a. die Hydrophobizität [5, 6], die Ladung [80] sowie die Oberflächenmodifikation mit adsorbierten oder kovalent gebundenen Stoffen (z. B. Proteine oder Vitamine) [33] als weitere Faktoren genannt, die ebenfalls auf die Aufnahme von NP Einfluss nehmen können.

Eine Aufnahme der PLGA-NP war in dieser Studie nicht zu beobachten. Die p. o. Gabe mit dem Ziel der Aufnahme der Partikel weist nach Tobio *et al.* neben der Instabilität im GIT die, wenn überhaupt vorhandene, geringe Aufnahme der Partikel als Problem auf [107]. Die Enterozyten stellen etwa 90 % der Zellen in der Mukosa im Dünndarm dar [10], wobei die für die Aufnahme der NP vielfach benannten M-Zellen nur 1 % der gesamten GIT Fläche beanspruchen [5]. Diese sind aus diesem Grund zur Resorption von signifikanten Mengen an Wirkstoff und Partikeln nicht geeignet [36]. Ebenso werden bei Simon *et al.* und Navarro *et al.* die geringen Aufnahmequoten thematisiert [81, 113].

Beispielsweise haben Le Ray *et al.* radiogelabelte PVA-stabilisierte PLGA-NP über i. v. und p. o. Gabe an Mäusen verabreicht und die Konzentration in diversen Geweben gemessen. Nach i. v. Gabe zeichnete sich ebenso eine schnelle Anreicherung in den Organen, u. a. in der Leber ab. Bei der p. o. Gabe wurde in die Applikation mit und ohne Milch zur Stimulierung der lymphatischen Absorption (bzw. auch Anregung intestinaler pankreatischer Säfte) und der Gabe der radiomarkierten Lösung ohne Partikel unterschieden. Bei den Partikelformulierungen war ein geringes systemisches Signal (0,5 % ohne Milch und 2,4 % mit Milch nach 1 h, von allen untersuchten Organen summiert) zu erkennen, wohingegen nach der Gabe der radiomarkierten Lösung ein hoher Anteil aufgenommen wurde (64 %). Ein *in vitro* Verdau wurde mit den USP (XXII) Medien berücksichtigt. Die Autoren schlussfolgerten aus den Versuchen eine mögliche geringe Aufnahme der Partikel von 1,9-2,3 % nach 1 h [84].

Im Gegensatz zu Le Ray *et al.* konnte unter nahrungsmittelbedingten Einflüssen kein messbares Signal der gelabelten Partikel in der Leber festgestellt werden, welches auf keine oder nur geringe Partikelaufnahme, die unter der Detektionsgrenze des Maestro™ Imagers liegt, zurückzuführen ist.

Simon *et al.* zeigen weiterhin in einer Auflistung von *in vivo* Versuchen an Mäusen und Ratten, dass PLGA-Partikel mit inkorporierten Markern im Gegensatz zu kovalent gelabelten Partikeln ein höheres Signal in den jeweiligen Geweben und Organen aufweisen [81]. Diese Beobachtung kann mit der vorliegenden Studie bestätigt werden. Die Untersuchungen zeigen, dass bei inkorporierten Farbstoffen in PLGA-NP der mögliche Abbau durch gastrointestinale Enzyme sowie die verbundene Freigabe und Aufnahme des Farbstoffes näher betrachtet werden sollte. Weiterhin sind die Auswirkungen der anatomischen Unterschiede bezüglich Anzahl und Lage der PP zwischen Maus und Mensch zu beachten [108, 112]. Um die Aufnahme zu verifizieren, besteht die Möglichkeit der Durchführung weiterer Versuche an Zelllinien, obwohl sich bei diesen die fehlende Mukusproduktion [32] und die fehlende Möglichkeit der Enzymeinflüsse als problematisch erweist.

Interaktionen der peroral applizierten PLGA-NP mit dem Mukus bzw. der Schleimhaut im Gastrointestinaltrakt

In der Untersuchung des Magens und der Dünndarmabschnitte der Formulierungen PLGA-NP DFR bzw. 780 und PEG-PLGA-NP DFR wurden Ergebnisse über die Verteilung der Partikel abhängig von der unterschiedlichen Stabilisierung erhalten. Hierbei wurden die Interaktionen der Partikel mit der Magen- und Dünndarmschleimhaut betrachtet. Ein mögliches Anhaften an die Darmwand bzw. an der zellnahen Mukusschicht kann Hinweise über das Verhalten der NP im GIT bereitstellen. Ein Spülen der Gewebeproben mit Phosphatpuffer entfernt nicht die festanhaftende Mukusschicht in Zellnähe [32]. Als Folge ist bei auftretenden Fluoreszenzsignalen ein Verbleiben der NP in der Mukusschicht wahrscheinlicher als die Aufnahme in die Epithelzellen selbst [32]. Hingegen zeigt ein fehlendes Fluoreszenzsignal und somit keine auftretende Interaktion der Partikel mit dem GIT-Gewebe ein Verbleiben der Partikel im Chymus und der losen Mukusschicht an. Durch die schnelle Clearance der Partikel im Chymus steht nur ein geringes Zeitfenster für die Aufnahme oder die lokale Wirkung der Formulierung zur Verfügung.

Die Mukusgelschicht bildet durch die Porengröße eine Art Sieb für NP [32], wodurch kleinere Partikel besser penetrieren können [8]. Es gibt natürlicherweise eine Durchgangsspanne innerhalb der Mukusschicht, wobei die kritische Ausschlussgröße mit annähernd 400 nm angegeben wird [216]. Zumeist weisen elektrostatisch positiv geladene Partikel starke Interaktionen zu dem negativ geladenen Mukus auf [32], obwohl es neben den elektrostatischen

Interaktionen auch hydrophobe Wechselwirkungen sowie Van-der-Waals-Kräfte und die Wasserstoffbrückenbindungen zu berücksichtigen gilt [216].

PVA wird als mukoadhäsives Polymer oftmals in bukkalen Arzneiformen angewendet und weist daher starke Interaktionen mit dem Mukus auf [217, 218]. Bei der PEG-Stabilisierung der NP ist eine differenzierte Betrachtung notwendig. Es wurden ebenso bei PEG-stabilisierten NP mukoadhäsive Eigenschaften gefunden [219–221]. Hingegen haben Lai *et al.* bei NP mit einer niedermolekularen PEG-Stabilisierung von einer geminderten Mukoadhäsivität berichtet. Die kritische Grenze zwischen mukoinertem und mukoadhäsivem Verhalten liegt bei einem PEG-Einsatz zwischen 5-10 kDa [222, 223]. Somit besitzen die Partikelformulierungen mit PEG- und PVA-Stabilisierung aufgrund ihrer Ladung und Größe die Möglichkeit den losen Mukus zu überwinden und zur Zellschicht durchzudringen oder aufgrund ihrer Mukoadhäsivität schon im losen Mukus haften zu bleiben.

Die Partikelformulierungen zeigten in den Tierversuchen *in vivo* das gleiche Transitverhalten über 8 h. Das Fluoreszenzsignal beschränkt sich auf den Bauchraum der Tiere und gibt somit eine schnelle Verteilung der Suspensionen im gesamten GIT an. In den *in vivo* Untersuchungen wurde eine lange Verweildauer der Partikel im Magen beobachtet. Die Verteilung im GIT und die Anreicherung der Partikel im Magen konnten mit *ex vivo* Untersuchungen bestätigt werden. Innerhalb von 4 h zeigten die Formulierungen eine Verteilung bis zum Colon. Nach 8 h ist die Fluoreszenz im Dünndarm und Dickdarm im Besonderen bei den PEG-PLGA-NP stark verringert. Das Fluoreszenzsignal im Magen bleibt hingegen bis zum 8 h Wert bestehen. Die Betrachtung der aufgespannten Mägen zeigte Interaktionen der Partikel im Magen und im Besonderen im Vormagen. Bestätigt werden diese Beobachtungen durch die fluoreszenzmikroskopische Betrachtung von Gewebeproben des Vormagens, des Duodenums, Jejunums und Ileums der Versuchstiere. Diese zeigen ein Haften der Partikel im Vormagen der Versuchstiere bei allen Formulierungen. Im Vergleich wurden in den Dünndarmabschnitten nur wenige Fluoreszenzsignale gefunden, die auf verbliebende Futtermittelreste hindeuteten. Die Partikel dringen daher nicht in die festanhaftenden Mukusschicht vor bzw. wurden nicht in die Dünndarmepithelzellen aufgenommen. Die Ergebnisse legen nahe, dass es keine Interaktionen der Partikel mit dem Dünndarmgewebe gibt. Es konnten keine Unterschiede der Stabilisatoren auf die Interaktionen mit der Schleimhaut festgestellt werden.

Das Haften der Partikel an der Schleimhaut im Vormagen kann mit dessen Vorratsfunktion erklärt werden. In diesem drüsen- und muskelarmen Teil des Magens der Mäuse [109] wird das Futter bis zum Verdaubeginn im Hauptmagen gelagert. Durch die lange Verweildauer im Vormagen und Magen kann es bei den Partikeln zu Interaktionen mit der Schleimhaut kommen. Durch den unterschiedlichen Aufbau des murinen und humanen Magens sind diese Beobachtungen des Anhaftens der Partikelformulierungen nur teilweise auf den Menschen

übertragbar. Das Gewebe des murinen Vormagens ist jedoch vergleichbar mit dem humanen Ösophagusgewebe, welches von dem Magen durch die Z-Linie getrennt ist [108]. Diese ist mit der murinen Trennlinie zwischen Vormagen und Magen vergleichbar [108]. Im humanen Magen wurden Verweilzeiten in Abhängigkeit der Nahrungsaufnahme von 6 h und länger gemessen [12]. Bei einer humanen p. o. Gabe könnte diese Eigenschaft Anwendung bei nanopartikulären Arzneistoffträgersystemen für Magenerkrankungen, auch im Hinblick auf die gegebene gastrische Stabilität, finden. Bei abweichenden Anwendungszielen müsste eine Anhaftung der Partikel in der Speiseröhre und bei langer Verweildauer auch im Magen zur Vermeidung von Reizungen und Nebenwirkungen näher untersucht werden.

Im Gegensatz zum Magen zeigt sich im Dünndarm ein schneller Transit der Partikel infolge dessen das Zeitfenster für Interaktionen mit der festanhaftenden Mukusschicht bzw. den Epithelzellen zu gering ist. Diese Ergebnisse sollten für Folgeuntersuchungen für eine gewünschte Steigerung der Interaktionen mit dem Mukus im Dünndarm in Betracht gezogen werden.

