

Nanostrukturen

Kubische flüssigkristalline Nanopartikel

Da Yang, Bruce Armitage und Seth R. Marder*

Stichwörter:

Flüssigkristalle · Lipide · Nanostrukturen ·

Nanotechnologie · Polymere

In memoriam David O'Brien

Kubische flüssigkristalline Nanopartikel, die aus wässrigen Dispersionen kubischer Lipid-Wasser-Phasen hergestellt werden, sind bei Anwesenheit bestimmter Dispersionsmittel kinetisch stabil. Die Eigenschaften kubischer Nanopartikel aus Monoolein-Wasser- und anderen Lipid-Wasser-Systemen wurden mit verschiedenen experimentellen Techniken untersucht. Die kubischen Nanopartikel können durch die Polymerisation reaktiver Lipide in den kubischen Lipidsystemen stabilisiert werden. Zur einfacheren Herstellung und Anwendung kubischer Nanopartikel wurden verschiedene energiesparende Methoden entwickelt. Kubische Nanopartikel sind wegen ihrer Fähigkeit, lipophile, amphiphile und hydrophile Moleküle gesteuert aufzunehmen und abzugeben, sowie ihrer guten Biokompatibilität hervorragende Kandidaten für die Anwendung beim Transport von Wirkstoffen.

1. Einführung

Die Selbstaggregation von amphiphilen Molekülen zu komplexen Strukturen ist ein großes und intensiv bearbeitetes Forschungsgebiet. Amphiphile Moleküle enthalten eine hydrophile Kopfgruppe, die mit mindestens einer hydrophoben Endkette verknüpft ist. Es ist bekannt, dass Amphiphil-Wasser-Systeme eine Vielzahl verschiedener lyotroper Flüssigkristallphasen bilden, wie lamellare, inverse hexagonale und inverse kubische Phasen (Abbildung 1). Die enthalpisch ungünstigen Wechselwirkungen an der Grenzfläche zwischen der/den hydrophoben Endkette(n) des Lipids und den polaren Wassermolekülen bewirken eine Aggregation der hydrophoben Endketten mehrerer Moleküle, wobei die hydrophilen Kopfgruppen in der wässrigen Umgebung bleiben. Inverse kubische Phasen, die bikontinuierlich bezüglich

der wässrigen Bereiche und der Lipidregionen sind, kann man sich als organische Analoga von Zeolithen vorstellen. Ein flüssigkristallines Gelmaterial in einer kubischen Phase ist ein temperaturstables, optisch isotropes, viskoses Gel mit einer extrem großen Oberfläche (bis zu $400 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ kubisches Gel).^[1] Ein kubisches Lipidgel kann hydrophile, hydrophobe und amphiphile Substanzen lösen. Kubische Phasen werden häufig als Transportmittel für Wirkstoffe verwendet, die im kubischen Gel gelöst sind und von dort kontrolliert durch Diffusion abgegeben werden.

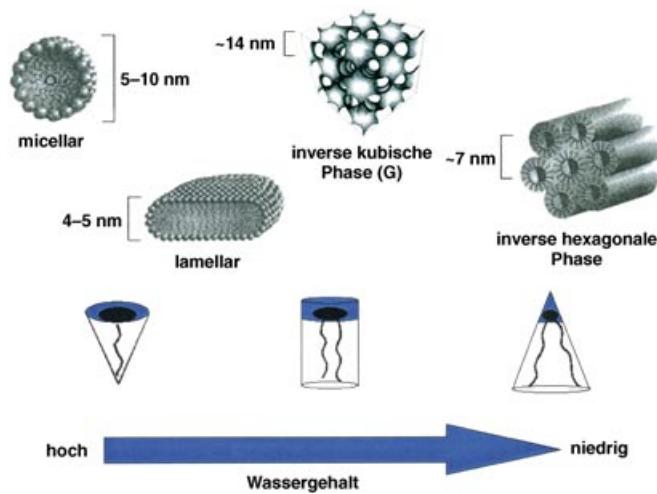


Abbildung 1. Einige Flüssigkristallphasen hydratisierter Lipide. Von links nach rechts ändert sich die Phase von micellar über lamellar und bikontinuierlich kubisch nach invers hexagonal, während sich die spontane Krümmung der Lipide von positiven zu negativen Werten hin ändert und der Wassergehalt der Probe abnimmt.

