

---

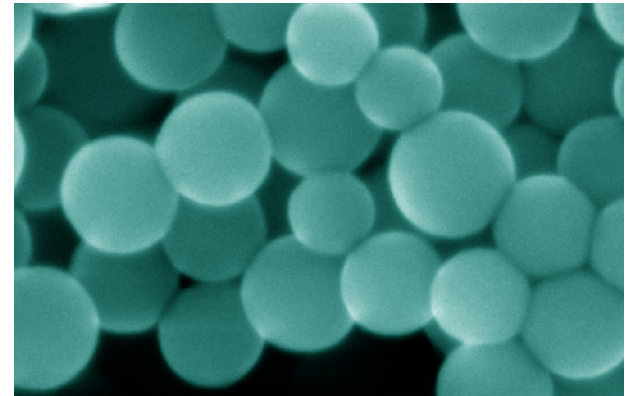
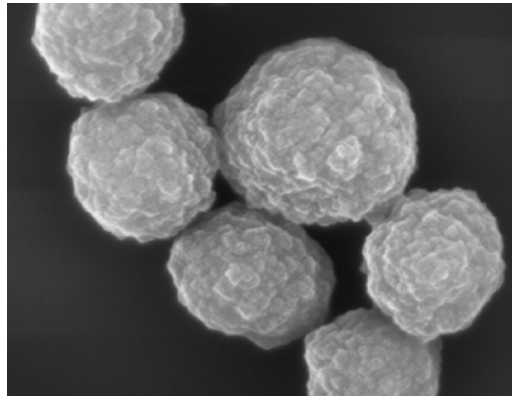
# NANOCYTES®: Herstellung anorganischer und organischer Partikelkerne mit funktioneller Schale:

## 1. Anwendung in der Medizin und Medizintechnik

Dr. Achim Weber

Fraunhofer-Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik IGB

Workshop „NANOPARTIKEL - EINSATZ IN DER MEDIZIN, CHEMIE UND VERFAHRENSTECHNIK“, materials valley, Hanau, 21.02.2013



# Erkennende Oberflächen

**Biohybride Nanopartikel**

→ Biomolekulare Selektoren

**Biomimetische Nanopartikel**

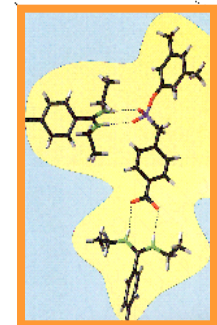
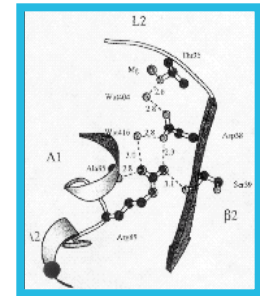
→ Synthetische Selektoren

→ Kern-Schale-Nanopartikel

Oberfläche

Molekulare  
Erkennung

Ligand



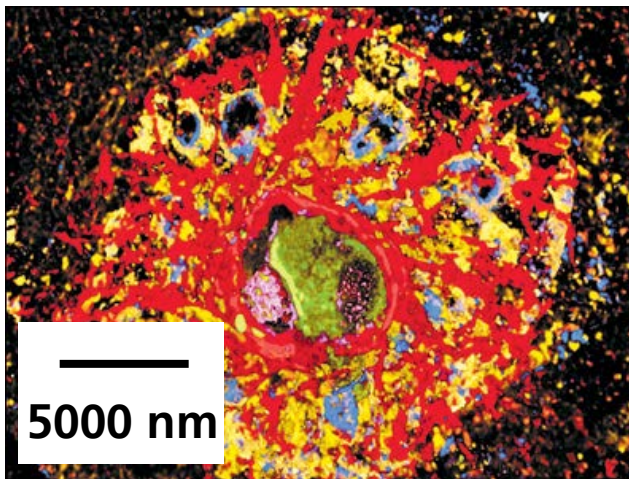
# Gliederung

- NANOCYTES®
- Anorganische Nanopartikel mit  $\text{SiO}_x$  als Basis für einstellbare und definierbare Partikeleigenschaften
  - Herstellung, Funktionalisierung & Produktion
  - Beispiel: TNF-NANOCYTES®
  - Beispiel: partikelbasierte Mikroarrays
- Organische Nanopartikel als Drug Delivery Systeme
  - Doppelte Emulsion, Wirkstoffbeladung
  - Sprühverfahren
  - Beispiele: Interfeon-Beta, Dexpanthenol

# Biomimetische Nanopartikel

## Zellen (Zyten)

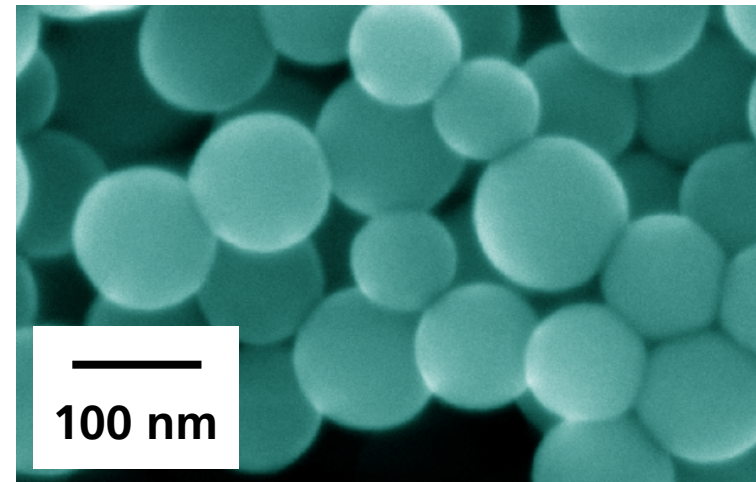
- Erkennen Moleküle
- Induzieren Signale
- Binden an Materialien
- Wechselhaft in ihrer Struktur
- Hohes Maß an Kommunikation



© Nature Biotechnology

## Nanomaterialien

- Große Kontaktfläche
- Synthetisierbar & funktionalisierbar
- Zusammensetzung klar definiert
- Hierarchische Kompositstruktur
- Zunehmend kommunikativ

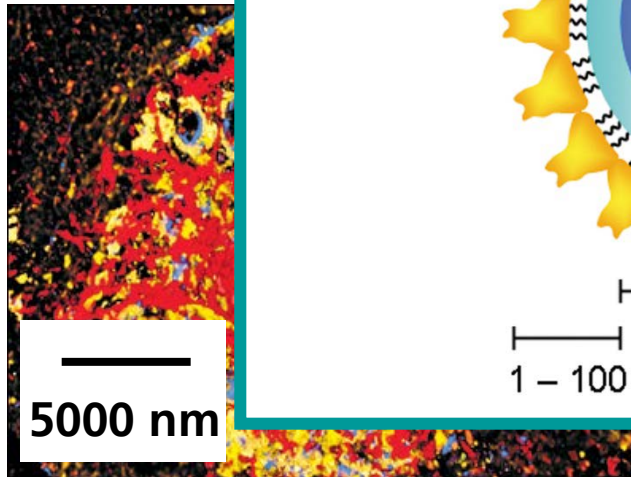


© Fraunhofer IGB

# Biomimetische Nanopartikel

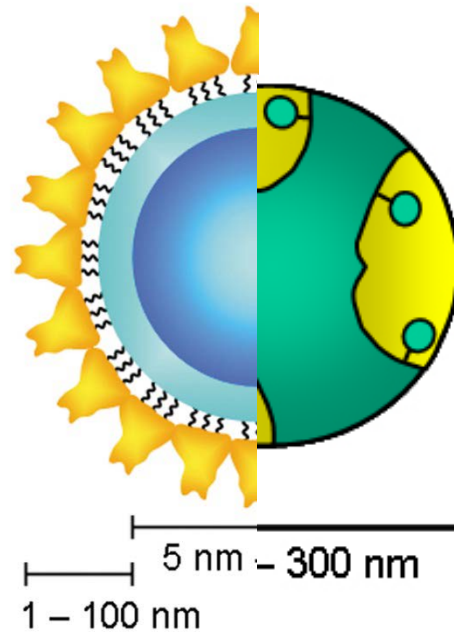
## Zellen (Zy

- Erkennen
- Induzieren
- Binden an
- Wechsel
- Hohes M



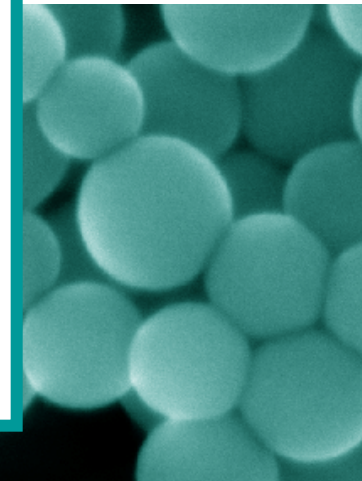
© Nature Biotechnology

## Biomimetics: NANOCYTES®



© Fraunhofer IGB

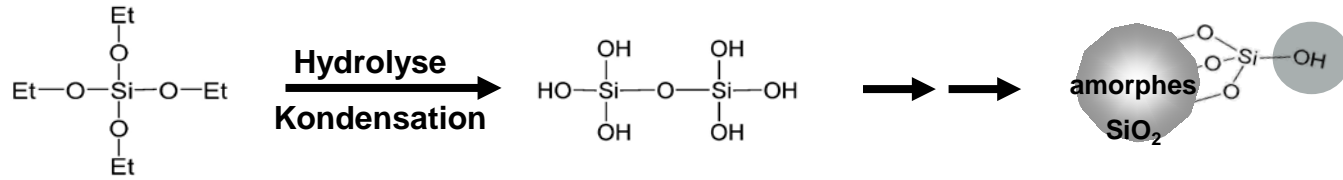
fläche  
& funktionalisierbar  
ng klar definiert  
ompositstruktur  
mmunikativ



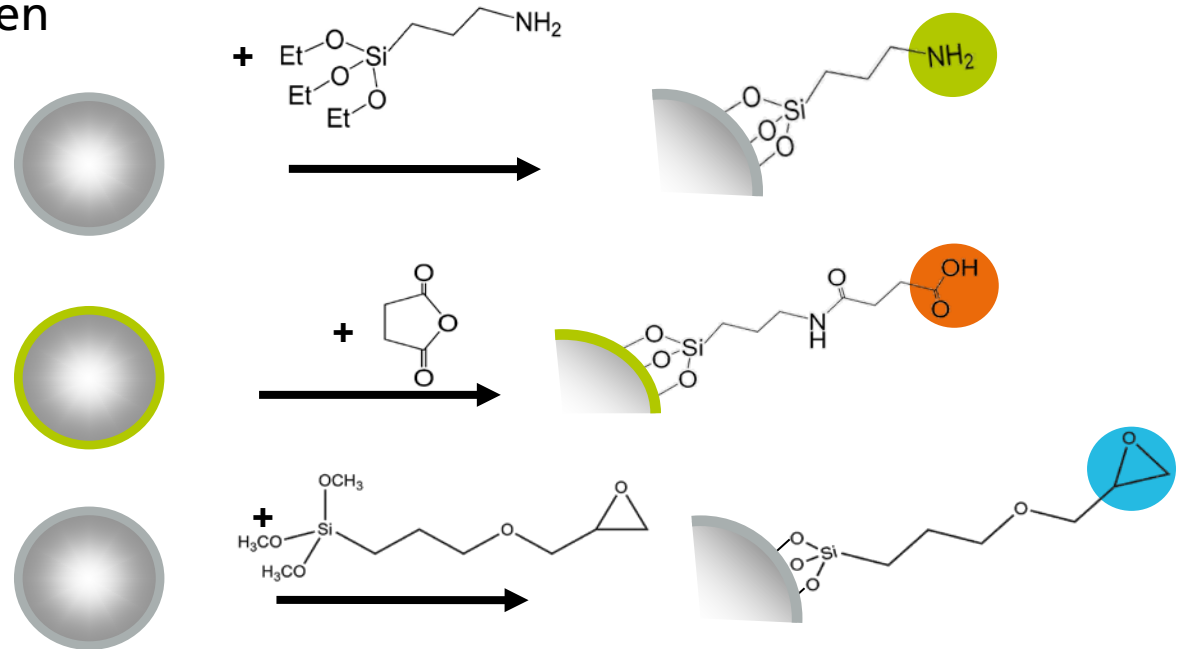
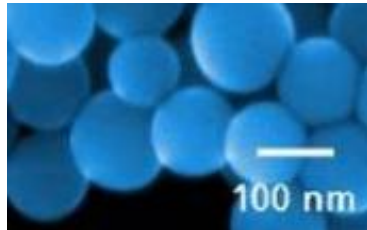
# NANOCYTES<sup>®</sup> – Anorganische Kerne