Einfluss der PVA- und PEG-Stabilisierung auf den Verdauprozess

Im Vergleich zwischen der PVA- und PEG-Stabilisierung der PLGA-NP wurde die Sensitivität der Formulierungen gegenüber gastrointestinalen Enzymen *in vivo* untersucht.

Die Formulierungen PLGA-NP DFR und PEG-PLGA-NP DFR zeigen *in vivo* mittels des msFI ein vergleichbares Transitverhalten. Bei den *ex vivo* Untersuchungen der Leber werden nach der p. o. Gabe von PEG-PLGA-NP DFR niedrigere Werte gemessen als bei den PLGA-NP DFR. Der Wert des aufgenommenen DFR von den PEG-PLGA-NP DFR entspricht im Verhältnis einem Drittel des Wertes von den PLGA-NP DFR. Dies bestätigt den Trend des geringen Abbaus der PEG-PLGA-NP, welcher *in vitro* zu beobachten war. Die PEG-PLGA-NP weisen *in vitro* im FESSIF einen Verdau von 3,6 % im Vergleich zu den PLGA-NP PVA (32,0 %, gemessen mit dem L-Lactat-NW, Tab. 19) auf. Die Unterschiede können in der möglichen unvollständigen Inkorporation und aufgrund des Haftens des Farbstoffes an der Oberfläche der NP begründet sein. Partikel aus Polymeren weisen einen starken *Burst-Release Effekt* auf, bei dem die Farbstoffe an der Oberfläche der NP sofort nach Applikation freigesetzt werden können [34]. Zusätzlich zum enzymatischen Abbau und der Desorption des Farbstoffes von der Oberfläche der NP können Diffusionsprozesse des inkorporierten Stoffes durch die Polymermatrix sowie Erosion der Polymermatrix durch Hydrolyseprozesse Einfluss auf die gemessenen Werte haben [34]. Weiterhin kann die unterschiedliche Zusammensetzung der gastrointestinalen Enzyme von Maus, Schwein und Mensch Differenzen zwischen den *in vitro* und *in vivo* Beobachtungen hervorrufen. Beispielsweise besitzen das murine und humane PRPL2 unterschiedliche Eigenschaften [224], welche auf den Abbau der

Formulierungen Einfluss haben können. Ungeachtet der Unterschiede in der Anatomie und Enzymausstattung sind kleine Tiere, wie Mäuse, aufgrund der geringen Kosten und der einfachen Handhabung die erste Wahl für Konzeptnachweise und Machbarkeitsstudien [30]. Durch die vorliegende Studie konnte jedoch gezeigt werden, dass die Stabilisierung mit PEG zu geringeren Signalen des freigesetzten Farbstoffes in der Leber führt, welches den verminderten Abbau der Partikel zeigt. Der potentielle Einfluss des verwendeten Stabilisators aus den *in vitro* Ergebnissen konnte auch *in vivo* bestätigt werden. Im Hinblick auf das Therapieziel sind die erhaltenen Informationen wichtig zu beachten, da die Aufnahme intakter Partikel aus dem Dünndarm sowie die Behandlung im Colon die Stabilität der Partikel im GIT erfordern. Die Ergebnisse können für ein spezifisches Entwickeln von NP eingesetzt werden, um eine erhöhte Stabilität im GIT durch den Einsatz von PEG zu gewährleisten. Im Besonderen bei den Wirkorten im distalen Ileum oder im Colon können diese Ergebnisse zur Optimierung von NP-Formulierungen genutzt werden. PEG-PLGA-NP können aufgrund des geringen Verdaus besser in terminale Dünndarmabschnitte bzw. ins Colon transportiert werden und dort spezifisch als Arzneistofftransportsystem wirken. Zur Optimierung der Formulierung müssten weitere Versuche vorgenommen werden. Die Herstellung der PEG-PLGA-NP mit niedermolekularen PEG könnte beispielsweise das Durchdringen des Mukus fördern [222, 223].

5 Zusammenfassung und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde die Abbaufähigkeit von Lipid- und Polymer-NP *in vitro* mit der pH-stat Methode in den Medien FaSSIF und FeSSIF als Simulation für den Verdau im Dünndarm untersucht.

Es wurden feste Lipid-NP aus CP (CP-SLN) mit den Emulgatoren PS80 sowie P188 mit engen Größenverteilungen, Z-Averages unter 200 nm sowie vergleichbaren thermischen und optischen Eigenschaften hergestellt. In den TEM Aufnahmen weisen die Formulierungen plättchenförmige Strukturen auf. Im Verdautes mit der pH-stat Methode konnte die Abbaubarkeit des PS80 im Gegensatz zum P188 bestätigt werden. Die Formulierungen der CP-SLN unterlagen einem unvollständigen Abbau, welcher in Abhängigkeit des verwendeten Emulgators verschieden hoch ausfiel und bei den CP-SLN P188 wurde in beiden Medien ein prozentualer Abbau von 30 % verzeichnet. Somit konnte eine Abhängigkeit des Stabilisators auf den intestinalen Abbau von Lipid-NP festgestellt werden. Zur Untersuchung des Einflusses der Lipase in den Abbauprozess wurden orlistathaltige CP-SLN hergestellt. Durch den Lipasehemmer entstand eine vollständige Hemmung des Verdaus, wodurch die Lipase ungeachtet der fehlenden klassischen Substratstrukturen des CP im Vergleich zu Triglyceriden als Hauptenzym im Abbau identifiziert werden konnte. Die Ergebnisse können zum zielgerichteten Entwickeln von p.o. angewendeten Lipid-NP unter Einbeziehung oder Umgehung des Abbaus der Partikel verwendet werden.

Die angewendete pH-stat Methode wurde im Hinblick auf langkettige Formulierungsbestandteile auf die vollständige Erfassung der freigesetzten Fettsäuren untersucht. Im Vergleich zu der HPTLC wurde formulierungsabhängig eine unzureichende Titrationseffizienz beobachtet. Während der vollständigen Detektion der Fettsäuren der P188-stabilisierten Formulierung zeigten die PS80-stabilisierten Partikel im FeSSIF eine zu geringe Registrierung der Fettsäuren. Die Untersuchung stellt die problematische Detektion der freien Fettsäuren im komplexen Milieu des Verdauensystems, welcher Einfluss auf den pK_s -Wert der langkettigen Fettsäuren haben kann, mit der pH-stat Methode dar. Zur Ergänzung sollte eine zweite dissoziationsunabhängige Methode, wie HPTLC oder GC, genutzt werden. Die Anwendung der Rücktitration resultierte in einer unzureichenden und einer stetig ansteigende Menge an detektierten freien Säuren bei ansteigendem pH-Wert durch ggf. weitere basenkatalysierte Vorgänge im System.

In den letzten Jahrzehnten ist neben den Lipid-NP das Interesse an p.o. applizierten Polymer-NP gestiegen. Die Untersuchung des Abbaus im GIT wurde im Rahmen dieser Dissertation eingehend betrachtet. Hierfür wurden NP aus PLGA mit den Stabilisatoren P188, PS80 sowie PVA und PEG hergestellt. Aufgrund des vielfältigen und variablen Einsatzes von PVA wurden im Speziellen bei diesem Stabilisator verschiedene Mengenanteile und Molekular-

gewichte untersucht. Die PLGA-NP wiesen einen Z-Average von 116 nm-165 nm in der PCS, ein opaleszentes Erscheinungsbild sowie in den TEM Aufnahmen eine runde Form auf. Durch die Stabilisation der PLGA-NP konnte eine Verschiebung des ZP zu weniger negativen Werten im Vergleich zu den nicht stabilisierten NP gezeigt werden. Der Abbau der Partikel wurde mit der pH-stat Methode sowie mit einem spezifischen L-Lactat-NW untersucht. Entgegen der oftmaligen Erwartungshaltung wurde ein Abbau der PLGA-NP P188 detektiert, welcher medienunabhängig zu 42-43 % (L-Lactat-NW) erfolgte. Der Einfluss der Lipase in diesen Prozess konnte durch orlistathaltige PLGA-NP nachgewiesen werden, wobei der Anteil der Lipase mit annähernd 50 % bestimmt wurde. Resultierend sind weitere Enzyme im Abbauprozess beteiligt, welche in fortführenden Studien eingehend untersucht werden sollten. Eine Involvierung von CEH als esterspaltendes Enzym mit breiter Substratspezifität wäre demnach möglich.

Im Hinblick auf die Einflüsse der Stabilisierung wurde eine Konzentrationsabhängigkeit des Abbaus bei PVA-haltigen PLGA-NP gezeigt. Im Rahmen der untersuchten Mengenanteile von 0,1 %-3 % PVA während der Herstellung wurde nur ein Abbau bei 0,1 % PVA (entsp. 0,033 % im Verdaumedium durch den Verdünnungsprozess) festgestellt. Erhöhte Anteile an diesem Stabilisator führten zur vollständigen Hemmung des Abbaus, womit PVA als Hemmstoff der abbauenden Enzyme, wie der Lipase, identifiziert werden könnte. Der Mechanismus der Hemmung benötigt detaillierte Untersuchungen, deren Durchführung durch die Komplexität der Medienzusammensetzung jedoch erschwert wird. Hingegen ist die Abhängigkeit des Molekulargewichtes auf den Verdau nur gering. Im Vergleich mit den verwendeten Stabilisatoren P188 und PS80, welche ebenfalls wie die Formulierung PLGA-NP PVA I mit 0,1 %, einem Abbau unterliegen, wurde bei den PEG-PLGA-NP ein reduzierter Verdau im FeSSIF von 3,0 % detektiert. Der Einfluss der Stabilisierung auf den Abbauprozess der PLGA-NP konnte somit ebenso wie bei den CP-SLN gezeigt werden und PEG ist als effektiver Hemmstoff des Abbaus von PLGA-NP ermittelt worden.