[*] Prof. S. R. Marder
School of Chemistry and Biochemistry
Georgia Institute of Technology
770 State Street, Atlanta, GA 30332-0400 (USA)
Fax: (+1) 404-385-6057
E-mail: seth.marder@chemistry.gatech.edu

Dr. D. Yang
Material Science and Engineering Department
Cornell University, Ithaca, NY 14853 (USA)

Prof. B. Armitage
Department of Chemistry, Carnegie Mellon University
Pittsburgh, PA 15213 (USA)

Kubische Gele, die sich im Gleichgewicht mit überschüssigem Wasser befinden, können als Nanopartikel dispergiert werden. In Analogie zu den aus lamellarem flüssigkristallinem Material gebildeten Liposomen werden diese Nanopartikel als Cubosomen bezeichnet.^[2] In diesem Kurzaufsatzt beschreiben wir die neuesten Fortschritte bei der Untersuchung kubischer flüssigkristalliner Nanopartikel aus wässrigen Dispersionen von kubischen Lipid-Wasser-Phasen.

2. Kubische Lipid-Wasser-Phasen

Bikontinuierliche kubische Phasen in Lipid-Wasser-Membransystemen wurden zuerst in den sechziger Jahren von Luzzati et al. beschrieben,^[3] detaillierte Untersuchungen dieser Phasen begannen allerdings erst Mitte der achtziger Jahre. Seitdem wurden diese Phasen in vielen lyotropen Systemen gefunden, z.B. in Lipid-Wasser-Systemen und Blockcopolymeren. Scriven schlug für bikontinuierliche kubische Phasen als Erster Grenzflächenstrukturen vor, die auf periodischen Minimaloberflächen basieren,^[4] was mittlerweile allgemein als korrekt angesehen wird. In einem kubischen flüssigkristallinen Lipid-Wasser-System sind die Lipid-Doppelschichten in periodischen dreidimensionalen kubischen Gitterstrukturen angeordnet. Indem die Doppelschichten in die Form von unendlichen periodischen Minimaloberflächen verdreht werden, wird die mittlere Krümmung an jedem Punkt der Oberfläche gleich Null. Die mittlere Krümmung H ist definiert als $\frac{1}{2}(\kappa_1 + \kappa_2)$, wobei κ_1 und κ_2 zwei Hauptkrümmungen bezeichnen. Eine Minimaloberfläche ist eine Fläche mit $H=0$ an allen Punkten, sodass ihre Ausdehnung minimiert wird. Die drei derzeit bekannten inversen bikontinuierlichen Phasen sind die Doppeldiamant-, Gyroid- und Primitive Phase (D-, G- und P-Phase), die den Raumgruppensymmetrien *Pn3m*, *Ia3d* und *Im3m* entsprechen (Abbildung 2).^[5] Die nähere Betrachtung der Minimaloberflächen und der komplementären dreidimensionalen labyrinthartigen Netze gibt zwei sich gegenseitig durchdringende, getrennte Wasserkanäle zu erkennen (Abbildung 3). Der Durchmesser der Wasserkanäle, der von der Lipidzusammensetzung und der Phase abhängt, kann im Bereich von ca. 4 bis zu 20 nm liegen, groß genug für die Aufnahme mancher wasserlöslicher Makromoleküle. Entsprechend der Größe der Wasserkanäle nimmt auch die Wassermenge zu, die in den G-, D- und P-Phasen enthalten ist.^[6]



Bruce Armitage promovierte 1993 bei Prof. David O'Brien (University of Arizona) und ging dann als Postdoc zu Prof. Gary B. Schuster (University of Illinois und Georgia Institute of Technology; 1995-1997). Im Sommer 1997 arbeitete er bei Prof. Peter E. Nielsen und Prof. Henrik Nielsen (Universität Kopenhagen). Danach nahm er eine Position als Associate Professor für Chemie an der Carnegie Mellon University an. Dort arbeitet er auf den Gebieten Biomolekulare Erkennung in der Nukleinsäurechemie und -biologie, Supramolekulare Photochemie sowie Materialwissenschaft.