## Schalenfunktionalisierung

### ■ Synthese nach Stöber



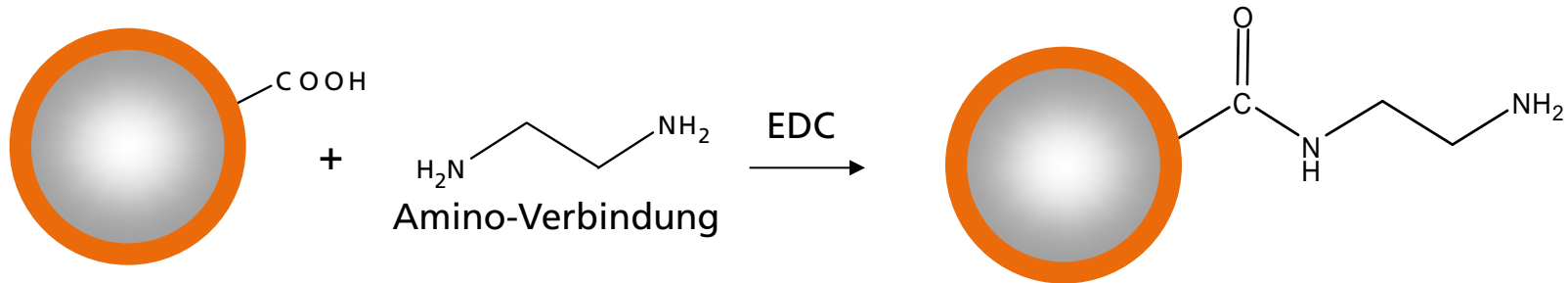
### ■ Funktionalisierungen



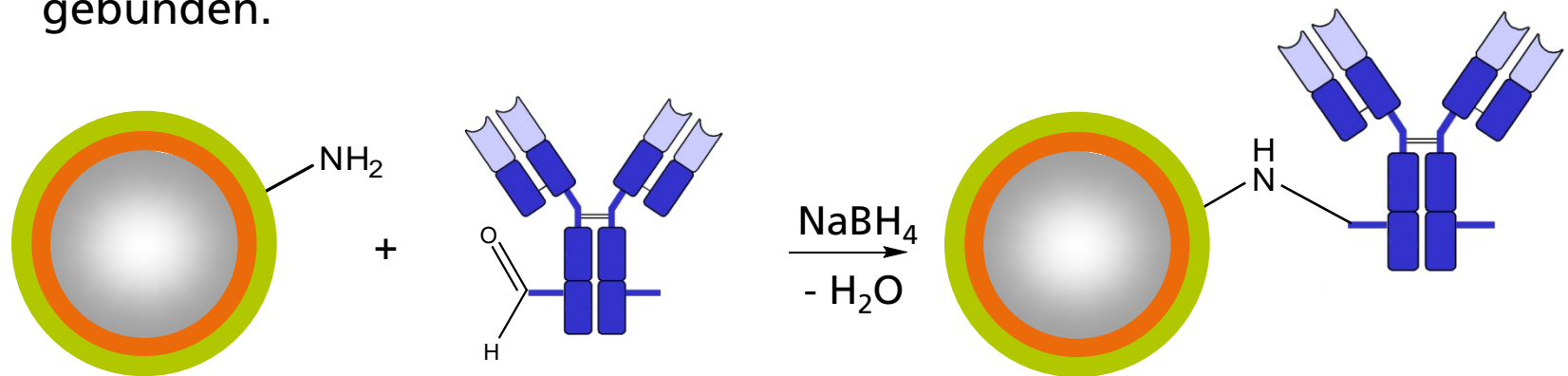
# NANOCYTES<sup>®</sup> – Anorganische Kerne

## Oberflächenmodifikationen

- Modifikation der Oberfläche durch etablierte Kopplungsreaktionen über freie Carboxy Gruppen.



- Über Carbodiimid/Natriumborhydrid und Vernetzer werden Biomoleküle gebunden.



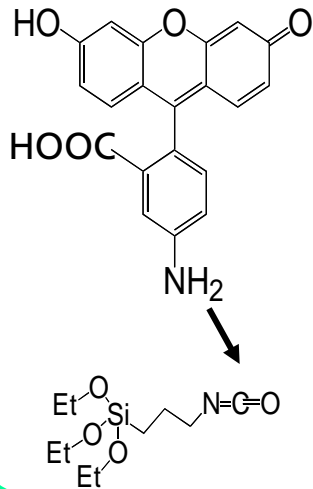
Schiestel et al., Journal of Nanoscience and Nanotechnology 4 (2004), 504-511



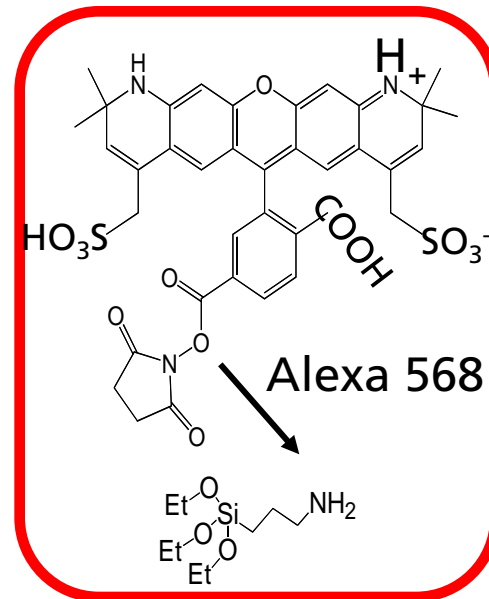
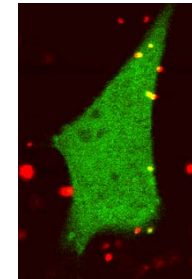
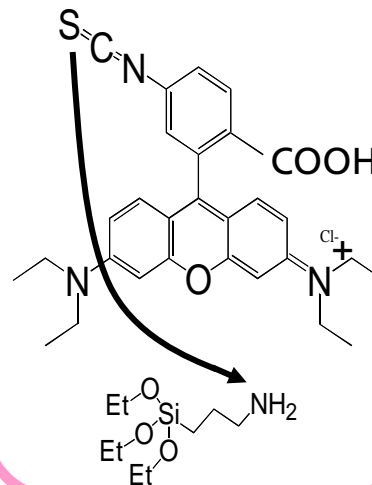
# NANOCYTES<sup>®</sup> – Anorganische Kerne SiO<sub>x</sub>

Farbstoffbeladene Kerne oder Schalen

Fluoresceinamin



Rhodamin

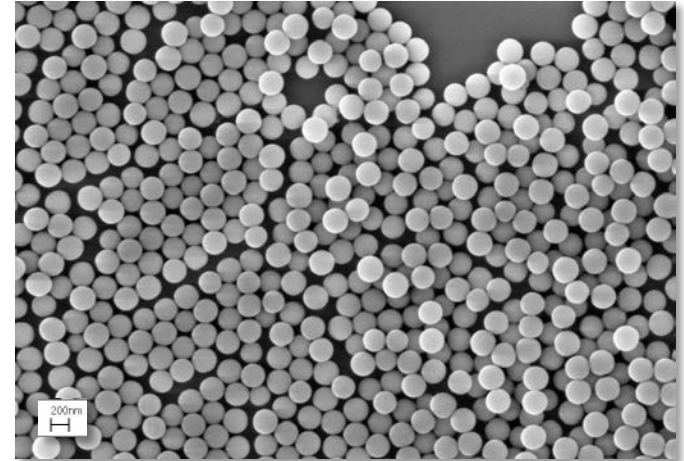




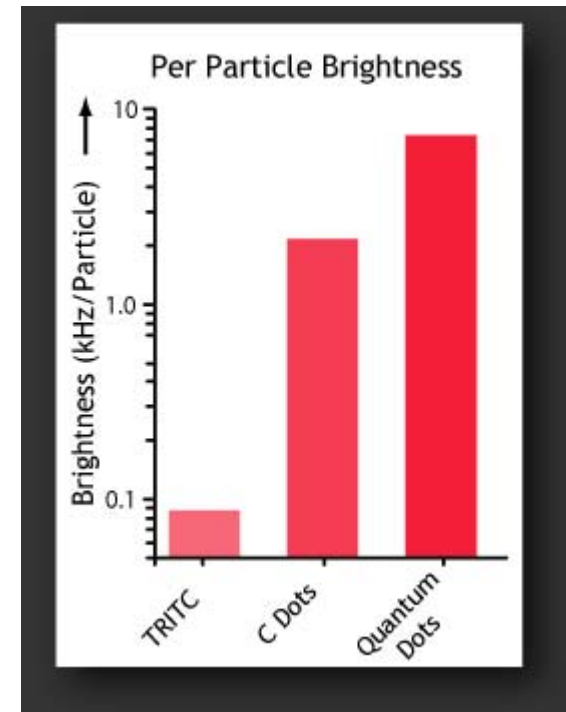
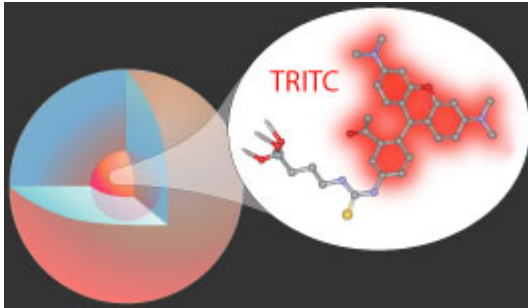
# NANOCYTES<sup>®</sup> – Anorganische Kerne SiO<sub>x</sub>

- Farbstoffbeladene Kerne
- Fluoresziernde Schalen
- Funktionelle organische Oberflächen

20 nm bis 300 nm	einstufig
> 300 nm	zweistufig



# SiO<sub>x</sub>: Anorganische Kerne – C-Dots (Wiessner Group)



A. Burns H. Ow, U. Wiesner, *Chemical Society Reviews* **35**, 1028-1042 (2006).

J. Choi, A. Burns, R. Williams, Z. Zhou, A. Flesken-Nikitin, W. Zipfel, U. Wiesner, A. Nikitin, *Journal of Biomedical Optics* **12** (6) 064007-(1-11) (2007).

H. Ow, D. Larson, M. Srivastava, B. Baird, W. Webb, U. Wiesner, *Nano Letters* **5** (1), 113-117 (2005).

# NANOCYTES® – Partikelproduktion

## Miniplant

### Reaktionseinheit:

- Automatisiert
- 1 L / 5 L Reaktionsvolumen
- inline Prozess-Analytik:
  - DLS
  - Leitfähigkeit
  - pH
  - Trübung

### Dosiereinheit:

- Automatisiert
- Gravimetrische/  
Volumetrische Dosierung

### Downstream-Einheit:

- Crossflow Filtration
- Integriert
- Automatisiert

### Computer-unterstützte Regelung:

- LabVIEW
- Mehrstufensynthese
- Daten loggen
- Online Analyse
- Automatisierte Sicherheitsroutinen

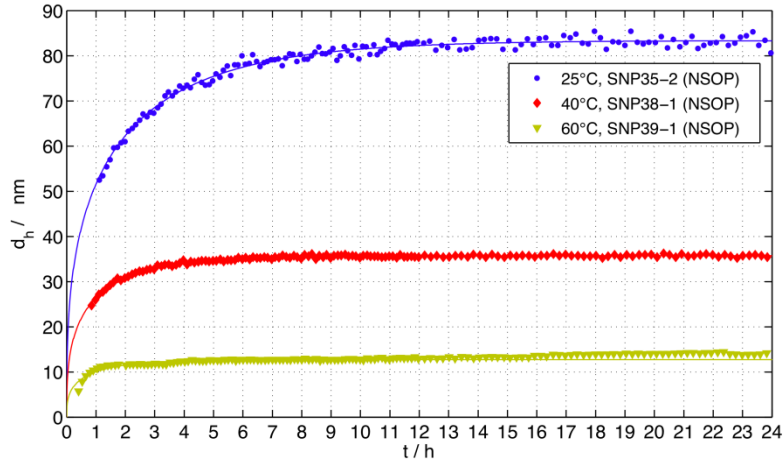


Prozessanalyse, -optimierung, -integration

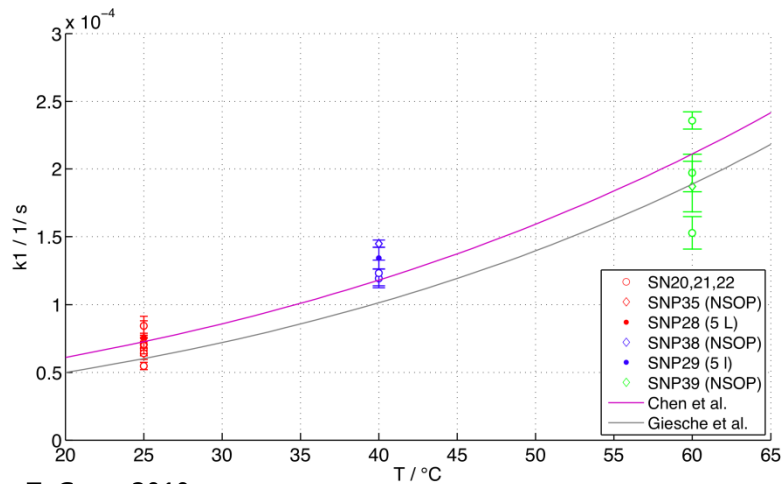
Gose et al. Virtuelle Instrumente in der Praxis VIP 2010. In *Einsatz von LabVIEW zur Prozesssteuerung und Online-Prozessanalyse in der Nanopartikeltechnologie*, 2010.

# Application process – SiO<sub>2</sub> nanoparticles

Partikelgrößenwachstum bestimmt über DLS (Microtrac Inc.)