Zur Überprüfung des Einflusses der Stabilisierung und des Verdaus der Polymer-NP sollte ein Mausmodell mit der Möglichkeit der Beobachtung des *in vivo* Transits der NP entwickelt werden. Hierfür wurden die Proben PLGA-NP PVA 0,1 % sowie PEG-PLGA-NP aufgrund der häufigen Anwendung dieser Stabilisatoren in der Literatur ausgewählt. Zur Untersuchung wurde das nicht invasive msFI mit haarlosen SKH1 Mäusen und einer Kurzzeitnarkose zur geringstmöglichen Beeinflussung des Verdauprozesses verwendet. In Vorversuchen wurde die Stabilität der Proben im Magen mittels enzymhaltigem SGF untersucht und bestätigt. Es wurden mit DFR inkorporierte Proben von PLGA-NP PVA 0,1 % sowie von PEG-PLGA-NP hergestellt. Die Partikelproben wiesen vergleichbare Eigenschaften wie die nicht fluoreszenzmarkierten Partikel auf. Die Proben wurden unter der Annahme der erhöhten Freisetzung und Aufnahme des Farbstoffes bei erhöhtem Verdau betrachtet. Zur möglichen Unter-

scheidung zwischen freigesetztem Farbstoff DFR und der Aufnahme der intakten Partikel wurden als Positivproben PLGA-NP mit DY-780 kovalent gelabelt und diese i.v. und p.o. sowie eine DFR-Lösung p.o. verabreicht. Die Beobachtungsdauer der Versuchsgruppen wurde auf 4 h und 8 h für die p.o. applizierten NP festgelegt. Es konnte erfolgreich der Transit der Proben nicht invasiv und individuenspezifisch nachvollzogen werden. Unter Einbeziehung anschließender *ex vivo* Untersuchungen der Leber, der Nieren sowie des gesamten GIT konnten Aussagen über den erfolgten Verdau, die Aufnahme sowie die Interaktionen der Partikel mit der Magen- und Darmschleimhaut getroffen werden. Über den Beobachtungszeitraum wurde *in vivo* und *ex vivo* ein langanhaltendes Signal im Magen, speziell im Vormagen, der Tiere festgestellt. Im Gegensatz konnten keine Interaktionen der Partikel mit der Darmschleimhaut bzw. des Mukus mit fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen beobachtet werden. Übereinstimmend unterlagen die kovalent gelabelten PLGA-NP keiner messbaren Aufnahme aus dem GIT in die Leber, wohingegen eine Aufnahme des freien Farbstoffes von der DFR-Lösung aus dem Darm detektiert werden konnte. Im Vergleich zu den PEG-PLGA-NP wurde ein erhöhtes Signal bei den PLGA-NP in der Leber gefunden, welches dementsprechend aus einem vermehrten Abbau der Partikel und infolge dessen der erhöhten Freisetzung des Farbstoffes DFR resultiert. Unter Beachtung der anatomischen und physiologischen Unterschiede zwischen dem Mausmodell und dem Menschen konnte der *in vitro* beobachtete hemmende Einfluss des PEG als Stabilisator auf den Abbauprozess der PLGA-NP auch *in vivo* bestätigt werden. Weiterführend können mit diesem Tiermodell die Konzentrationsabhängigkeit des PVA und weitere Stabilisatoren untersucht werden. Bisherige Ergebnisse können zur Weiterentwicklung von nicht invasiven Verdaumodellen *in vivo* sowie zur zielgerichteten Modifizierung von PLGA-NP beitragen. Je nach betrachtetem Anwendungsziel kann eine Verringerung des Abbaus der PLGA-NP im GIT zur möglichen Steigerung der Aufnahme oder zur verbesserten Wirkung in den unteren Darmabschnitten bei chronischen Darmkrankheiten wie Colitis ulcerosa oder Morbus Crohn beitragen.

6 Literatur

1. Amidon GL, Lennernäs H, Shah VP, Crison JR (1995) A theoretical basis for a biopharmaceutical drug classification. The correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. *Pharm Res* 12(3):413–420
2. Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ (1997) Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliver Rev* 23(1-3):3–25.
3. Lipinski CA (2000) Drug-like properties and the causes of poor solubility and poor permeability. *J Pharmacol Toxicol Methods* 44(1):235–249
4. Torchilin V (Hrsg) (2014) *Handbook of Nanobiomedical Research: fundamentals, applications, and recent developments*. Chapter 2: Solid Lipid Nanoparticles for Biomedical Applications (Mäder; K.), 3. Aufl. World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd., Singapore
5. Des Rieux A, Fievez V, Garinot M, Schneider Y-J, Preat V (2006) Nanoparticles as potential oral delivery systems of proteins and vaccines: a mechanistic approach. *J Control Release* 116(1):1–27.
6. Bakhru SH, Furtado S, Morello AP, Mathiowitz E (2013) Oral delivery of proteins by biodegradable nanoparticles. *Adv Drug Deliver Rev* 65(6):811–821.
7. Florence AT (2005) Nanoparticle uptake by the oral route: Fulfilling its potential? *Drug Discovery Today: Technologies* 2(1):75–81.
8. Kreuter J (1991) Peroral administration of nanoparticles. *Adv Drug Deliver Rev* 7(1):71–86.
9. Delie F (1998) Evaluation of nano- and microparticle uptake by the gastrointestinal tract. *Adv Drug Deliver Rev* 34(2-3):221–233.
10. Jung T, Kamm W, Breitenbach A, Kaiserling E, Xiao JX, Kissel T (2000) Biodegradable nanoparticles for oral delivery of peptides: is there a role for polymers to affect mucosal uptake? *Eur J Pharm Biopharm* 50(1):147–160
11. Jantravid E, Dressman J (2009) Biorelevant Dissolution Media Simulating the Proximal Human Gastrointestinal Tract. An Update. *Dissolution Technol.* 16(3):21–25.
12. Sarosiek I, Selover KH, Katz LA, Semler JR, Wilding GE, Lackner JM, Sitrin MD, Kuo B, Chey WD, Hasler WL, Koch KL, Parkman HP, Sarosiek J, McCallum RW (2010) The assessment of regional gut transit times in healthy controls and patients with gastroparesis using wireless motility technology. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 31(2):313–322.
13. Schiller C, Fröhlich C-P, Giessmann T, Siegmund W, Mönnikes H, Hosten N, Weitschies W (2005) Intestinal fluid volumes and transit of dosage forms as assessed by magnetic resonance imaging. *Aliment Pharmacol Ther* 22(10):971–979.
14. N’Goma J-CB, Amara S, Dridi K, Jannin V, Carrière F (2012) Understanding the lipid-digestion processes in the GI tract before designing lipid-based drug-delivery systems. *Therapeutic delivery* 3(1):105–124.

15. Koziolok M, Garbacz G, Neumann M, Weitschies W (2013) Simulating the postprandial stomach: physiological considerations for dissolution and release testing. *Mol. Pharm.* 10(5):1610–1622.
16. Abrams CK, Hamosh M, Lee TC, Ansher AF, Collen MJ, Lewis JH, Benjamin SB, Hamosh P (1988) Gastric Lipase. Localization in the Human Stomach. *Gastroenterology* 95(6):1460–1464.
17. Porter, Christopher J H, Trevaskis NL, Charman WN (2007) Lipids and lipid-based formulations: optimizing the oral delivery of lipophilic drugs. *Nat Rev Drug Discov* 6(3):231–248.
18. Schulze K (2006) Imaging and modelling of digestion in the stomach and the duodenum. *Neurogastroenterol. Motil.* 18(3):172–183.
19. Maldonado-Valderrama J, Wilde P, Macierzanka A, Mackie A (2011) The role of bile salts in digestion. *Adv Colloid Interface Sci* 165(1):36–46.
20. Larsen AT, Sassene P, Müllertz A (2011) In vitro lipolysis models as a tool for the characterization of oral lipid and surfactant based drug delivery systems. *Int J Pharm* 417(1-2):245–255.
21. Wilde PJ, Chu BS (2011) Interfacial & colloidal aspects of lipid digestion. *Adv Colloid Interface Sci* 165(1):14–22.
22. Patton J, Yetter RD, Hamosh M, Borgström B, Lindstrom M, Carey MC (1985) The Light Microscopy of Triglyceride Digestion. *Food Microstruct* 1985(Vol. 4):29–41
23. MacGregor KJ, Embleton JK, Lacy JE, Perry EA, Solomon LJ, Seager H, Pouton CW (1997) Influence of lipolysis on drug absorption from the gastro-intestinal tract. *Adv Drug Deliver Rev* 25(1):33–46.
24. Williams HD, Sassene P, Kleberg K, Bakala-N'Goma J-C, Calderone M, Jannin V, Igonin A, Partheil A, Marchaud D, Jule E, Vertommen J, Maio M, Blundell R, Benameur H, Carrière F, Müllertz A, Porter, Christopher J H, Pouton CW (2012) Toward the establishment of standardized in vitro tests for lipid-based formulations, part 1: method parameterization and comparison of in vitro digestion profiles across a range of representative formulations. *J. Pharm. Sci.* 101(9):3360–3380.
25. Kossena GA, Charman WN, Boyd BJ, Dunstan DE, Porter CJH (2004) Probing drug solubilization patterns in the gastrointestinal tract after administration of lipid-based delivery systems: a phase diagram approach. *J Pharm Sci* 93(2):332–348.
26. Fatouros DG, Bergenstahl B, Mullertz A (2007) Morphological observations on a lipid-based drug delivery system during in vitro digestion. *Eur J Pharm Sci* 31(2):85–94.
27. Kleberg K, Jacobsen F, Fatouros DG, Müllertz A (2010) Biorelevant media simulating fed state intestinal fluids: colloid phase characterization and impact on solubilization capacity. *J. Pharm. Sci.* 99(8):3522–3532.
28. Fernandez S, Jannin V, Rodier J-D, Ritter N, Mahler B, Carrière F (2007) Comparative study on digestive lipase activities on the self emulsifying excipient Labrasol®, medium chain glycerides and PEG esters. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1771(5):633–640.