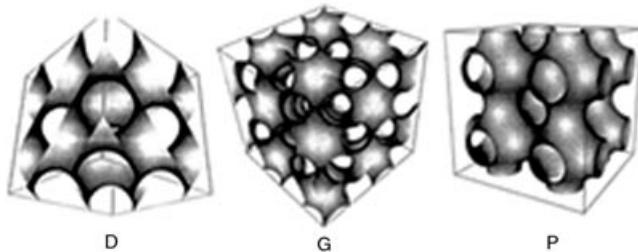


Abbildung 2. Mathematische Darstellung der drei bikontinuierlichen kubischen Morphologien von Lipid-Wasser-Systemen. Die Minimaloberflächen (D, G und P) entsprechen dem Lipidanteil der jeweiligen Phasen.^[5]

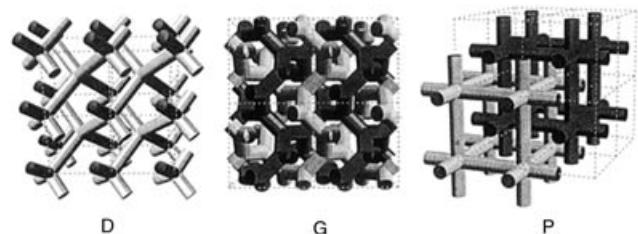


Abbildung 3. Darstellung der dreidimensionalen Netze, die komplementär zu den drei bikontinuierlichen kubischen Morphologien D, G und P sind. Diese labyrinthartigen Netze entsprechen dem Wasseranteil der jeweiligen kubischen Phasen.^[5]

Von den lyotropen Flüssigkristallphasen ist bei biologischen Systemen wohl die lamellare Phase mit ihrer alternierenden Abfolge von Lipid-Doppelschichten und Wasser am besten bekannt. Die inverse hexagonale Flüssigkristallphase besteht aus unbegrenzten linearen Wasserkanälen, die in einem zweidimensionalen hexagonalen Gitter angeordnet sind und durch Lipid-Doppelschichten getrennt werden. Im Allgemeinen findet man die inverse hexagonale Phase bei höheren Temperaturen und niedrigerem Wassergehalt als die lamellare Phase, dagegen tritt die inverse kubische Phase bei mittleren Temperaturen und Konzentrationen auf. Wie die lamellaren und hexagonalen Phasen weisen die kubischen Flüssigkristallphasen eine Fernordnung, aber keine Nahordnung auf, d.h., die hydrophoben Ketten sind nicht geordnet. Während die lamellaren und hexagonalen Phasen optisch doppelbrechend sind, sind die kubischen Phasen optisch isotrop. Daher ist ein Gel, das aus einer kubischen Phase



Seth Marder ist zurzeit Professor für Chemie und Gründungsdirektor des Center for Organic Photonics and Electronics (COPE) am Georgia Institute of Technology. Er ist außerdem Mitgründer von Arizona Microsystems und Focal Point Microsystems L.L.C. sowie Associate Director des National Science Foundation Science and Technology Center Materials and Device for Information Technology Research. Marder erhielt 1993 den JPL Lew Allen Award. Er ist Mitglied der American Association for the Advancement of Science (2002) und der Optical Society of America (2004).

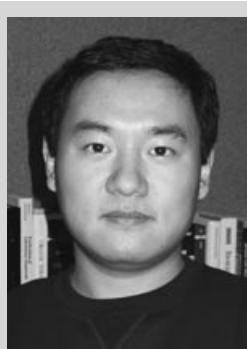
besteht, ein klares, viskoses, geleeartiges Material (Abbildung 4).