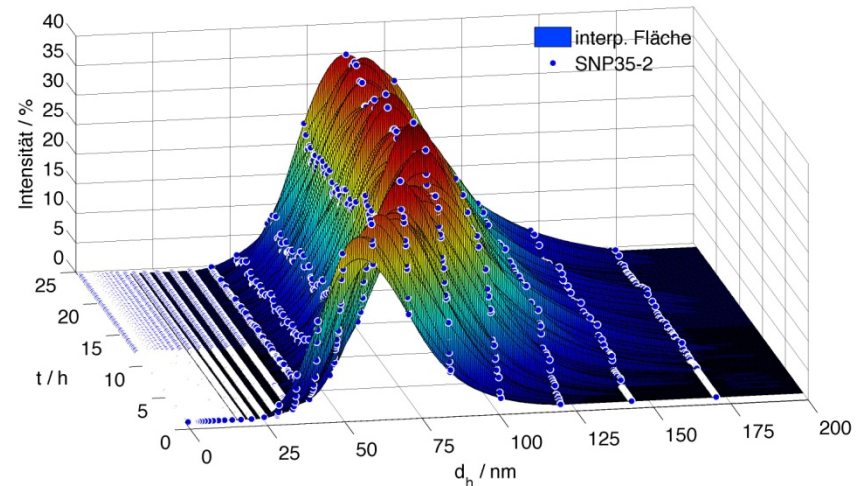


Kinetische Analyse der DLS Daten



T. Gose, 2010

Zeitaufgelöste Intensitätsverteilung



Chen et al., Industrial & Engineering Chemistry Research, 35(12):4487–4493, 1996

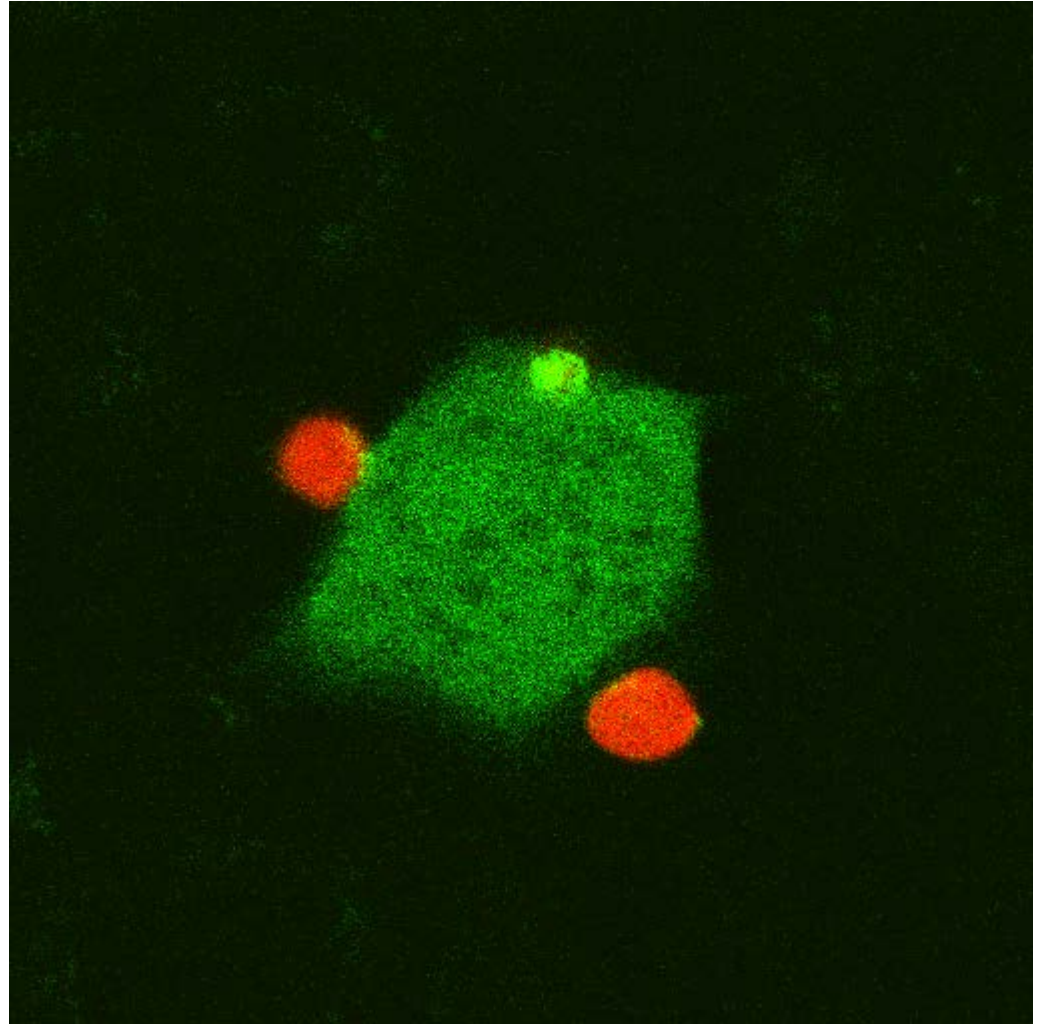
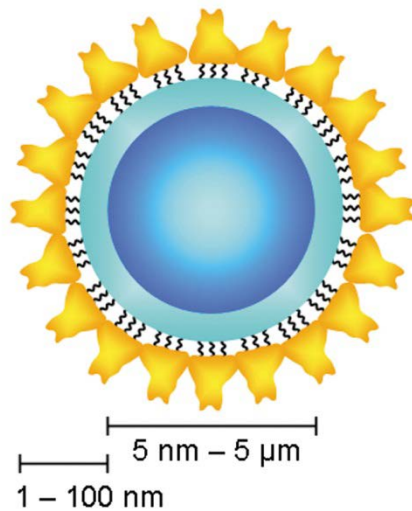
Giesche et al., Journal of the European Ceramic Society, 14:189–204, 1994.

# Gliederung

- NANOCYTES®
- Anorganische Nanopartikel mit  $\text{SiO}_x$  als Basis für einstellbare und definierbare Partikeleigenschaften
  - Herstellung, Funktionalisierung & Produktion
  - **Beispiel: TNF-NANOCYTES®**
  - Beispiel: partikelbasierte Mikroarrays
- Organische Nanopartikel als Drug Delivery Systeme
  - Doppelte Emulsion, Wirkstoffbeladung
  - Sprühverfahren
  - Beispiele: Interfeon-Beta, Dexpanthenol

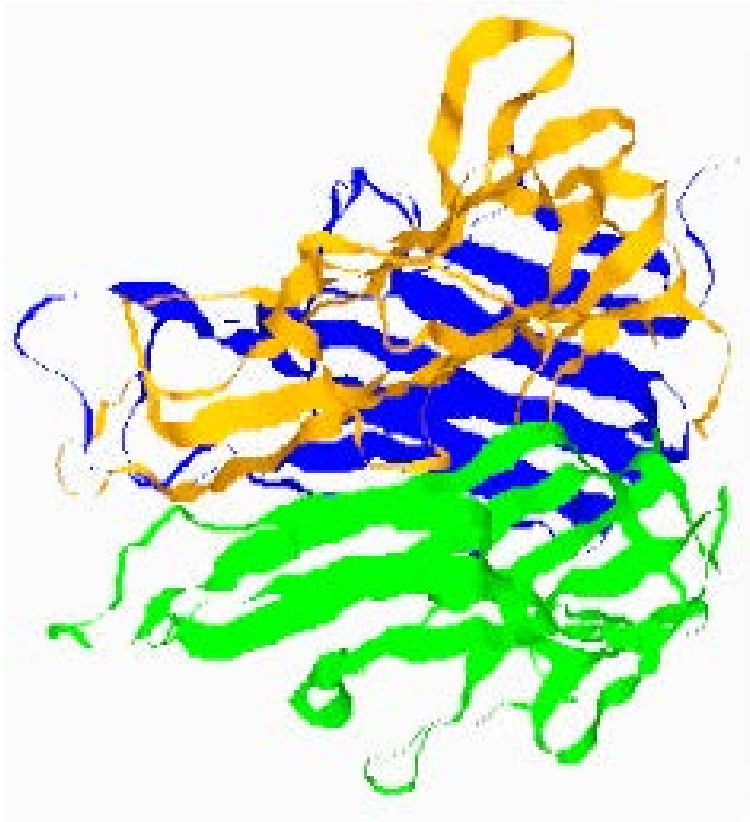
# NANOCYTES<sup>®</sup>-Technologie: Gezielte Tötung von Tumorzellen

TNF-NANOCYTES<sup>®</sup>-Wirkung auf Targetzelle (MF-R2-Fas mit FADD-GFP)





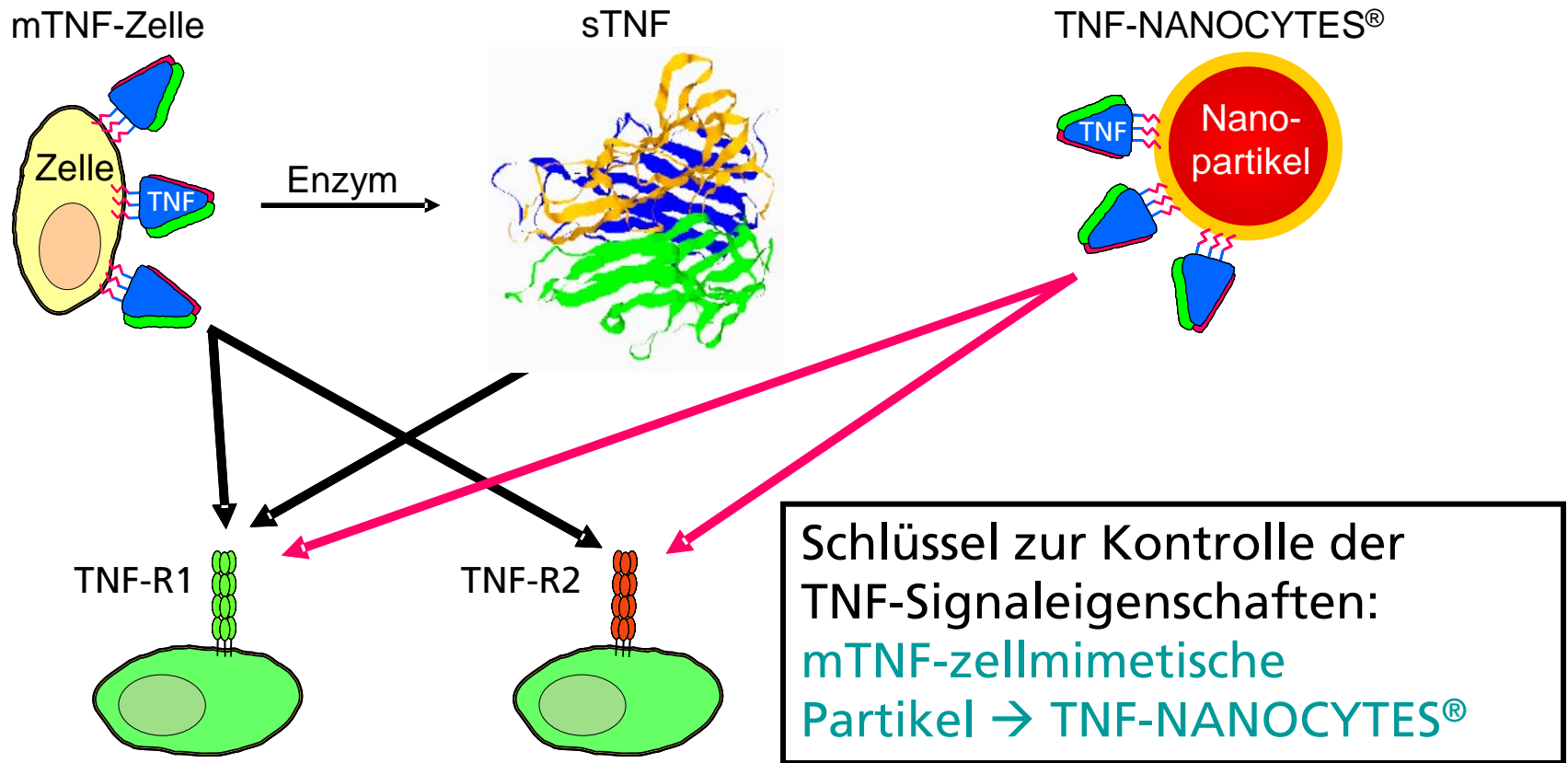
# TNF-NANOCYTES<sup>®</sup>-Technologie: TNF



- *Tumor Necrosis Factor*
- Transmembranprotein
- Auf der Zelloberfläche expremiert
- Membranständige und lösliche Form
- Tumor-Targeting Wirkstoff, aber hoch toxisch



# Funktionsprinzip von TNF-NANOCYTES®



Kooperation mit dem Institut für Zellbiologie und Immunologie, Universität Stuttgart

Tovar et al. WO **2003**/020320, EP1425306

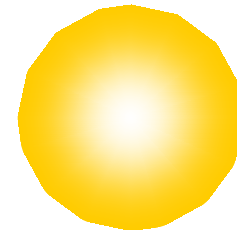
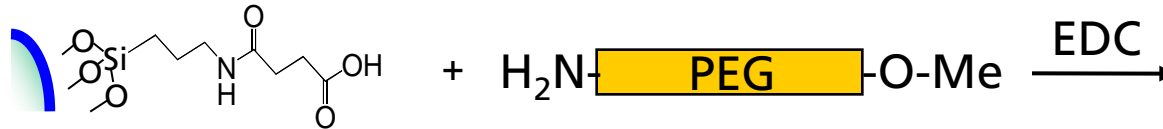
Bryde et al. *Bioconj. Chem.* **2005**, 16, 1459-1467

Weber et al. *Endoskopie heute* **2009**, 22, 36-39.