29. Dahan A, Hoffman A (2008) Rationalizing the selection of oral lipid based drug delivery systems by an in vitro dynamic lipolysis model for improved oral bioavailability of poorly water soluble drugs. *J Control Release* 129(1):1–10.
30. Hauss DJ (2007) Oral lipid-based formulations. *Adv Drug Deliver Rev* 59(7):667–676.
31. Mäder K (2014) Solid Lipid Nanoparticles for Biomedical Applications. In: Torchilin V (Hrsg) *Handbook of Nanobiomedical Research: fundamentals, applications, and recent developments*. Chapter 2: Solid Lipid Nanoparticles for Biomedical Applications (Mäder; K.), 3. Aufl. World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd., Singapore, S 55–86
32. Ensign LM, Cone R, Hanes J (2012) Oral drug delivery with polymeric nanoparticles: the gastrointestinal mucus barriers. *Adv Drug Deliver Rev* 64(6):557–570.
33. Chen M-C, Sonaje K, Chen K-J, Sung H-W (2011) A review of the prospects for polymeric nanoparticle platforms in oral insulin delivery. *Biomaterials* 32(36):9826–9838.
34. Danhier F, Ansorena E, Silva JM, Coco R, Le Breton A, Preat V (2012) PLGA-based nanoparticles: an overview of biomedical applications. *J Control Release* 161(2):505–522.
35. Muchow M, Maincent P, Muller RH (2008) Lipid nanoparticles with a solid matrix (SLN, NLC, LDC) for oral drug delivery. *Drug Dev Ind Pharm* 34(12):1394–1405.
36. Mäder K (2010) *Innovative Arzneiformen. Ein Lehrbuch für Studium und Praxis*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart
37. Dahan A, Hoffman A (2007) The effect of different lipid based formulations on the oral absorption of lipophilic drugs: the ability of in vitro lipolysis and consecutive ex vivo intestinal permeability data to predict in vivo bioavailability in rats. *Eur J Pharm Biopharm* 67(1):96–105.
38. Kleberg K, Jacobsen J, Müllertz A (2010) Characterising the behaviour of poorly water soluble drugs in the intestine: application of biorelevant media for solubility, dissolution and transport studies. *J. Pharm. Pharmacol.* 62(11):1656–1668.
39. Rube A, Klein S, Mäder K (2006) Monitoring of in vitro fat digestion by electron paramagnetic resonance spectroscopy. *Pharm Res* 23(9):2024–2029.
40. Kossena GA, Boyd BJ, Porter CJH, Charman WN (2003) Separation and characterization of the colloidal phases produced on digestion of common formulation lipids and assessment of their impact on the apparent solubility of selected poorly water-soluble drugs. *J Pharm Sci* 92(3):634–648.
41. Warren DB, Anby MU, Hawley A, Boyd BJ (2011) Real time evolution of liquid crystalline nanostructure during the digestion of formulation lipids using synchrotron small-angle X-ray scattering. *Langmuir* 27(15):9528–9534.
42. Helbig A, Silletti E, Timmerman E, Hamer RJ, Gruppen H (2012) In vitro study of intestinal lipolysis using pH-stat and gas chromatography. *Food Hydrocolloids* 28(1):10–19.
43. Sek L, Porter CJH, Charman WN (2001) Characterisation and quantification of medium chain and long chain triglycerides and their in vitro digestion products, by HPTLC coupled with in situ densitometric analysis. *J Pharmaceut Biomed* 25(3-4):651–661.

44. Sek L, Boyd BJ, Charman WN, Porter, Christopher J H (2006) Examination of the impact of a range of Pluronic surfactants on the in-vitro solubilisation behaviour and oral bioavailability of lipidic formulations of atovaquone. *J. Pharm. Pharmacol.* 58(6):809–820.
45. Sek L, Porter CJH, Kaukonen AM, Charman WN (2002) Evaluation of the in-vitro digestion profiles of long and medium chain glycerides and the phase behaviour of their lipolytic products. *J Pharm Pharmacol* (54):29–41
46. Garbacz G, Klein S (2012) Dissolution testing of oral modified-release dosage forms. *J. Pharm. Pharmacol.* 64(7):944–968.
47. Klein S (2010) The use of biorelevant dissolution media to forecast the in vivo performance of a drug. *AAPS J* 12(3):397–406.
48. Kostewicz ES, Aarons L, Bergstrand M, Bolger MB, Galetin A, Hatley O, Jamei M, Lloyd R, Pepin X, Rostami-Hodjegan A, Sjögren E, Tannergren C, Turner DB, Wagner C, Weitschies W, Dressman J (2014) PBPK models for the prediction of in vivo performance of oral dosage forms. *Eur J Pharm Sci* 57:300–321.
49. Cuiné JF, McEvoy CL, Charman WN, Pouton CW, Edwards GA, Benameur H, Porter CJH (2008) Evaluation of the impact of surfactant digestion on the bioavailability of danazol after oral administration of lipidic self-emulsifying formulations to dogs. *J. Pharm. Sci.* 97(2):995–1012.
50. Kaukonen AM, Boyd BJ, Porter CJH, Charman WN (2004) Drug Solubilization Behavior During in Vitro Digestion of Simple Triglyceride Lipid Solution Formulations. *Pharm Res* 21(2):245–253.
51. Zangenberg NH, Müllertz A, Kristensen HG, Hovgaard L (2001) A dynamic in vitro lipolysis model. *Eur J Pharm Sci* 14(2):115–122.
52. Christensen JØ, Schultz K, Mollgaard B, Kristensen HG, Mullertz A (2004) Solubilisation of poorly water-soluble drugs during in vitro lipolysis of medium- and long-chain triacylglycerols. *Eur J Pharm Sci* 23(3):287–296.
53. Porter CJH, Kaukonen AM, Boyd BJ, Edwards GA, Charman WN (2004) Susceptibility to Lipase-Mediated Digestion Reduces the Oral Bioavailability of Danazol After Administration as a Medium-Chain Lipid-Based Microemulsion Formulation. *Pharm Res* 21(8):1405–1412.
54. Heider M, Hause G, Mäder K (2016) Does the commonly used pH-stat method with back titration really quantify the enzymatic digestibility of lipid drug delivery systems? A case study on solid lipid nanoparticles (SLN). *Eur J Pharm Biopharm* 109:194–205.
55. Small DM, Cabral DJ, Cistola DP, Parks JS, Hamilton JA (1984) The Ionization Behavior of Fatty Acids and Bile Acids in Micelles and Membranes. *Hepatology* 4(S2):77S–79S.
56. Kanicky JR, Poniatowski AF, Mehta NR, Shah DO (2000) Cooperativity among Molecules at Interfaces in Relation to Various Technological Processes: Effect of Chain Length on the p Ka of Fatty Acid Salt Solutions. *Langmuir* 16(1):172–177.

57. Kumar VV, Chandrasekar D, Ramakrishna S, Kishan V, Rao YM, Diwan PV (2007) Development and evaluation of nitrendipine loaded solid lipid nanoparticles: influence of wax and glyceride lipids on plasma pharmacokinetics. *Int J Pharma* 335(1-2):167–175.
58. Williams HD, Anby MU, Sassene P, Kleberg K, Bakala-N'Goma J-C, Calderone M, Jannin V, Igonin A, Partheil A, Marchaud D, Jule E, Vertommen J, Maio M, Blundell R, Benameur H, Carrière F, Müllertz A, Pouton CW, Porter, Christopher J H (2012) Toward the establishment of standardized in vitro tests for lipid-based formulations. 2. The effect of bile salt concentration and drug loading on the performance of type I, II, IIIA, IIIB, and IV formulations during in vitro digestion. *Mol. Pharm.* 9(11):3286–3300.
59. Hu M, Li Y, Decker EA, McClements DJ (2010) Role of calcium and calcium-binding agents on the lipase digestibility of emulsified lipids using an in vitro digestion model. *Food Hydrocolloids* 24(8):719–725.
60. Shankland W (1970) The ionic behavior of fatty acids solubilized by bile salts. *J Colloid Interf Sci* 34(1):9–25.
61. Ptak M, Egret-Charlier M, Sanson A, Bouloussa O (1980) A NMR study of the ionization of fatty acids, fatty amines and N-acylamino acids incorporated in phosphatidylcholine vesicles. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 600(2):387–397.
62. Kanicky JR, Shah DO (2002) Effect of Degree, Type, and Position of Unsaturation on the pKa of Long-Chain Fatty Acids. *J of Colloid Interf Sci* 256(1):201–207.
63. Cistola DP, Hamilton JA, Jackson D, Small DM (1988) Ionization and phase behavior of fatty acids in water: application of the Gibbs phase rule. *Biochemistry* 27(6):1881–1888.
64. Fernandez S, Rodier J-D, Ritter N, Mahler B, Demarne F, Carrière F, Jannin V (2008) Lipolysis of the semi-solid self-emulsifying excipient Gelucire® 44/14 by digestive lipases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1781(8):367–375.
65. Feeney OM, Williams HD, Pouton CW, Porter, Christopher J H (2014) 'Stealth' lipid-based formulations: poly(ethylene glycol)-mediated digestion inhibition improves oral bioavailability of a model poorly water soluble drug. *J Control Release* 192:219–227.
66. Harde H, Das M, Jain S (2011) Solid lipid nanoparticles: an oral bioavailability enhancer vehicle. *Expert Opin Drug Deliv* 8(11):1407–1424.
67. Torchilin V, Amiji MM (2011) *Handbook of Materials for Nanomedicine. Chapter 9: Solid Lipid Nanoparticles (SLN) for Drug Delivery* (Kuntsche, J.; Mäder, K.), 1. Aufl. Pan Stanford Publishing, Singapore
68. Fricker G, Kromp T, Wendel A, Blume A, Zirkel J, Rebmann H, Setzer C, Quinkert R-O, Martin F, Müller-Goymann C (2010) Phospholipids and lipid-based formulations in oral drug delivery. *Pharm Res* 27(8):1469–1486.
69. Severino P, Andreani T, Macedo AS, Fangueiro JF, Santana, Maria Helena A, Silva AM, Souto EB (2012) Current State-of-Art and New Trends on Lipid Nanoparticles (SLN and NLC) for Oral Drug Delivery. *Journal of Drug Delivery* 2012:750891.