Abbildung 4. Probe eines kubischen Gels. Das Gel in der kubischen Phase ist ein klares, viskoses, geleeartiges Material, das temperaturstabil und hoch biokompatibel ist.^[9]

Eines der am besten charakterisierten Lipid-Wasser-Systeme, GMO/Wasser (GMO = Glycerinmonooleat), weist bei Raumtemperatur und einem Wassergehalt zwischen 20 und 40 Gew.-% zwei Arten von bikontinuierlichen kubischen Phasen auf.^[7] Durch Erhöhen des Wassergehalts geht die lamellare Phase zuerst in die kubische Gyroid-Phase (G-Phase) und dann in die kubische Doppeldiamant-Phase (D-Phase) über. Diese kubischen Phasen können in einem Gleichgewicht mit überschüssigem Wasser koexistieren. Ein sehr detailliertes Phasendiagramm des GMO-Wasser-Systems wurde kürzlich von Qiu und Caffrey beschrieben.^[8]

GMO/Wasser ist zwar das am häufigsten untersuchte Lipid-Wasser-System für kubische Phasen, aber auch bei anderen Lipiden wie Phosphatidylcholinen, Phosphatidylethanolaminen, PEG-derivatisierten Phospholipiden (PEG = Poly(ethylenglykol)) und verschiedenen Monoglyceriden wurden diese Phasen nachgewiesen. Die gebräuchlichsten experimentellen Methoden zur Charakterisierung von kubischen Phasen sind Röntgenbeugung, Transmissions- und Gefrierbruch-Elektronenmikroskopie sowie NMR-Spektroskopie.^[10] Einige andere Techniken, die bei der Untersuchung von kubischen Lipid-Wasser-Systemen angewendet werden, sind zeitaufgelöste Fluoreszenzspektroskopie,^[11] Neutronenbeugung,^[12] FT-IR-Spektroskopie,^[13] dynamische Differenz-Kalorimetrie,^[14] Resonanz-Raman-Spektroskopie^[15] und Rasterkraftmikroskopie.^[16]



Da Yang erhielt 1997 seinen BS in Polymerchemie an der University of Science and Technology of China. Er promovierte 2003 in Organischer Chemie an der University of Arizona bei Prof. David F. O'Brien und Prof. Seth R. Marder. Zurzeit arbeitet er als Postdoc bei Prof. Christopher K. Ober an der Cornell University.

3. Dispersionsstabilisierte kubische flüssigkristalline Nanopartikel

Kubische Gele haben zwar interessante und potenziell nützliche Eigenschaften, sind aber schwierig zu handhaben und zu verarbeiten. Eine Dispergierung in kleinere Strukturen, die zumindest einige der Eigenschaften des nicht dispergierten Materials beibehalten, könnte die Verwendung kubischer Materialien für verschiedene Anwendungen vereinfachen. Um solche stabilen Dispersionen zu gewinnen, wurden kubische flüssigkristalline Nanopartikel aus wässrigen Dispersionen kubischer Lipid-Wasser-Phasen hergestellt. Man weiß, dass lamellare Phasen bei Anwesenheit von Wasser leicht in stabile, Liposomen genannte Vesikel dispergiert werden können. Dispersionen von inversen amphiphilen Flüssigkristallphasen werden wegen ihrer begrenzten Stabilität in wässriger Umgebung seltener beobachtet. Bikontinuierliche kubische Phasen bilden keine stabilen wässrigen Dispersionen, denn der Kontakt der hydrophoben Bereiche zur wässrigen Umgebung der Partikel zerstört die kristalline Ordnung ihrer inneren Struktur.^[2] Kann man jedoch die ungünstige Wechselwirkung der hydrophoben Bereiche mit der wässrigen Umgebung vermeiden, ohne die innere kubische Struktur zu zerstören (beispielsweise durch Zugabe amphiphiler Dispersionsmittel), dann gelingt die Herstellung von Nanopartikeln mit einer kubischen flüssigkristallinen inneren Struktur. Die Verwendung des richtigen Dispersionsmittels ist entscheidend, denn dieses darf die kubische flüssigkristalline Struktur nicht zerstören, wenn es ein Teil des Lipid-Wasser-Aggregats wird.