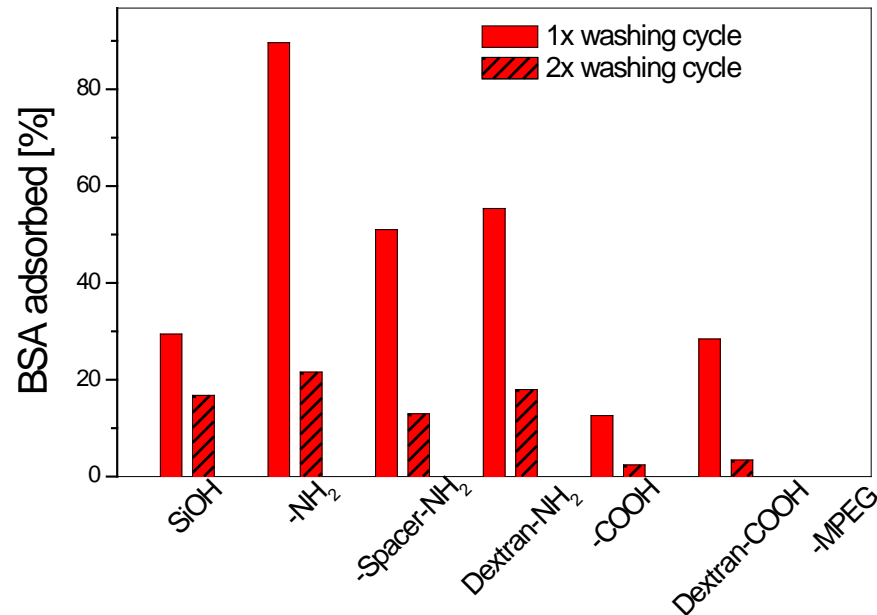
Herz, M. et al. *Mater. Res. Soc. Symp. Proc.* **2009**, 1190.



# Einführung einer PEG-Schale zur Verringerung der unspezifischen Bindung

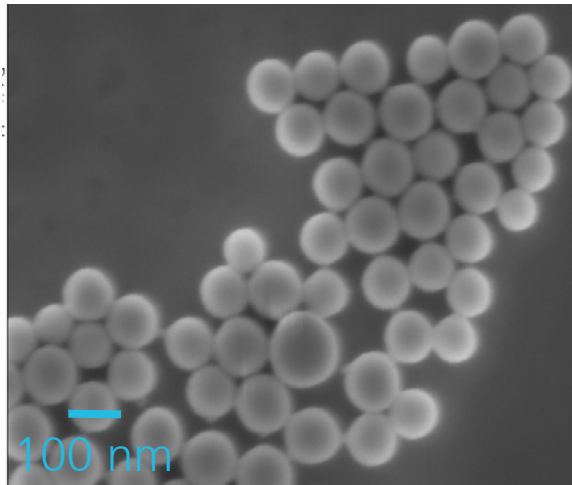
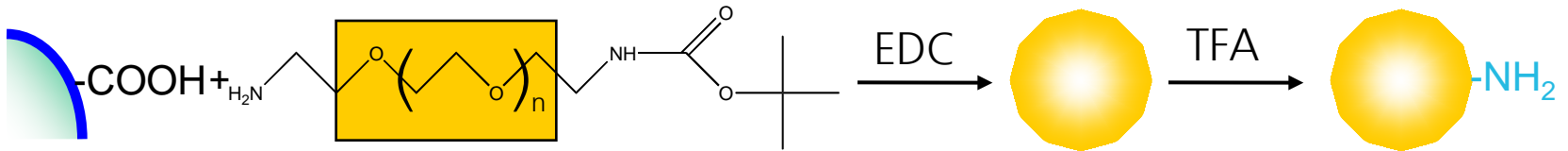


## Unspezifische Bindung

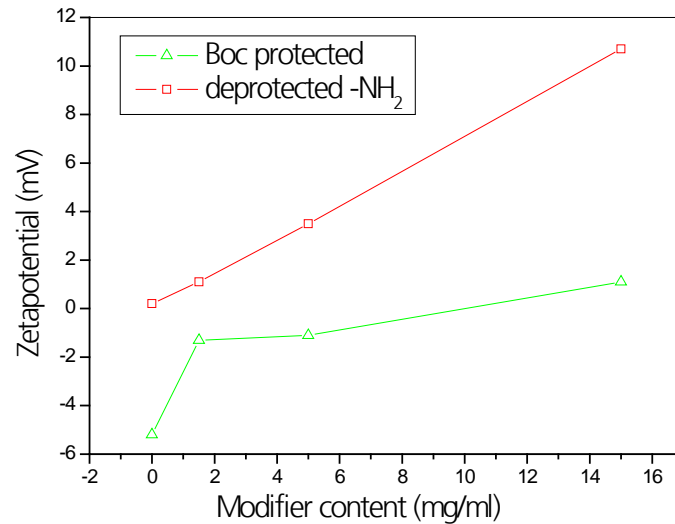


# Einführung einer funktionellen PEG-Schale

Boc-Amino-PEG-Amine (MW 644, n: ~11)

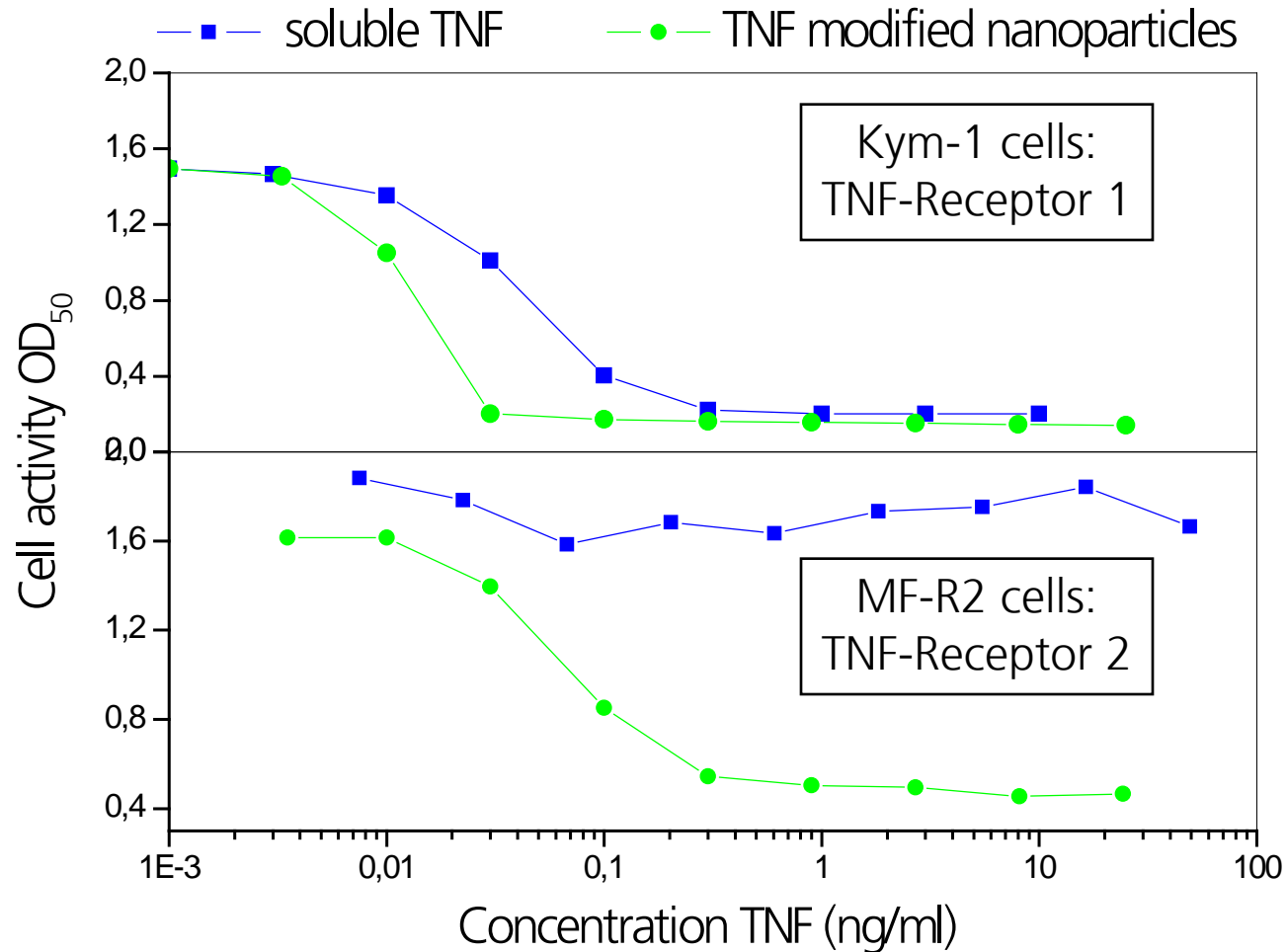


## $\zeta$ -Potentialbestimmung



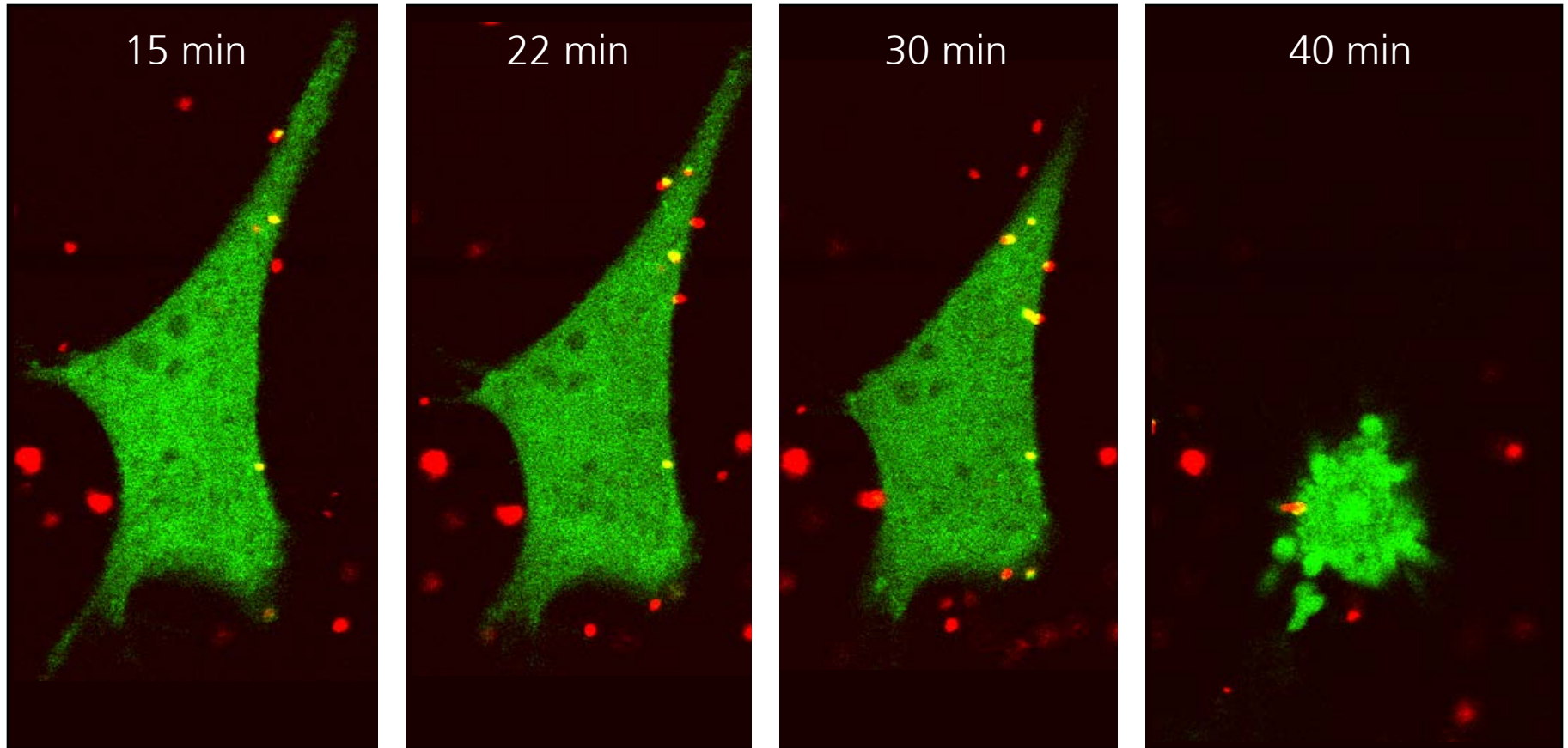
# TNF-NANOCYTES®: Apoptose via TNF-Receptor 2

## Bioaktivität im Zell-Assay



# TNF-NANOCYTES<sup>®</sup> induzieren Zelltod via TNF-Receptor 2

TNF-NANOCYTES<sup>®</sup>-Wirkung auf Targetzelle (MF-R2-Fas mit FADD-GFP)



S. Bryde et al., *Bioconjugate Chemistry*, 2005, 16, 1459  
IZI, Universität Stuttgart

# Gliederung

- NANOCYTES®
- Anorganische Nanopartikel mit  $\text{SiO}_x$  als Basis für einstellbare und definierbare Partikeleigenschaften
  - Herstellung, Funktionalisierung & Produktion
  - Beispiel: TNF-NANOCYTES®
  - **Beispiel: partikelbasierte Mikroarrays**
- Organische Nanopartikel als Drug Delivery Systeme
  - Doppelte Emulsion, Wirkstoffbeladung
  - Sprühverfahren
  - Beispiele: Interfeon-Beta, Dexpanthenol