70. Lippacher A, Müller RH, Mäder K (2004) Liquid and semisolid SLN dispersions for topical application: rheological characterization. *Eur J Pharm Biopharm* 58(3):561–567.
71. Wissing SA, Müller RH (2003) The influence of solid lipid nanoparticles on skin hydration and viscoelasticity – in vivo study. *Eur J Pharm Biopharm* 56(1):67–72.
72. Khurana S, Bedi PMS, Jain NK (2013) Preparation and evaluation of solid lipid nanoparticles based nanogel for dermal delivery of meloxicam. *Chem Phys Lipids* 175-176:65–72.
73. Sarmento B, Martins S, Ferreira D, Souto EB (2007) Oral insulin delivery by means of solid lipid nanoparticles. *Int J Nanomedicine* 2(4):743–749
74. Gentile P, Chiono V, Carmagnola I, Hatton PV (2014) An overview of poly(lactic-co-glycolic) acid (PLGA)-based biomaterials for bone tissue engineering. *Int J Mol Sci* 15(3):3640–3659.
75. Kempe S, Metz H, Pereira PGC, Mäder K (2010) Non-invasive in vivo evaluation of in situ forming PLGA implants by benchtop magnetic resonance imaging (BT-MRI) and EPR spectroscopy. *Eur J Pharm Biopharm* 74(1):102–108.
76. Jain RA (2000) The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) devices. *Biomaterials* 21(23):2475–2490.
77. Vega E, Gamisans F, García ML, Chauvet A, Lacoulonche F, Egea MA (2008) PLGA nanospheres for the ocular delivery of flurbiprofen. Drug release and interactions. *J Pharm Sci* 97(12):5306–5317.
78. Plontke SK, Glien A, Rahne T, Mäder K, Salt AN (2014) Controlled Release Dexamethasone Implants in the Round Window Niche for Salvage Treatment of Idiopathic Sudden Sensorineural Hearing Loss. *Otology & Neurotology*:1.
79. Martin-Banderas L, Duran-Lobato M, Munoz-Rubio I, Alvarez-Fuentes J, Fernandez-Arevalo M, A. Holgado M (2013) Functional PLGA NPs for Oral Drug Delivery. *Recent Strategies and Developments. Mini Reviews in Medicinal Chemistry* 13(1):58–69.
80. Shakweh M, Besnard M, Nicolas V, Fattal E (2005) Poly (lactide-co-glycolide) particles of different physicochemical properties and their uptake by peyer's patches in mice. *Eur J Pharm Biopharm* 61(1-2):1–13.
81. Simon LC, Sabliov CM (2014) The effect of nanoparticle properties, detection method, delivery route and animal model on poly(lactic-co-glycolic) acid nanoparticles biodistribution in mice and rats. *Drug Metab Rev* 46(2):128–141.
82. Semete B, Booyesen L, Lemmer Y, Kalombo L, Katata L, Verschoor J, Swai HS (2010) In vivo evaluation of the biodistribution and safety of PLGA nanoparticles as drug delivery systems. *Nanomedicine* 6(5):662–671.
83. Zhang X, Sun M, Zheng A, Cao D, Bi Y, Sun J (2012) Preparation and characterization of insulin-loaded bioadhesive PLGA nanoparticles for oral administration. *Eur J Pharm Sci* 45(5):632–638.
84. Le Ray AM, Vert M, Gautier JC, Benoît JP (1994) Fate of [¹⁴C]poly(DL-lactide-co-glycolide) nanoparticles after intravenous and oral administration to mice. *Int J Pharm* 106(3):201–211.

85. Damgé C, Aprahamian M, Marchais H, Benoit JP, Pinget M (1996) Intestinal absorption of PLGA microspheres in the rat. *J Anat* 189 (Pt 3):491–501
86. Desai MP, Labhassetwar V, Amidon GL, Levy RJ (1996) Gastrointestinal Uptake of Biodegradable Microparticles: Effect of Particle Size. *Pharm Res* 13(12):1838–1845.
87. Tahara K, Samura S, Tsuji K, Yamamoto H, Tsukada Y, Bando Y, Tsujimoto H, Morishita R, Kawashima Y (2011) Oral nuclear factor- κ B decoy oligonucleotides delivery system with chitosan modified poly(D,L-lactide-co-glycolide) nanospheres for inflammatory bowel disease. *Biomaterials* 32(3):870–878.
88. Kawashima Y, Yamamoto H, Takeuchi H, Kuno Y (2000) Mucoadhesive DL-lactide/glycolide copolymer nanospheres coated with chitosan to improve oral delivery of elcatonin. *Pharm Dev Technol* 5(1):77–85.
89. Semete B, Booyesen LIJ, Kalombo L, Venter JD, Katata L, Ramalapa B, Verschoor JA, Swai H (2010) In vivo uptake and acute immune response to orally administered chitosan and PEG coated PLGA nanoparticles. *Toxicol Appl Pharmacol* 249(2):158–165.
90. Garinot M, Fiévez V, Pourcelle V, Stoffelbach F, Des Rieux A, Plapied L, Theate I, Freichels H, Jérôme C, Marchand-Brynaert J, Schneider Y-J, Préat V (2007) PEGylated PLGA-based nanoparticles targeting M cells for oral vaccination. *J Control Release* 120(3):195–204.
91. Yin Y, Chen D, Qiao M, Lu Z, Hu H (2006) Preparation and evaluation of lectin-conjugated PLGA nanoparticles for oral delivery of thymopentin. *J Control Release* 116(3):337–345.
92. Mo Y, Lim L-Y (2005) Preparation and in vitro anticancer activity of wheat germ agglutinin (WGA)-conjugated PLGA nanoparticles loaded with paclitaxel and isopropyl myristate. *J Control Release* 107(1):30–42.
93. Gutierrez I, Hernández RM, Igartua M, Gascón AR, Pedraz JL (2003) Immune responses to orally administered PLGA microparticles: influence of oil vehicles and surfactive agents. *J Microencapsul* 20(4):525–536.
94. Jung T-S, Kwon B-S, Lee H-E, Kim A-Y, Lee M-J, Park C-R, Kang H-K, Kim Y-D, Lee S-K, Kang J-S, Choi G-J (2009) Enhanced oral absorption of salmon calcitonin-encapsulated PLGA nanoparticles by adding organic substances. *Korean J. Chem. Eng.* 26(1):131–135.
95. Mante A, Heider M, Zlomke C, Mäder K (2016) PLGA nanoparticles for peroral delivery: How important is pancreatic digestion and can we control it? *Eur J Pharm Biopharm* 108:32–40.
96. O'Donnell KP, Williams III RO (2011) Nanoparticulate systems for oral drug delivery to the colon. *IJNT* 8(1/2):4.
97. Lautenschläger C, Schmidt C, Lehr C-M, Fischer D, Stallmach A (2013) PEG-functionalized microparticles selectively target inflamed mucosa in inflammatory bowel disease. *Eur J Pharm Biopharm* 85(3):578–586.
98. Lamprecht A, Schäfer U, Lehr CM (2001) Size-dependent bioadhesion of micro- and nanoparticulate carriers to the inflamed colonic mucosa. *Pharm Res* 18(6):788–793

99. Lamprecht A, Ubrich N, Yamamoto H, Schäfer U, Takeuchi H, Maincent P, Kawashima Y, Lehr C-M (2001) Biodegradable Nanoparticles for Targeted Drug Delivery in Treatment of Inflammatory Bowel Disease. *J Pharmacol Exp Ther* Vol. 299, No. 2:775–781
100. Meissner Y, Pellequer Y, Lamprecht A (2006) Nanoparticles in inflammatory bowel disease: particle targeting versus pH-sensitive delivery. *Int J Pharm* 316(1-2):138–143.
101. Lamprecht A, Yamamoto H, Takeuchi H, Kawashima Y (2005) A pH-sensitive microsphere system for the colon delivery of tacrolimus containing nanoparticles. *J Control Release* 104(2):337–346.
102. Ali H, Weigmann B, Neurath MF, Collnot EM, Windbergs M, Lehr C-M (2014) Budesonide loaded nanoparticles with pH-sensitive coating for improved mucosal targeting in mouse models of inflammatory bowel diseases. *J Control Release* 183:167–177.
103. Belouqui A, Coco R, Memvanga PB, Ucakar B, Des Rieux A, Pr at V (2014) pH-sensitive nanoparticles for colonic delivery of curcumin in inflammatory bowel disease. *Int J Pharm* 473(1-2):203–212.
104. Landry F, Bazile DV, Splenlehauer G, Veillard M, Kreuter J (1996) Degradation of poly(D,L-lactic acid) nanoparticles coated with albumin in model digestive fluids (USP XXII). *Biomaterials* 17(7):715–723.
105. Reix N, Parat A, Seyfritz E, Van der Werf, Remmelt, Epure V, Ebel N, Danicher L, Marchioni E, Jeandidier N, Pinget M, Fr ere Y, Sigrist S (2012) In vitro uptake evaluation in Caco-2 cells and in vivo results in diabetic rats of insulin-loaded PLGA nanoparticles. *Int J Pharm* 437(1-2):213–220.
106. Landry FB, Bazile DV, Splenlehauer G, Veillard M, Kreuter J (1997) Release of the fluorescent marker Prodan® from poly(D,L-lactic acid) nanoparticles coated with albumin or polyvinyl alcohol in model digestive fluids (USP XXII). *J Control Release* 44(2-3):227–236.
107. Tobio M, Sánchez A, Vila A, Soriano I, Evora C, Vila-Jato JL, Alonso MJ (2000) The role of PEG on the stability in digestive fluids and in vivo fate of PEG-PLA nanoparticles following oral administration. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 18(3-4):315–323.
108. Treuting PM, Valasek MA, Dintzis SM (2012) Upper Gastrointestinal Tract. In: Treuting PM, Dintzis S (Hrsg) *Comparative anatomy and histology. A mouse and human atlas* ; [expert consult, activate at expertconsult.com, searchable full text online], 1. Aufl. Elsevier Acad. Press, Amsterdam, S 155–175
Die Modifizierung der Abb. 6 und 47 umfasst die deutsche Übersetzung.
109. Salomon F-V, Geyer H, Gille U (Hrsg) (2008) *Anatomie für die Tiermedizin*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart
110. Schulte F (1958) Speiseröhre, Magen, Darm und Bauchfell. In: Bargmann W, Becker V, Berberich J et al (Hrsg) *Pathologie der Laboratoriumstiere*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, S 99–130