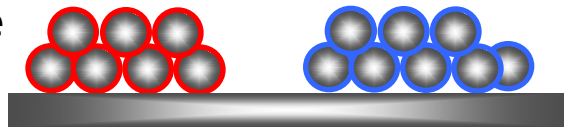


# NANOCYTES<sup>®</sup> – Mikroarrays

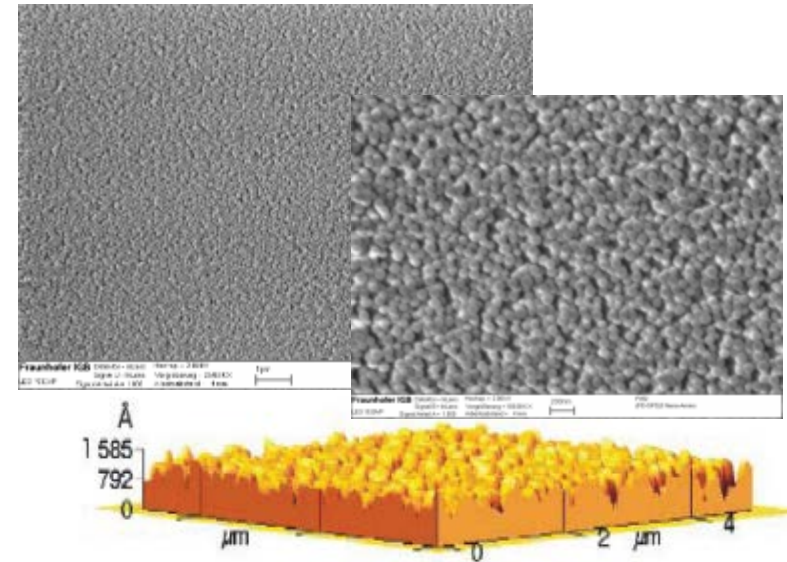
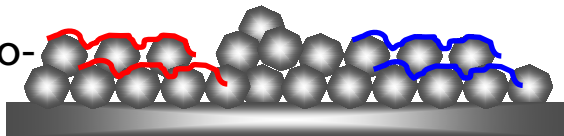
Herkömmlich

**Oberflächenvergrößerung, flexible Oberflächenchemie**

(Bio-)funktionale  
Nanopartikel

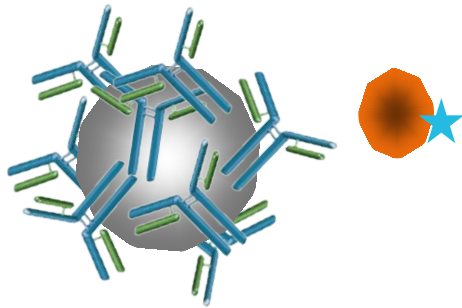


Funktionale Nano-  
partikelfilme

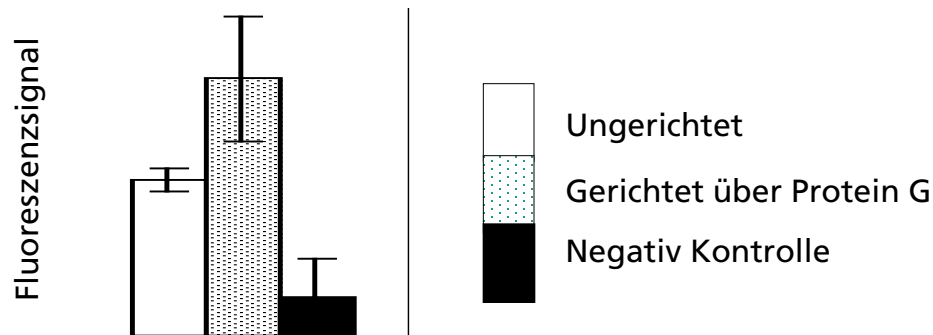
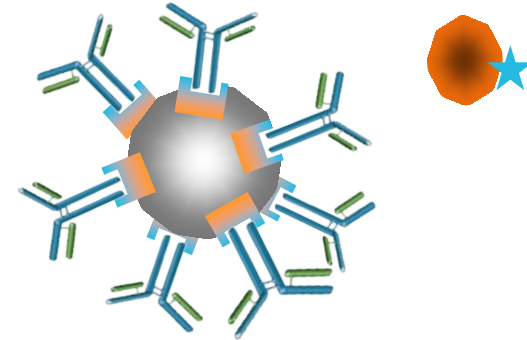


# Flexible Oberflächenchemie: Optimierte Immobilisierung der Fängermoleküle

Zufällige IgG Immobilisierung

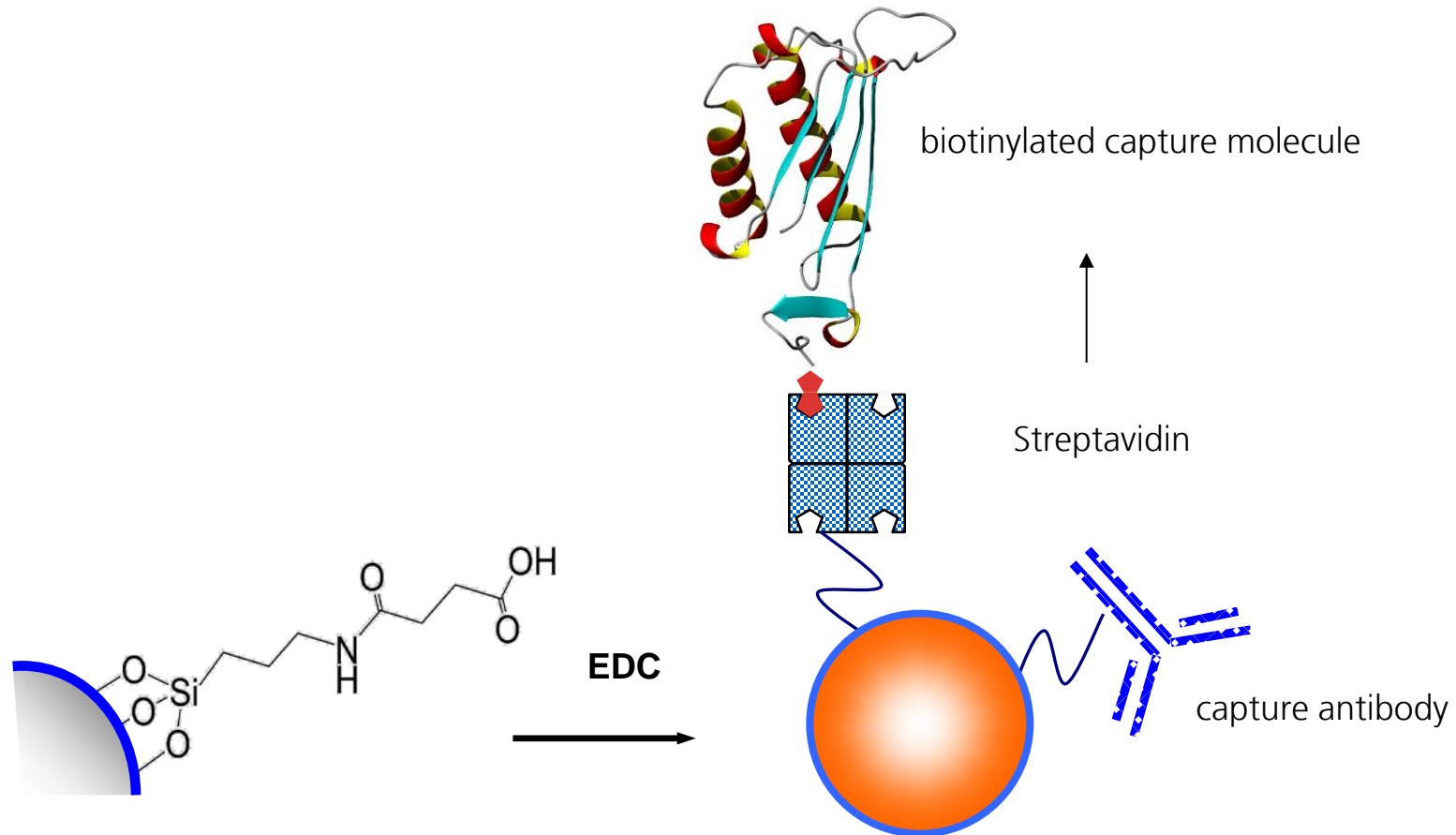


Gerichtete IgG Immobilisierung  
über Protein G



# NANOCYTES<sup>®</sup> – Mikroarrays

## Protein-funktionalisierte Nanopartikel



# NANOCYTES<sup>®</sup> - Mikroarrays

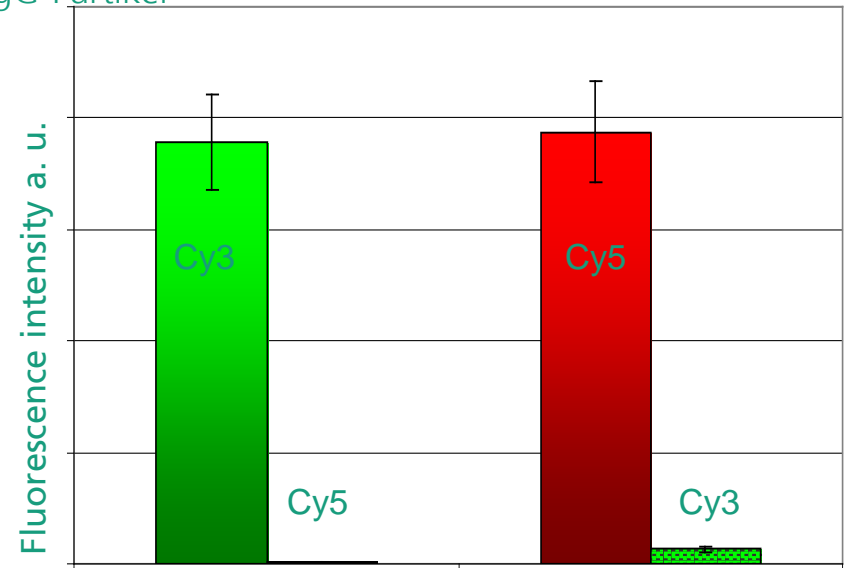
## Fluoreszenz-basierte Analytik

Feststoffgehalt 1 2 3 4 1 2 3 4 mg mL<sup>-1</sup>



Kanninchen-IgG-Partikel

Ziege-IgG-Partikel

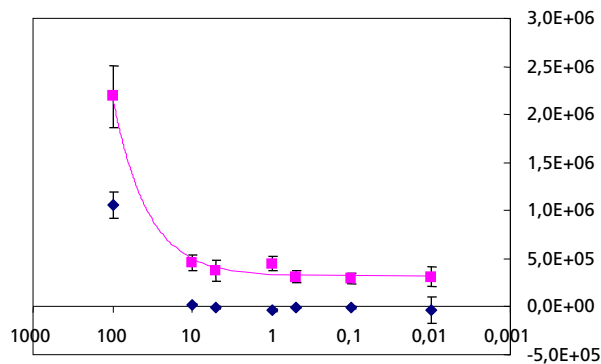
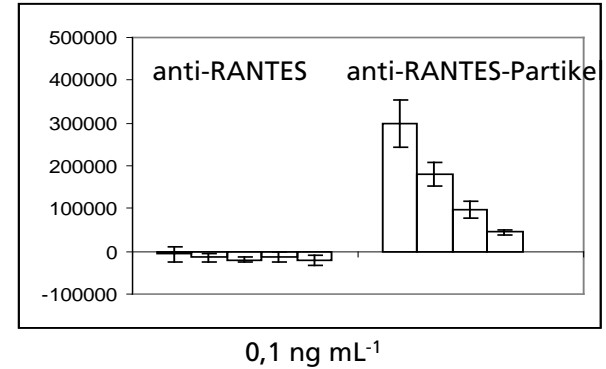
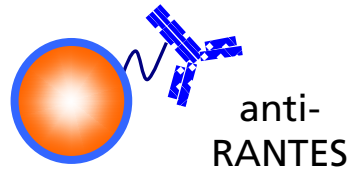
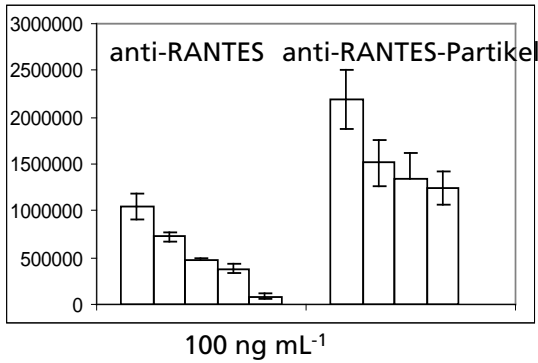


Borchers, K. et al. *PMSE Preprints* **2006**, 95, 1016-1017.

Weber, A. et al. *Canadian Journal of Analytical Sciences and Spectroscopy* **2005**, 50 (2), 49-53.

Borchers, K. et al., *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2005**, 383, 738-746.