111. Treuting PM, Dintzis SM (2012) Lower Gastrointestinal Tract. In: Treuting PM, Dintzis S (Hrsg) Comparative anatomy and histology. A mouse and human atlas; [expert consult, activate at expertconsult.com, searchable full text online], 1. Aufl. Elsevier Acad. Press, Amsterdam, S 177–192
112. Gruber P, Longer MA, Robinson JR (1987) Some biological issues in oral, controlled drug delivery. *Adv Drug Deliver Rev* 1(1):1–18.
113. Navarro SM, Darensbourg C, Cross L, Stout R, Coulon D, Astete CE, Morgan T, Sabliov CM (2014) Biodistribution of PLGA and PLGA/chitosan nanoparticles after repeat-dose oral delivery in F344 rats for 7 days. *Therapeutic delivery* 5(11):1191–1201.
114. Lehr C-M, Bouwstra JA, Tukker JJ, Junginger HE (1990) Intestinal transit of bioadhesive microspheres in an in situ loop in the rat—A comparative study with copolymers and blends based on poly(acrylic acid). *J Control Release* 13(1):51–62.
115. Maisel K, Ensign L, Reddy M, Cone R, Hanes J (2015) Effect of surface chemistry on nanoparticle interaction with gastrointestinal mucus and distribution in the gastrointestinal tract following oral and rectal administration in the mouse. *J Control Release* 197:48–57.
116. Tirosh B, Rubinstein A (1998) Migration of adhesive and nonadhesive particles in the rat intestine under altered mucus secretion conditions. *J Pharm Sci* 87(4):453–456.
117. Goto T, Morishita M, Kavimandan NJ, Takayama K, Peppas NA (2006) Gastrointestinal transit and mucoadhesive characteristics of complexation hydrogels in rats. *J Pharm Sci* 95(2):462–469.
118. Zhang Z, Bu H, Gao Z, Huang Y, Gao F, Li Y (2010) The characteristics and mechanism of simvastatin loaded lipid nanoparticles to increase oral bioavailability in rats. *Int J Pharm* 394(1-2):147–153.
119. Etrych T, Lucas H, Janoušková O, Chytil P, Mueller T, Mäder K (2016) Fluorescence optical imaging in anticancer drug delivery. *J Control Release* 226:168–181.
120. Heinrich A-K, Lucas H, Schindler L, Chytil P, Etrych T, Mäder K, Mueller T (2016) Improved Tumor-Specific Drug Accumulation by Polymer Therapeutics with pH-Sensitive Drug Release Overcomes Chemotherapy Resistance. *Mol Cancer Ther* 15(5):998–1007.
121. Schädlich A, Caysa H, Mueller T, Tenambergen F, Rose C, Göpferich A, Kuntsche J, Mäder K (2011) Tumor accumulation of NIR fluorescent PEG-PLA nanoparticles. Impact of particle size and human xenograft tumor model. *ACS Nano* 5(11):8710–8720.
122. Levenson RM, Mansfield JR (2006) Multispectral imaging in biology and medicine. *Slices of life. Cytometry A* 69(8):748–758.
123. Lee C-M, Jeong H-J, Yun K-N, Kim DW, Sohn M-H, Lee JK, Jeong J, Lim ST (2012) Optical imaging to trace near infrared fluorescent zinc oxide nanoparticles following oral exposure. *Int J Nanomedicine* 7:3203–3209.
124. Chen C-C, Tsai T-H, Huang Z-R, Fang J-Y (2010) Effects of lipophilic emulsifiers on the oral administration of lovastatin from nanostructured lipid carriers: physicochemical characterization and pharmacokinetics. *Eur J Pharm Biopharm* 74(3):474–482.

125. Panthani MG, Khan TA, Reid DK, Hellebusch DJ, Rasch MR, Maynard JA, Korgel BA (2013) In vivo whole animal fluorescence imaging of a microparticle-based oral vaccine containing (CuInSe(x)S(2-x))/ZnS core/shell quantum dots. *Nano Lett* 13(9):4294–4298.
126. Fessi H, Puisieux F, Devissaguet JP, Ammoury N, Benita S (1989) Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *Int J Pharm* 55(1):R1-R4.
127. Hilderbrand SA, Weissleder R (2010) Near-infrared fluorescence. Application to in vivo molecular imaging. *Curr Opin Chem Biol* 14(1):71–79.
128. Negrin RS, Contag CH (2006) In vivo imaging using bioluminescence. A tool for probing graft-versus-host disease. *Nat Rev Immunol* 6(6):484–490.
129. Kostewicz ES, Abrahamsson B, Brewster M, Brouwers J, Butler J, Carlert S, Dickinson PA, Dressman J, Holm R, Klein S, Mann J, McAllister M, Minekus M, Muenster U, Müllertz A, Verwei M, Vertzoni M, Weitschies W, Augustijns P (2014) In vitro models for the prediction of in vivo performance of oral dosage forms. *Eur J Pharm Sci* 57:342–366.
130. Abdalla A, Klein S, Mäder K (2008) A new self-emulsifying drug delivery system (SE-DDS) for poorly soluble drugs: characterization, dissolution, in vitro digestion and incorporation into solid pellets. *Eur J Pharm Sci* 35(5):457–464.
131. Noack A, Oidtmann J, Kutza J, Mäder K (2012) In vitro digestion of curcuminoid-loaded lipid nanoparticles. *J Nanopart Res*:14:1113
132. S. Klein (2013) In vitro lipolysis assay as a prognostic tool for the development of lipid based drug delivery, Martin-Luther-Universität
133. Johannes Martin Oidtmann (2013) Mikroverkapselung von bioaktiven Inhaltsstoffen aus der Heidelbeere (*Vaccinium myrtillus* L.), Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
134. Farwanah H, Neubert R, Zellmer S, Raith K (2002) Improved procedure for the separation of major stratum corneum lipids by means of automated multiple development thin-layer chromatography. *Journal of Chromatography B* 780(2):443–450.
135. Liversidge GG, Cundy KC (1995) Particle size reduction for improvement of oral bioavailability of hydrophobic drugs: I. Absolute oral bioavailability of nanocrystalline danazol in beagle dogs. *Int J Pharm* 125:91–97
136. Mehnert W, Mäder K (2001) Solid lipid nanoparticles: production, characterization and applications. *Adv Drug Deliver Rev* 47(2):165–196
137. Schwarz C, Mehnert W, Lucks JS, Müller RH (1994) Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery. I. Production, characterization and sterilization. *J Control Release* 30(1):83–96.
138. Dingler A, Gohla S (2002) Production of solid lipid nanoparticles (SLN). Scaling up feasibilities. *J Microencapsul* 19(1):11–16.
139. Armand M, Borel P, Ythier P, Dutot G, Melin C, Senft M, Lafont H, Lairon D (1992) Effects of droplet size, triacylglycerol composition, and calcium on the hydrolysis of complex emulsions by pancreatic lipase. An in vitro study. *J Nutr Biochem* 3(7):333–341.

140. McClements DJ, Xiao H (2012) Potential biological fate of ingested nanoemulsions: influence of particle characteristics. *Food Funct* 3(3):202–220.
141. Salvia-Trujillo L, Qian C, Martín-Belloso O, McClements DJ (2013) Influence of particle size on lipid digestion and β -carotene bioaccessibility in emulsions and nanoemulsions. *Food Chemistry* 141(2):1472–1480.
142. Jenning V, Lippacher A, Gohla SH (2002) Medium scale production of solid lipid nanoparticles (SLN) by high pressure homogenization. *J Microencapsul* 19(1):1–10.
143. Helgason T, Awad TS, Kristbergsson K, McClements DJ, Weiss J (2009) Effect of surfactant surface coverage on formation of solid lipid nanoparticles (SLN). *J Colloid Interf Sci* 334(1):75–81.
144. Keck CM (2010) Particle size analysis of nanocrystals: improved analysis method. *Int J Pharm* 390(1):3–12.
145. Kovačević AB, Müller RH, Savić SD, Vuleta GM, Keck CM (2014) Solid lipid nanoparticles (SLN) stabilized with polyhydroxy surfactants: Preparation, characterization and physical stability investigation. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 444:15–25.
146. Bunjes H (2010) Lipid nanoparticles for the delivery of poorly water-soluble drugs. *J Pharm Pharmacol* 62(11):1637–1645.
147. Gaumet M, Vargas A, Gurny R, Delie F (2008) Nanoparticles for drug delivery: the need for precision in reporting particle size parameters. *Eur J Pharm Biopharm* 69(1):1–9.
148. Filipe V, Hawe A, Jiskoot W (2010) Critical evaluation of Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) by NanoSight for the measurement of nanoparticles and protein aggregates. *Pharm Res* 27(5):796–810.
149. Friedrich RB, Kann B, Coradini K, Offerhaus HL, Beck RCR, Windbergs M (2015) Skin penetration behavior of lipid-core nanocapsules for simultaneous delivery of resveratrol and curcumin. *Eur J Pharm Sci* 78:204–213.
150. Neves AR, Lúcio M, Martins S, Lima, José Luís Costa, Reis S (2013) Novel resveratrol nanodelivery systems based on lipid nanoparticles to enhance its oral bioavailability. *Int J Nanomedicine* 8:177–187.
151. Martins S, Costa-Lima S, Carneiro T, Cordeiro-da-Silva A, Souto EB, Ferreira DC (2012) Solid lipid nanoparticles as intracellular drug transporters: an investigation of the uptake mechanism and pathway. *Int J Pharm* 430(1-2):216–227.
152. Rosiaux Y, Jannin V, Hughes S, Marchaud D (2014) Solid lipid excipients - Matrix agents for sustained drug delivery. *J Control Release* 188C:18–30.
153. Westesen K, Bunjes H (1995) Do nanoparticles prepared from lipids solid at room temperature always possess a solid lipid matrix? *Int J Pharm* 115(1):129–131.
154. Jenning V, Thünemann AF, Gohla SH (2000) Characterisation of a novel solid lipid nanoparticle carrier system based on binary mixtures of liquid and solid lipids. *Int J Pharma* 199(2):167–177.
155. Jenning V, Gohla S (2000) Comparison of wax and glyceride solid lipid nanoparticles (SLN[®]). *Int J Pharm* 196(2):219–222.

156. Schwarz C, Mehnert W (1997) Freeze-drying of drug-free and drug-loaded solid lipid nanoparticles (SLN). *Int J Pharm* 157(2):171–179.
157. Zimmermann E, Müller RH, Mäder K (2000) Influence of different parameters on reconstitution of lyophilized SLN. *Int J Pharma* 196(2):211–213.
158. Wulff-Pérez M, Vicente J de, Martín-Rodríguez A, Gálvez-Ruiz MJ (2012) Controlling lipolysis through steric surfactants: new insights on the controlled degradation of submicron emulsions after oral and intravenous administration. *Int J Pharm* 423(2):161–166.
159. Reis PM, Raab TW, Chuat JY, Leser ME, Miller R, Watzke HJ, Holmberg K (2008) Influence of Surfactants on Lipase Fat Digestion in a Model Gastro-intestinal System. *Food Biophys* 3(4):370–381.
160. Christiansen A, Backensfeld T, Weitschies W (2010) Effects of non-ionic surfactants on in vitro triglyceride digestion and their susceptibility to digestion by pancreatic enzymes. *Eur J Pharm Sci* 41(2):376–382.
161. Hadváry P, Sidler W, Meister W, Vetter W, Wolfer H (1991) The lipase inhibitor tetrahydrolipstatin binds covalently to the putative active site serine of pancreatic lipase. *J Biol Chem* 266(4):2021–2027
162. Hadváry P, Lengsfeld H, Wolfer H (1988) Inhibition of pancreatic lipase in vitro by the covalent inhibitor tetrahydrolipstatin. *Biochem. J.* 256(2):357–361.
163. Olbrich C, Müller RH (1999) Enzymatic degradation of SLN-effect of surfactant and surfactant mixtures. *Int J Pharm* 180(1):31–39
164. Müller RH, Rühl D, Runge SA (1996) Biodegradation of solid lipid nanoparticles as a function of lipase incubation time. *Int J Pharm* 144(1):115–121.
165. Borgström B, Erlanson C (1973) Pancreatic Lipase and Co-Lipase. Interactions and Effects of Bile Salts and Other Detergents. *Eur J Biochem* 37(1):60–68.
166. Mante A (2014) Impact of Various Factors on Enzymatic Degradation of Polymeric Drug Carriers. Masterarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
167. Sahoo SK, Panyam J, Prabha S, Labhasetwar V (2002) Residual polyvinyl alcohol associated with poly (d,l-lactide-co-glycolide) nanoparticles affects their physical properties and cellular uptake. *J Control Release* 82(1):105–114.
168. Astete CE, Sabliov CM (2006) Synthesis and characterization of PLGA nanoparticles. *J Biomat Sci-Polym E* 17(3):247–289.
169. Barichello JM, Morishita M, Takayama K, Nagai T (1999) Encapsulation of hydrophilic and lipophilic drugs in PLGA nanoparticles by the nanoprecipitation method. *Drug Dev Ind Pharm* 25(4):471–476.
170. Yadav KS, Sawant KK (2010) Modified nanoprecipitation method for preparation of cytarabine-loaded PLGA nanoparticles. *AAPS PharmSciTech* 11(3):1456–1465.
171. Yallapu MM, Gupta BK, Jaggi M, Chauhan SC (2010) Fabrication of curcumin encapsulated PLGA nanoparticles for improved therapeutic effects in metastatic cancer cells. *J Colloid Interf Sci* 351(1):19–29.

172. Niwa T, Takeuchi H, Hino T, Kunou N, Kawashima Y (1994) In Vitro Drug Release Behavior of D, L-Lactide/Glycolide Copolymer (PLGA) Nanospheres with Nafarelin Acetate Prepared by a Novel Spontaneous Emulsification Solvent Diffusion Method. *J Pharm Sci* 83(5):727–732.
173. Song KC, Lee HS, Chung IY, Cho KI, Ahn Y, Choi EJ (2006) The effect of type of organic phase solvents on the particle size of poly(d,l-lactide-co-glycolide) nanoparticles. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 276(1-3):162–167.
174. van de Ven H, Paulussen C, Feijens PB, Matheussen A, Rombaut P, Kayaert P, van den Mooter G, Weyenberg W, Cos P, Maes L, Ludwig A (2012) PLGA nanoparticles and nanosuspensions with amphotericin B: Potent in vitro and in vivo alternatives to Fungizone and AmBisome. *J Control Release* 161(3):795–803.
175. Birnbaum DT, Kosmala JD, Brannon-Peppas L (2000) Optimization of Preparation Techniques for Poly(Lactic Acid-Co-Glycolic Acid) Nanoparticles. *J Nanopart Res* 2(2):173–181.
176. Xie H, Smith JW (2010) Fabrication of PLGA nanoparticles with a fluidic nanoprecipitation system. *J Nanobiotechnology* 8:18.
177. Pool H, Quintanar D, Figueroa JdD, Marinho Mano C, Bechara JEH, Godínez LA, Mendoza S (2012) Antioxidant Effects of Quercetin and Catechin Encapsulated into PLGA Nanoparticles. *J Nanomater* 2012(5):1–12.
178. Bondioli L, Costantino L, Ballestrazzi A, Lucchesi D, Boraschi D, Pellati F, Benvenuti S, Tosi G, Vandelli MA (2010) PLGA nanoparticles surface decorated with the sialic acid, N-acetylneuraminic acid. *Biomaterials* 31(12):3395–3403.
179. Zou W, Cao G, Xi Y, Zhang N (2009) New approach for local delivery of rapamycin by bioadhesive PLGA-carbopol nanoparticles. *Drug Deliv* 16(1):15–23.
180. Choi J-S, Cao J, Naeem M, Noh J, Hasan N, Choi H-K, Yoo J-W (2014) Size-controlled biodegradable nanoparticles: preparation and size-dependent cellular uptake and tumor cell growth inhibition. *Colloids Surface B Biointerfaces* 122:545–551.
181. McCarron PA, Marouf WM, Donnelly RF, Scott C (2008) Enhanced surface attachment of protein-type targeting ligands to poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles using variable expression of polymeric acid functionality. *J Biomed Mater Res A* 87(4):873–884.
182. Ameller T, Marsaud V, Legrand P, Gref R, Renoir J-M (2004) Pure antiestrogen RU 58668—loaded nanospheres. Morphology, cell activity and toxicity studies. *Eur J Pharm Sci* 21(2-3):361–370.
183. Mondal N, Halder KK, Kamila MM, Debnath MC, Pal TK, Ghosal SK, Sarkar BR, Ganguly S (2010) Preparation, characterization, and biodistribution of letrozole loaded PLGA nanoparticles in Ehrlich Ascites tumor bearing mice. *Int J Pharm* 397(1-2):194–200.
184. Tosi G, Vergoni AV, Ruozi B, Bondioli L, Badiali L, Rivasi F, Costantino L, Forni F, Vandelli MA (2010) Sialic acid and glycopeptides conjugated PLGA nanoparticles for central nervous system targeting: In vivo pharmacological evidence and biodistribution. *J Control Release* 145(1):49–57.

185. Vergoni AV, Tosi G, Tacchi R, Vandelli MA, Bertolini A, Costantino L (2009) Nanoparticles as drug delivery agents specific for CNS: in vivo biodistribution. *Nanomedicine* 5(4):369–377.
186. Yin Y, Chen D, Qiao M, Wei X, Hu H (2007) Lectin-conjugated PLGA nanoparticles loaded with thymopentin: ex vivo bioadhesion and in vivo biodistribution. *J Control Release* 123(1):27–38.
187. Fonseca C, Simões S, Gaspar R (2002) Paclitaxel-loaded PLGA nanoparticles. Preparation, physicochemical characterization and in vitro anti-tumoral activity. *J Control Release* 83(2):273–286
188. Kocbek P, Obermajer N, Cegnar M, Kos J, Kristl J (2007) Targeting cancer cells using PLGA nanoparticles surface modified with monoclonal antibody. *J Control Release* 120(1-2):18–26.
189. Holzer M, Vogel V, Mäntele W, Schwartz D, Haase W, Langer K (2009) Physicochemical characterisation of PLGA nanoparticles after freeze-drying and storage. *Eur J Pharm Biopharm* 72(2):428–437.
190. Win KY, Feng S-S (2005) Effects of particle size and surface coating on cellular uptake of polymeric nanoparticles for oral delivery of anticancer drugs. *Biomaterials* 26(15):2713–2722.
191. Gaumet M, Gurny R, Delie F (2007) Fluorescent biodegradable PLGA particles with narrow size distributions: preparation by means of selective centrifugation. *Int J Pharm* 342(1-2):222–230.
192. Fredenberg S, Wahlgren M, Reslow M, Axelsson A (2011) The mechanisms of drug release in poly(lactic-co-glycolic acid)-based drug delivery systems? A review. *Int J Pharm* 415(1-2):34–52.
193. ICSC 0501 – Lactid acid.
http://www.ilo.org/dyn/icsc/showcard.display?p_card_id=0501&p_version=2&p_lang=en. Zugegriffen: 29. März 2018
194. ICSC 1537 – Hydroxyacetic acid.
http://www.ilo.org/dyn/icsc/showcard.display?p_card_id=1537&p_version=2&p_lang=en. Zugegriffen: 29. März 2018
195. Ammon HPT, Hunnius C (op. 2004) Hunnius pharmazeutisches Wörterbuch, 9. Aufl. Walter de Gruyter, Berlin
196. Okada T, Kuwamoto T (2002) Nonsuppressor ion chromatography of inorganic and organic anions with potassium hydroxide as eluent. *Anal. Chem.* 55(7):1001–1004.
197. Murakami H, Kawashima Y, Niwa T, Hino T, Takeuchi H, Kobayashi M (1997) Influence of the degrees of hydrolyzation and polymerization of poly(vinylalcohol) on the preparation and properties of poly(dl-lactide-co-glycolide) nanoparticle. *Int J Pharm* 149(1):43–49.
198. Lee SC, Oh JT, Jang MH, Chung SI (1999) Quantitative analysis of polyvinyl alcohol on the surface of poly(D, L-lactide-co-glycolide) microparticles prepared by solvent evaporation method: effect of particle size and PVA concentration. In: Jolicoeur P (Hrsg) *Introduction to Biometry*, Bd 59. Springer US, Boston, MA, S 123–132