# NANOCYTES<sup>®</sup> – Mikroarrays



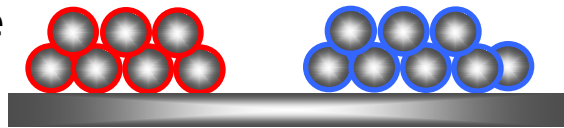
Analyt-konzentration	planare Mikroarrays	NANOCYTES <sup>®</sup> Mikroarrays
100 ng mL <sup>-1</sup>		
10 ng mL <sup>-1</sup>		

# NANOCYTES<sup>®</sup> – Mikroarrays

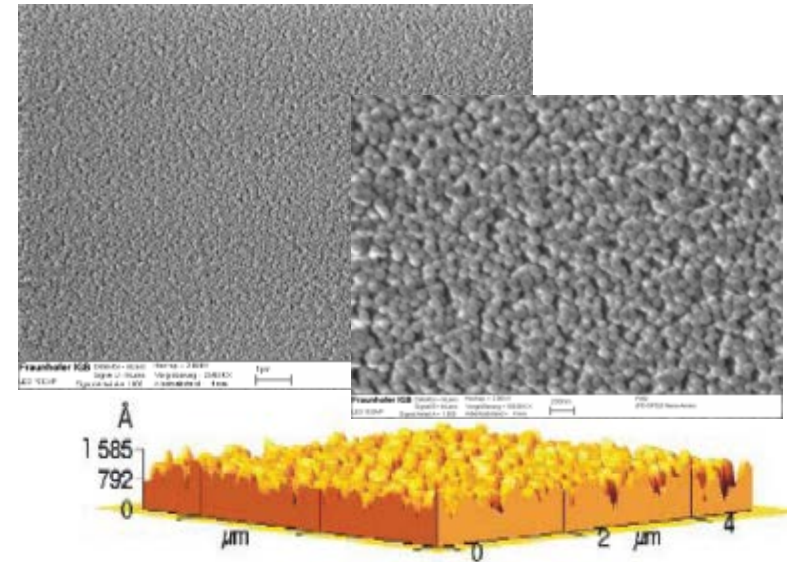
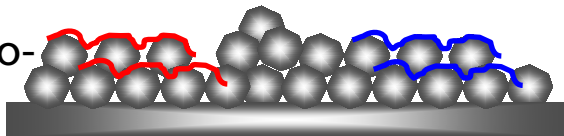
Herkömmlich

**Oberflächenvergrößerung, flexible Oberflächenchemie**

(Bio-)funktionale  
Nanopartikel



Funktionale Nano-  
partikelfilme

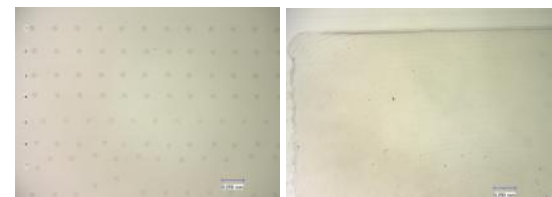
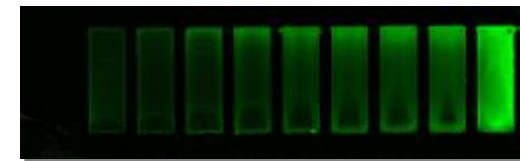
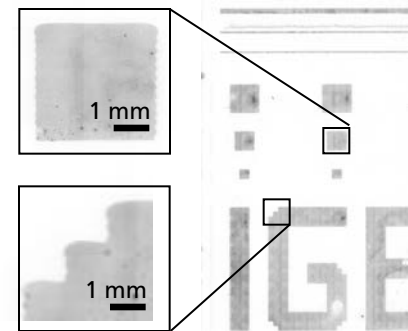
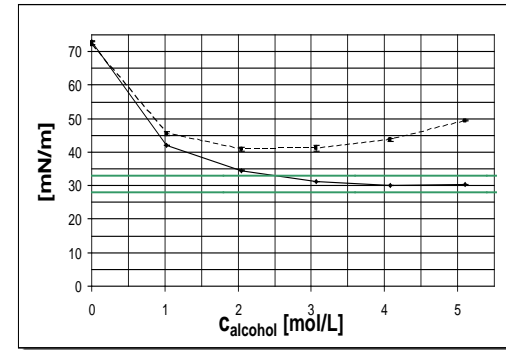
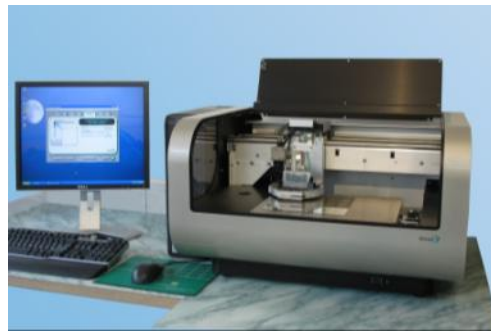


# Ink-Jet Drucken

- Tintenformulierung
- Halbleitende Tinten, Tinten mit Nanomaterialien, MOFs, CNTs, etc.
- Biofunktionale Tinten, Proteindruck
- Drucken von funktionalen Nanomaterialien und Mikropartikel
- Oberflächenvorbehandlung, dünne Schichten



Quelle: Dimatix



Knaupp, M. et al. *Tissue Engineering* **2009**, 15 (3), 675.

Borchers, K.; et al. *Journal of Dispersion Science and Technology* **2011**, 32, 1759.

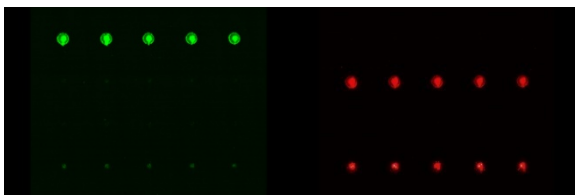
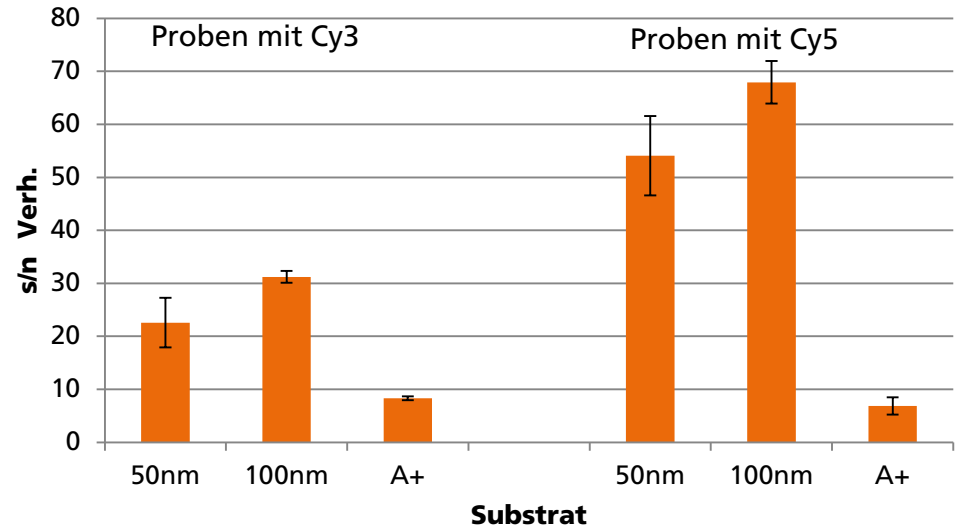


# NANOCYTES<sup>®</sup> – Mikroarray

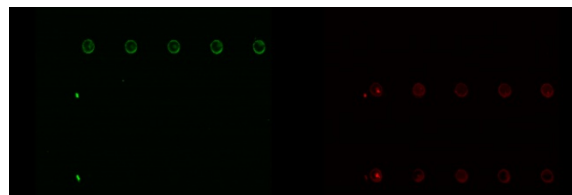
## DNA Mikroarray auf gedruckte Partikelschichten

### Signal zu Rauschverhältnis

- Model DNA Mikroarray mit 2 Proben, einer Spotting- und einer Negativkontrolle mit spezifischen Targets bei 66 °C üN Hybridisierung
- 100 nm und 50 nm Nanopartikel-schichten
- Vergleich mit Schott Nexterion A+



50 nm Aminonanopartikelschicht



Schott Nexterion A+

Scan mittels Axon Genepix 4300A  
PMT300, 100% Laserenergie

# Gliederung

- NANOCYTES®
- Anorganische Nanopartikel mit  $\text{SiO}_x$  als Basis für einstellbare und definierbare Partikeleigenschaften
  - Herstellung, Funktionalisierung & Produktion
  - Beispiel: TNF-NANOCYTES®
  - Beispiel: partikelbasierte Mikroarrays
- **Organische Nanopartikel als Drug Delivery Systeme**
  - Doppelte Emulsion, Wirkstoffbeladung
  - Sprühverfahren
  - Beispiele: Interfeon-Beta, Dexpanthenol

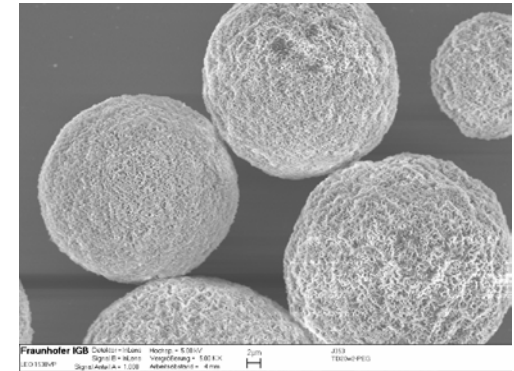
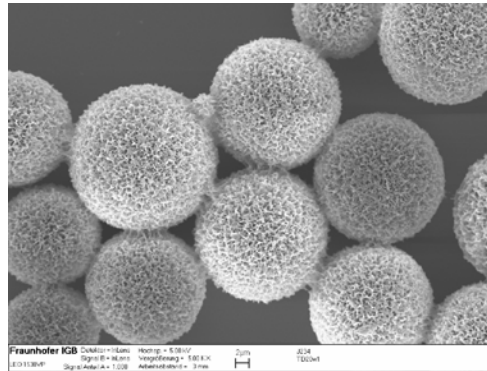
# Partikuläre Formulierung

## Partikuläre Formulierung

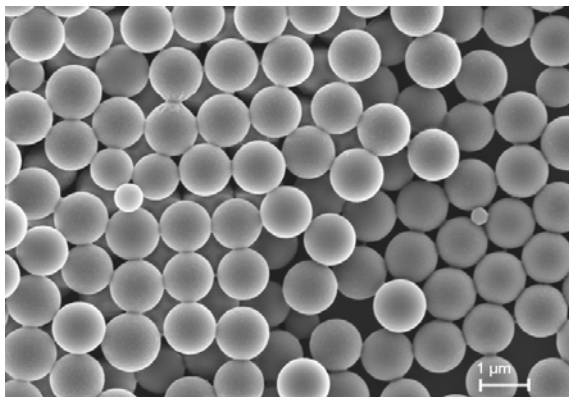
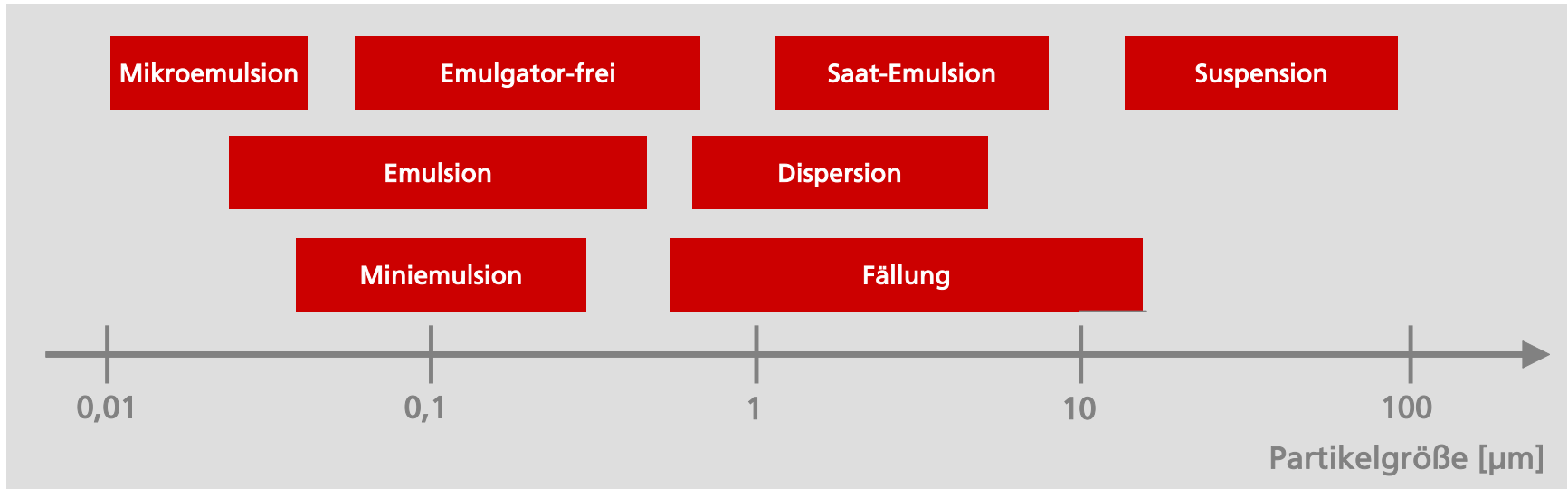
- Verkapselung von niedermolekularen Wirk- und Effektstoffen Biopharmazeutika oder Proteine in Partikel
- Erhöhung der Stabilität (Proteine, Aromen)
- Kontrollierte Freigabe am Zielort
- Nicht-invasive Verabreichung von Biopharmazeutika

## Methoden

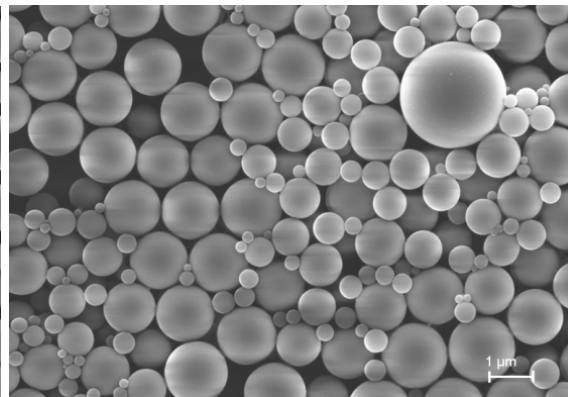
- Emulsionstechniken
- Sprühverfahren
- Grenzflächenpolymerisation
- Quellung
- ...