199. Knop K, Hoogenboom R, Fischer D, Schubert US (2010) Poly(ethylene glycol) in drug delivery: pros and cons as well as potential alternatives. *Angew Chem Int Ed Engl* 49(36):6288–6308.
200. Allen TM, Hansen C (1991) Pharmacokinetics of stealth versus conventional liposomes. Effect of dose. *Biochim Biophys Acta* 1068(2):133–141
201. Immordino ML, Dosio F, Cattel L (2006) Stealth liposomes. Review of the basic science, rationale, and clinical applications, existing and potential. *Int J Nanomedicine* 1(3):297–315
202. Dong Y, Feng S-S (2005) Poly(D,L-lactide-co-glycolide)/montmorillonite nanoparticles for oral delivery of anticancer drugs. *Biomaterials* 26(30):6068–6076.
203. Reul R, Tsapis N, Hillaireau H, Sancey L, Mura S, Recher M, Nicolas J, Coll J-L, Fattal E (2012) Near infrared labeling of PLGA for in vivo imaging of nanoparticles. *Polym. Chem.* 3(3):694.
204. Tosi G, Bondioli L, Ruozi B, Badiali L, Severini GM, Biffi S, Vita A de, Bortot B, Dolcetta D, Forni F, Vandelli MA (2011) NIR-labeled nanoparticles engineered for brain targeting: in vivo optical imaging application and fluorescent microscopy evidences. *J Neural Transm (Vienna)* 118(1):145–153.
205. Frequently encountered questions answered for dynamic light scattering. <https://www.malvernpanalytical.com/en/learn/knowledge-center/whitepapers/WP140404ApplicDLSProtein4FAQ.html>.
Zugegriffen: 29. Mai 2018
206. Fernandez S, Chevrier S, Ritter N, Mahler B, Demarne F, Carrière F, Jannin V (2009) In vitro gastrointestinal lipolysis of four formulations of piroxicam and cinnarizine with the self emulsifying excipients Labrasol and Gelucire 44/14. *Pharm Res* 26(8):1901–1910.
207. Doluisio JT, Billups NF, Dittert LW, Sugita ET, Swintosky JV (1969) Drug absorption. I. An in situ rat gut technique yielding realistic absorption rates. *J. Pharm. Sci.* 58(10):1196–1200
208. Lozoya-Agullo I, González-Álvarez I, González-Álvarez M, Merino-Sanjuán M, Bermejo M (2015) In Situ Perfusion Model in Rat Colon for Drug Absorption Studies. Comparison with Small Intestine and Caco-2 Cell Model. *J Pharm Sci* 104(9):3136–3145.
209. Bueno L, Ferre J-P, Ruckebusch Y (1978) Effects of anesthesia and surgical procedures on intestinal myoelectric activity in rats. *Digest Dis Sci* 23(8):690–695.
210. Wright JW, Healy TEJ, Balfour TW, Hardcastle JD (1982) Effects Of Inhalation Agents On The Electrical And Mechanical Activity Of The Rat Duodenum. *Brit J Anaesth* 54(11):1223–1230.
211. Kunjachan S, Gremse F, Theek B, Koczera P, Pola R, Pechar M, Etrych T, Ulbrich K, Storm G, Kiessling F, Lammers T (2013) Noninvasive optical imaging of nanomedicine biodistribution. *ACS Nano* 7(1):252–262.
212. Acharya S, Sahoo SK (2011) PLGA nanoparticles containing various anticancer agents and tumour delivery by EPR effect. *Adv Drug Deliver Rev* 63(3):170–183.

213. Frangioni J (2003) In vivo near-infrared fluorescence imaging. *Curr Opin Chem Biol* 7(5):626–634.
214. Schädlich A, Rose C, Kuntsche J, Caysa H, Mueller T, Göpferich A, Mäder K (2011) How stealthy are PEG-PLA nanoparticles? An NIR in vivo study combined with detailed size measurements. *Pharm Res* 28(8):1995–2007.
215. Snehalatha M, Venugopal K, Saha RN, Babbar AK, Sharma RK (2008) Etoposide loaded PLGA and PCL nanoparticles II: biodistribution and pharmacokinetics after radiolabeling with Tc-99m. *Drug Deliv* 15(5):277–287.
216. McClements DJ (2013) Edible lipid nanoparticles: Digestion, absorption, and potential toxicity. *Prog Lipid Res* 52(4):409–423.
217. Rossi S, Sandri G, Caramella CM (2005) Buccal drug delivery. A challenge already won? *Drug Discov Today Technol* 2(1):59–65.
218. Nafee NA, Boraie MA, Ismail FA, Mortada LM (2003) Design and characterization of mucoadhesive buccal patches containing cetylpyridinium chloride. *Acta Pharm* 53(3):199–212
219. Bures P, Huang Y, Oral E, Peppas NA (2001) Surface modifications and molecular imprinting of polymers in medical and pharmaceutical applications. *J Control Release* 72(1-3):25–33.
220. Ascentiis A de, deGrazia JL, Bowman CN, Colombo P, Peppas NA (1995) Mucoadhesion of poly(2-hydroxyethyl methacrylate) is improved when linear poly(ethylene oxide) chains are added to the polymer network. *J Control Release* 33(1):197–201.
221. Huang Y, Leobandung W, Foss A, Peppas NA (2000) Molecular aspects of muco- and bioadhesion. Tethered structures and site-specific surfaces. *J Control Release* 65(1-2):63–71
222. Lai SK, O'Hanlon DE, Harrold S, Man ST, Wang Y-Y, Cone R, Hanes J (2007) Rapid transport of large polymeric nanoparticles in fresh undiluted human mucus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(5):1482–1487.
223. Wang Y-Y, Lai SK, Suk JS, Pace A, Cone R, Hanes J (2008) Addressing the PEG mucoadhesivity paradox to engineer nanoparticles that „slip“ through the human mucus barrier. *Angew Chem Int Ed Engl* 47(50):9726–9729.
224. Xiao X, Ross LE, Miller RA, Lowe ME (2011) Kinetic properties of mouse pancreatic lipase-related protein-2 suggest the mouse may not model human fat digestion. *J Lipid Res* 52(5):982–990.

7 Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass die Ergebnisse der vorliegenden Dissertationsarbeit an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg unter Anleitung von Prof. Dr. Karsten Mäder selbstständig bzw. im Rahmen der angegebenen Kooperationen erarbeitet wurden und ich die Dissertation ohne fremde Hilfe angefertigt habe.

Dazu habe ich keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt. Inhaltlich oder wörtlich übernommene Stellen aus anderen Arbeiten oder Werken sind als solche kenntlich gemacht wurden.

Weiterhin erkläre ich, dass ich mich erstmals um die Erlangung eines Doktorgrades bewerbe und die vorliegende Dissertationsarbeit keiner anderen Fakultät vorgelegt wurde.

Ort, Datum

Martha Margarete Heider

8 Danksagung

Ich möchte mich ganz herzlich bei allen bedanken, die mir es ermöglicht haben diese Dissertation anzufertigen. Im Speziellen danke ich zuerst Herrn Prof. Dr. Karsten Mäder für die Möglichkeit diese Arbeit in seiner Arbeitsgruppe anfertigen zu können sowie für die stetig sehr gute Betreuung und die anregenden Gespräche in dieser Zeit.

Vielen Dank möchte ich Frau Dr. Henrike Lucas für die Unterstützung bei der Durchführung und Auswertung der *in vivo* Versuche sowie die kritische Manuskriptkorrektur aussprechen. Weiterhin möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn Tom Wersig für die Durchführung des Polymerlabelings und bei Herrn Dr. Hause und Mitarbeitern für die Anfertigung der TEM-Aufnahmen bedanken.

Frau Schwarz danke ich ganz herzlich für die Durchführung der DSC-Messungen sowie Frau Menzel für die Unterstützung bei Laborarbeiten und dem Praktikumsauf- und abbau. Frau Nies danke ich herzlich für die Einweisung in die HPTLC-Methode.

Dem Zentrallabor des Universitätsklinikums, im Besonderen Frau Dr. Mischereit, möchte ich für die Bestimmung des Gallensalzgehaltes danken.

Der Arbeitsgruppe Pharmazeutische Technologie möchte ich ganz herzlich für die schöne und unvergessliche Zeit und die vielen schönen Erinnerungen danken.

Im Besonderen gilt mein Dank Christin Zlomke für die wunderschöne Zeit im Büro mit ihr. Vielen herzlichen Dank auch an Anika Gloge für die sehr gute Zusammenarbeit bei den *in vitro* Versuchen der Polymernanopartikel und die schöne Zeit während ihrer Masterarbeit in der Arbeitsgruppe.

Ebenso möchte ich mich ganz herzlich bei Dr. Anne-Kathrin Noack, Dr. Juliane Neidel, Dr. Frederike Tenambergen und Katharina Widder für die gemeinsam verbrachte Zeit und die zahlreichen Erlebnisse bedanken.

Abschließend bedanke ich mich ganz herzlich bei meiner Familie und bei Stefan, ohne deren ständige Unterstützung das Studium und diese Arbeit nicht möglich gewesen wären.

9 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Martha Margarete Heider
Geburtsdatum: 18.08.1988
Geburtsort: Halle/Saale
Elternzeit: 07/2017 – 02/2019

Ausbildung und Berufserfahrung

02/2013 - 06/2017 Apothekerin in Teilzeit in der Paulus-Apotheke, Halle
12/2012 - 06/2017 Wissenschaftlicher Mitarbeiter in der AG Prof. Mäder,
Inst. f. Pharmazie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
11/2012 dritter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung,
Approbation zur Apothekerin
05/2012 - 10/2012 Pharmazeut im Praktikum, August-Bebel-Apotheke, Halle
10/2011 - 04/2012 Pharmazeut im Praktikum, Bayer Bitterfeld,
Bereich: Prozesstechnologie
09/2011 Zweiter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
08/2009 Erster Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
07/2008 - 08/2008 Famulatur in der Krankenhausapotheke,
Helios-Klinik, Sangerhausen
03/2008 Famulatur in der Rats-Apotheke, Sangerhausen
10/2007 - 09/2011 Studium der Pharmazie,
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
07/2007 - 08/2007 Praktikum in der Rats-Apotheke, Sangerhausen
2001 - 2007 Geschwister-Scholl-Gymnasium Sangerhausen, Abitur

Ort, Datum

Martha Margarete Heider

10 Publikationsliste

Veröffentlichungen:

A. Mante, M. Heider, C. Zlomke, K. Mäder:

PLGA nanoparticles for peroral delivery: How important is pancreatic digestion and can we control it?

European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, Vol. 108, 32-40 (2016)

doi:10.1016/j.ejpb.2016.08.009

Best Paper Award des European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2016

M. Heider, G. Hause, K. Mäder

Does the commonly used pH-stat method with back titration really quantify the enzymatic digestibility of lipid drug delivery systems? A case study on solid lipid nanoparticles (SLN).

European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, Vol. 109:194–205 (2016)

doi:10.1016/j.ejpb.2016.10.007

Konferenzbeiträge:

M. Heider, A. Mante, C. Zlomke, K. Mäder

Pancreatin induced digestion of PLGA nanoparticles

4th Congress on Innovation in Drug Delivery 2016, Antibes-Juan-les-Pins, Frankreich (Poster)

M. Heider, K. Mäder:

In vitro digestion of cetyl palmitate SLN monitored with two different readouts:

Are the pH-stat and HPTLC results equivalent?

The 42nd Annual Meeting and Exposition of the Controlled Release Society 2015, Edinburgh, Schottland (Poster)

M. Heider, A. Mante, K. Mäder:

Digestion of cetyl palmitate solid lipid nanoparticles monitored with pH-stat and back titration

3rd Galenus Workshop 2014, Greifswald, Deutschland (Poster)

M. Heider, K. Mäder:

Development and characterization of cetyl palmitate solid lipid nanoparticles for oral treatment

9th PBP World Meeting, 2014, Lissabon, Portugal (Poster)