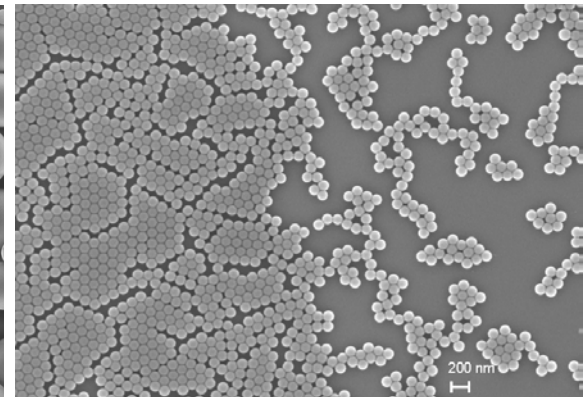
# NANOCYTES® – Partikeltechnologien



Emulsionspolymerisation



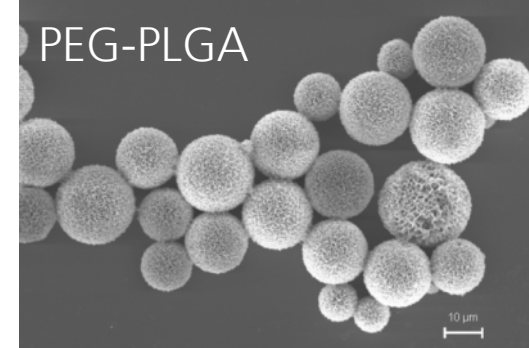
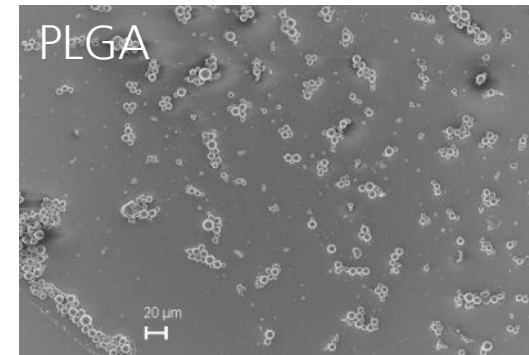
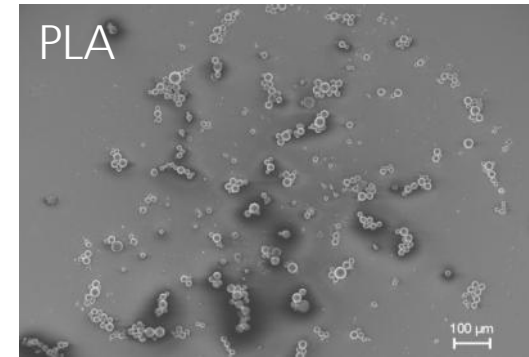
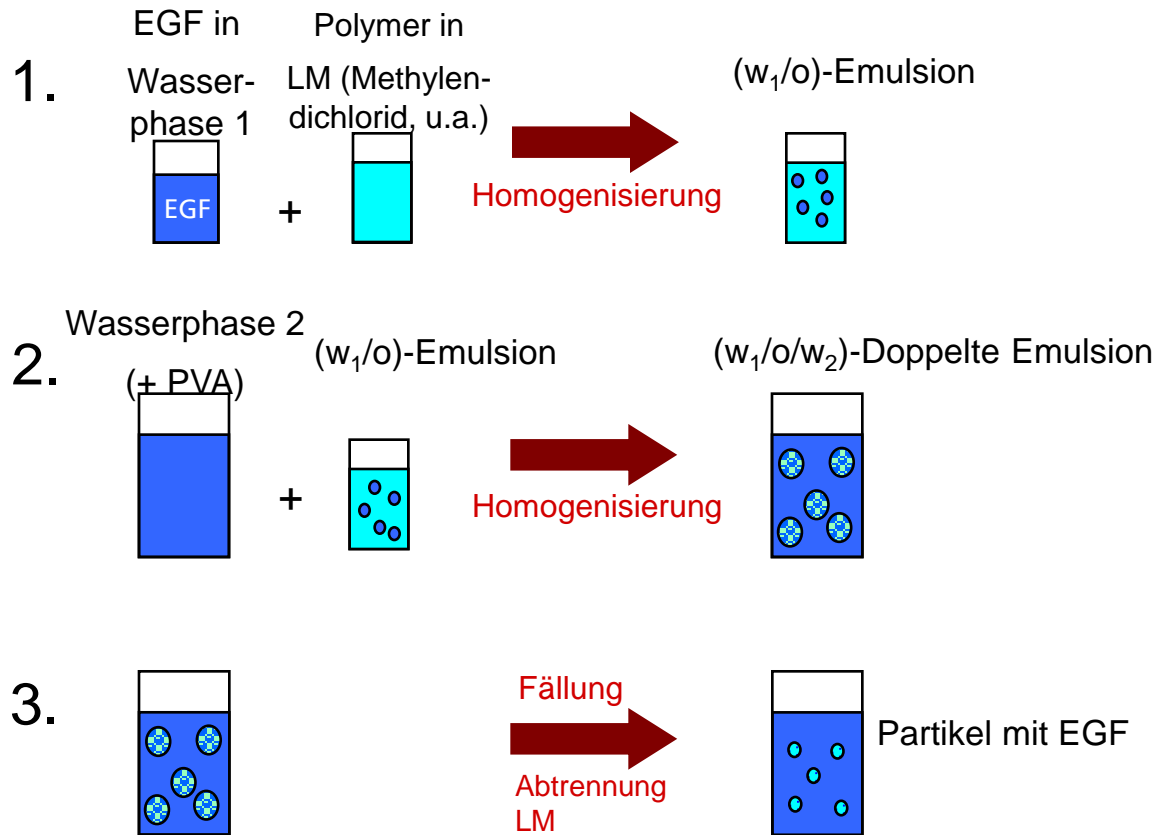
Miniemulsionpolymerisation



Emulgator-freie  
Emulsionspolymerisation

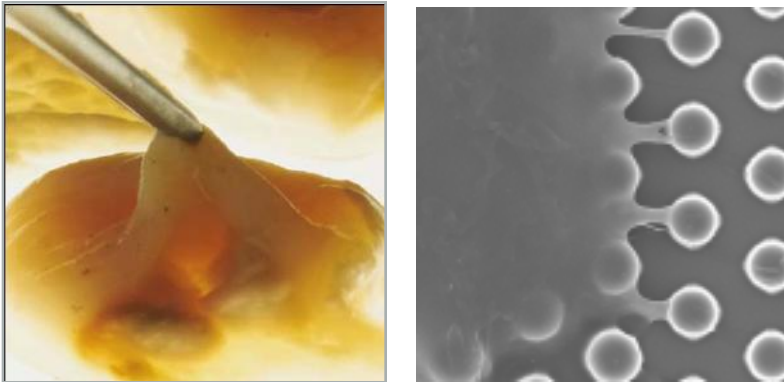
# NANOCYTES<sup>®</sup> – Technologien für organische Partikel

## Doppelte Emulsionstechnologie ( $w_1/o/w_2$ )

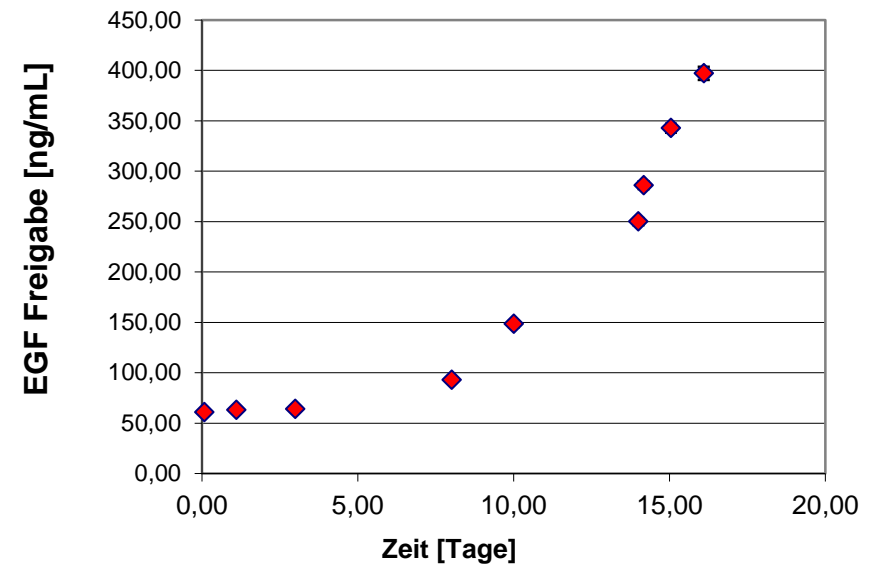
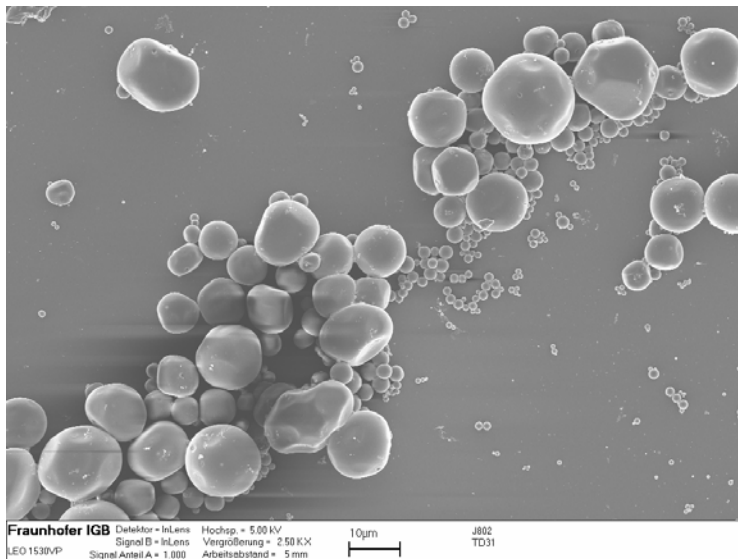


# Freigabesysteme - Wirkstofftransport

## (w<sub>1</sub>/o/w<sub>2</sub>) - Verkapselungstechniken



- Verkapselung des epidermalen Wachstumsfaktors EGF mittels doppelter Emulsionstechnologie
- Verbesserte Kultivierung von Hautzellen
- Kooperation innerhalb des IGBs mit der Abteilung Zellsysteme

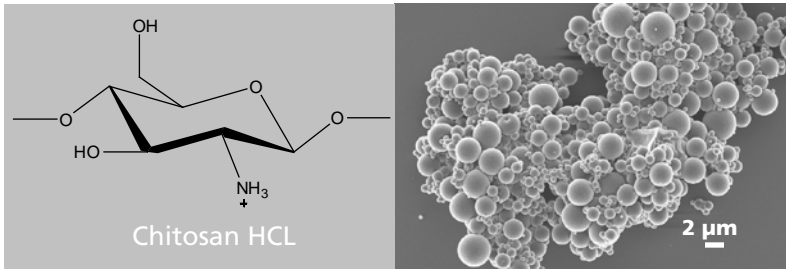


# Gliederung

- NANOCYTES®
- Anorganische Nanopartikel mit  $\text{SiO}_x$  als Basis für einstellbare und definierbare Partikeleigenschaften
  - Herstellung, Funktionalisierung & Produktion
  - Beispiel: TNF-NANOCYTES®
  - Beispiel: partikelbasierte Mikroarrays
- Organische Nanopartikel als Drug Delivery Systeme
  - Doppelte Emulsion, Wirkstoffbeladung
  - **Sprühverfahren**
  - Beispiele: Interfeon-Beta, Dexpanthenol



# NANOCYTES<sup>®</sup> – Technologien für organische Partikel



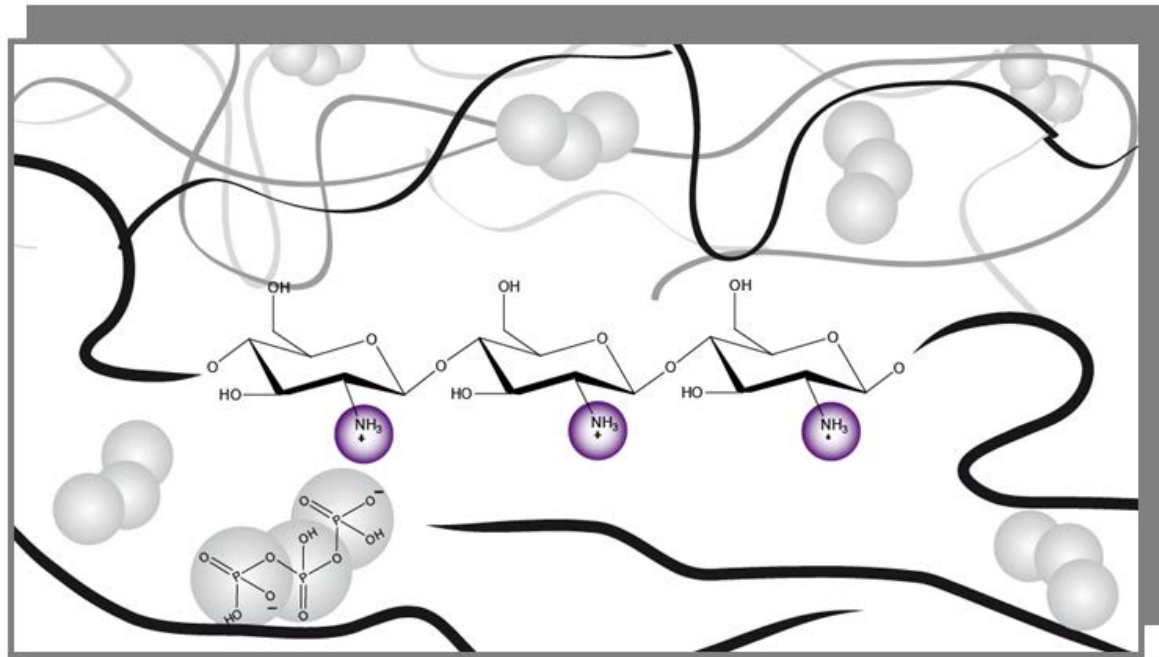
## Ziele

- Stabilisierung von Biopharmazeutika
- *Controlled drug release*
- Nicht-invasives *drug delivery*

## Herstellung über Sprühverfahren

- Nano- und Mini-Sprühtrockner (Büchi)
- Partikelgröße: 100 nm – 20  $\mu\text{m}$
- Verschiedene (Bio)Polymere:  
**Chitosan**, Polyvinylalkohol, Casein
- Variable Wirkstoffkonzentration
- Zugabe von Stabilisatoren

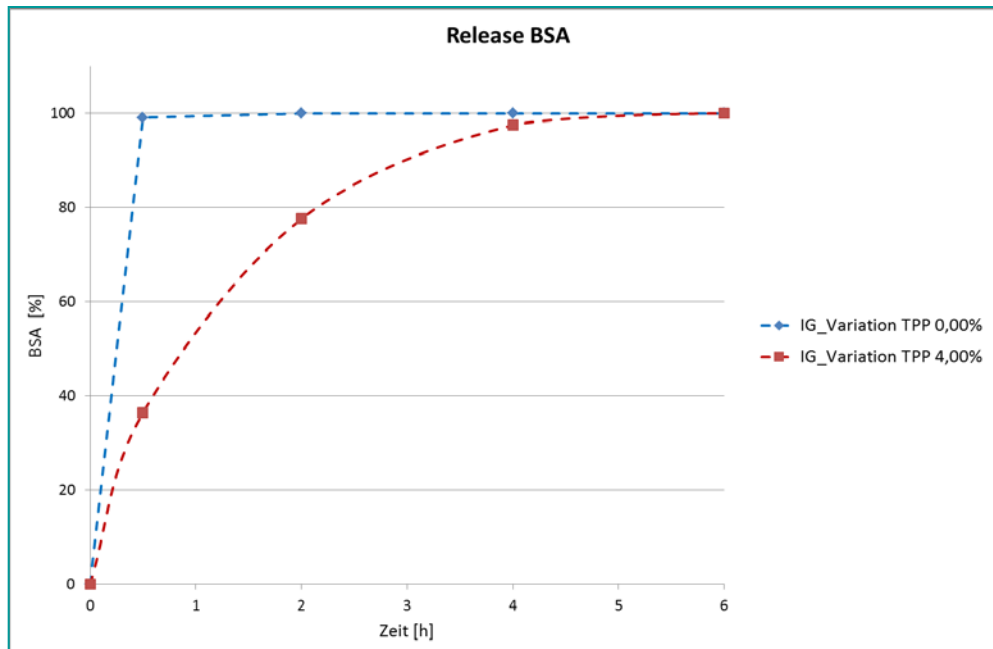
# Quervernetzung von Chitosan





# Quervernetzung mittels ionischer Gelation

Proteinbeladene Partikel (Modellprotein BSA *bovine serum albumin*)

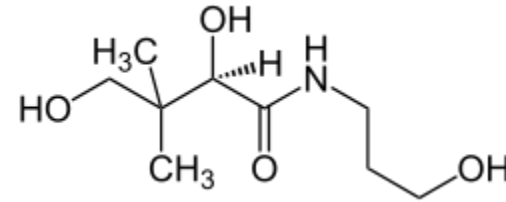


➔ **Ohne Vernetzung wird das komplette Protein schnell freigesetzt.**

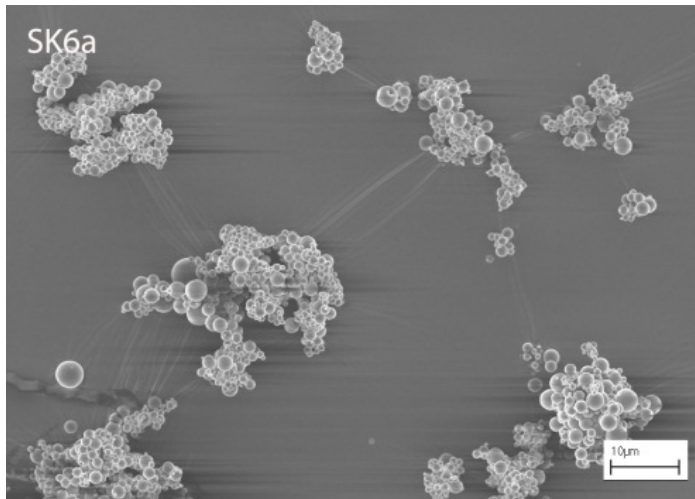
➔ **Mit Vernetzung findet eine verzögerte Freisetzung statt.**

# Quervernetzte Chitosan-Partikel mit Dexpanthenol

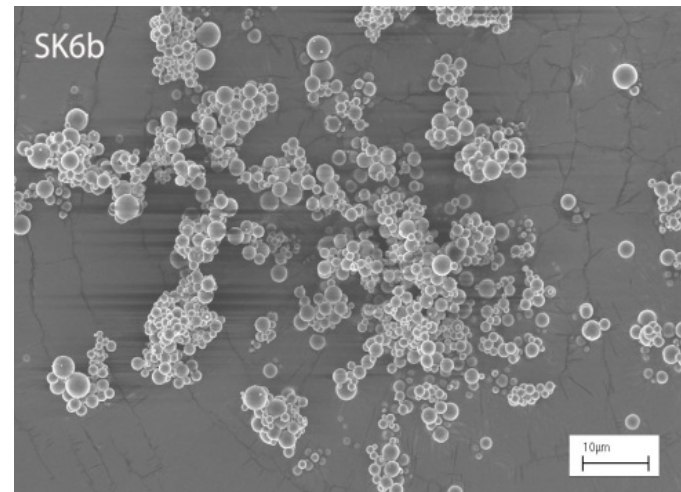
Ansatz	TPP-Konz. [%]	Beladung [%]	Partikelgröße $d_{50}$ [ $\mu\text{m}$ ]
SK6a	4,00	-	2,0
SK6b	4,00	8,4	2,7



## ohne Dexpanthenol



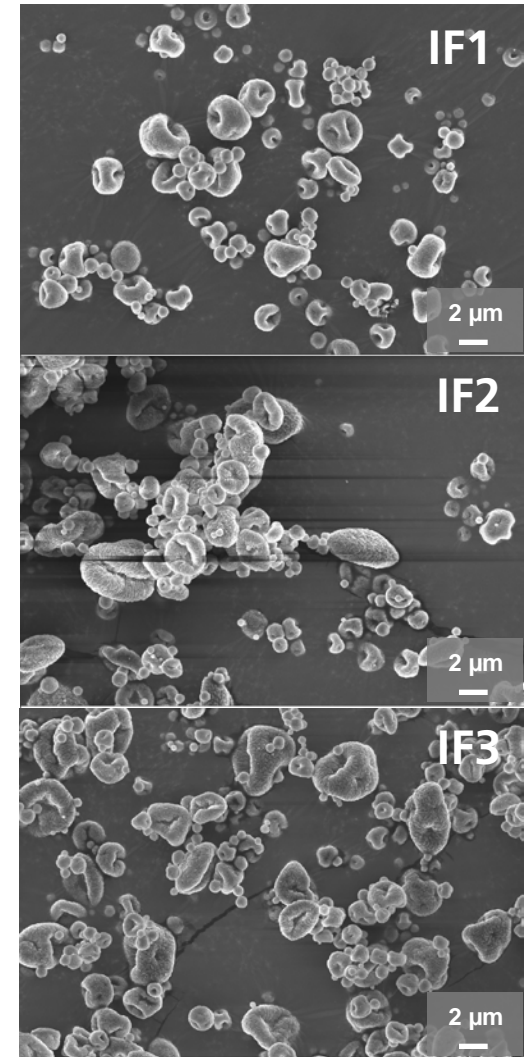
## mit Dexpanthenol



# Formulierung von Interferon-beta mittels Sprühtrockner

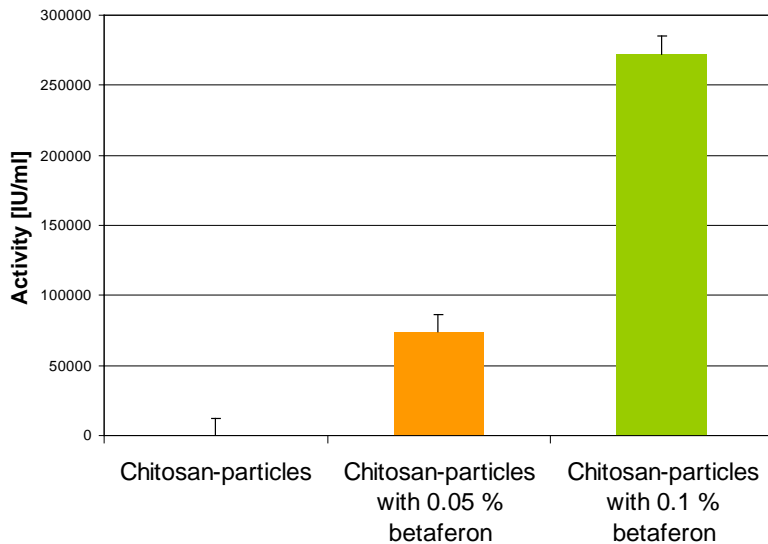
- Partikelbildung
- Polymer: Chitosanhydrochlorid
- Additive: 5 % Mannitol, 5 % HSA
- Interferongehalt: 0 %, 0,1 % und 0,05 %

Batch	Interferon [%]	Ausb. [%]	Partikel $\varnothing$ [ $\mu\text{m}$ ]
IF1	-	72,4	2,7
IF2	0,1	83,7	2,8
IF3	0,05	82,0	2,9

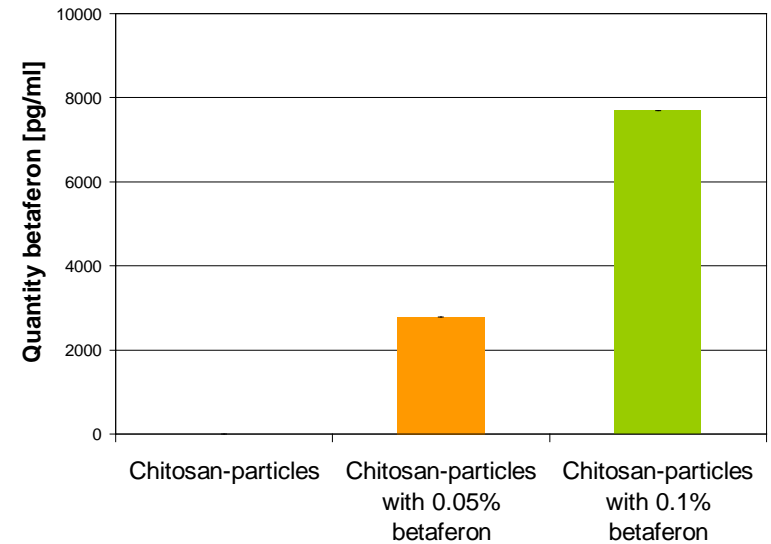


# Resultierende Formulierung - Bioaktivität

## Antiviraler Assay - **IFN- $\beta$** Bioaktivität



## ELISA – **IFN- $\beta$** Mengenbestimmung



Theoretische Aktivität

32 IU\* per pg **IFN- $\beta$**

**IFN- $\beta$**  0,05 % in Chitosanpartikel

27 IU per pg **IFN- $\beta$**

**IFN- $\beta$**  0,1 % in Chitosanpartikel

34 IU per pg **IFN- $\beta$**

IU\*: International Units



Das verkapselte Interferon zeigt keinen signifikanten Verlust der spezifischen Aktivität



# Ansprechpartner IGB

**Dr. Achim Weber**

Stellv. Abteilungsleiter, Gruppenleiter  
„Partikuläre Systeme und Formulierungen“

Telefon +49 711 970-4022  
achim.weber@igb.fraunhofer.de