Die erste fragmentierte Doppelschichtstruktur einer kubischen Phase wurde 1979 beobachtet.^[17] Wässrige Dispersionen kubischer Phasen wurden unter Verwendung von Gallensalzen, amphiphilen Proteinen und amphiphilen Blockcopolymeren als Dispersionsmittel hergestellt. Die kubische Phase aus einer Monoglycerid-Wasser-Mischung wurde bei Anwesenheit micellarer Lösungen von Gallensalzen dispergiert.^[18,19] Die kubische Phase wurde dabei durch die Bildung einer lamellaren Hülle aus Gallensalzen und Monoglyceriden stabilisiert, die die innere kubische Struktur abschirmt. Daneben wurde Casein, ein amphiphiles Protein und ein sehr wirkungsvoller Emulgator, zur Dispergierung der kubischen Phase des Monoglycerid-Wasser-Systems verwendet. Bei dieser Vorgehensweise wird das Protein vermutlich in die äußere Schicht des Lipids integriert, sodass dessen Hydrophilie erhöht wird und es daher einfach zu dispergieren ist.^[20]

In einer dritten Strategie zur Dispergierung kubischer Phasen wird Poloxamer 407 (auch bezeichnet als Pluronic F127) verwendet, ein nichtionisches Triblockcopolymer aus Polyethylenoxid (PEO) und Polypropylenoxid (PPO): PEO₉₈PPO₆₇PEO₉₈. Dieses ist bei weitem das meistgebrauchte Dispersionsmittel und wird auch zur Stabilisierung einer Vielzahl von Kolloiden sowie bei Untersuchungen zum Wirkstofftransport verwendet. Während der hydrophobe PPO-Block auf der Oberfläche des stabilisierten Partikels adsorbiert oder in die Oberfläche integriert wird, ragen die hydrophilen PEO-Blöcke nach außen und bedecken die Oberfläche. Auf diese Weise schützen und stabilisieren sie

die Kolloidpartikel.^[21] Das ternäre System aus Piniennadelöl-Monoglyceriden (89.5 Gew.-% GMO), Poloxamer 407 und Wasser weist ein ausgedehntes inverses kubisches Phasenbereich auf, in dem mit Röntgenbeugung vier verschiedene kubische Strukturen nachgewiesen wurden.^[22] Dieses System wurde in Submikronpartikel dispergiert, indem zuerst eine grobe Dispersion gebildet wurde (durch Zugabe der homogenen Schmelze aus Lipiden und Poloxamer 407 unter Rühren zu Wasser), die dann zur weiteren Größenreduzierung in einen Hochdruckhomogenisator gegeben wurde.^[23,24] Ein Mindestanteil von 4 Gew.-% Poloxamer 407 war für eine stabile Dispersion des kubischen Gels erforderlich. Die kubische Struktur dieser Partikel wurde mithilfe von Kleinwinkelröntgenstreuung (SAXS) und Kryo-Transmissions-elektronenmikroskopie (Kryo-TEM) charakterisiert. Im SAXS-Beugungsmuster von dispergierten Proben wurde eine Linienverbreiterung gegenüber dem Beugungsbild des nicht dispergierten kubischen Gels beobachtet, die als eine Konsequenz der Submikronpartikelgröße angesehen wurde. Kryo-TEM-Bilder zeigten hauptsächlich rechteckige Cubosomen mit einer deutlichen inneren Periodizität (Abbildung 5).

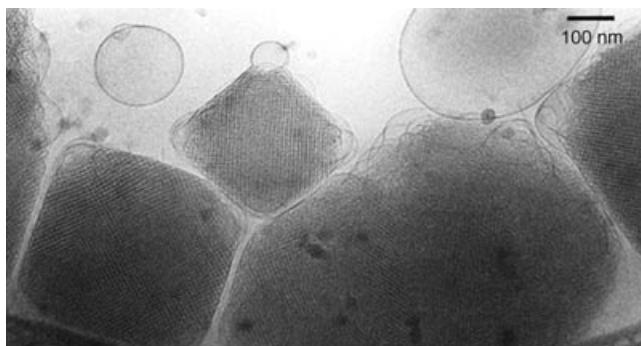


Abbildung 5. Kryo-TEM-Bild der dispergierten kubischen Partikel einer kubischen Phase des Monoolein-Poloxamer 407-Wasser-Systems (7.4 Gew.-% Polymer zu Lipid). Die Partikel haben eine Facettenform mit einer deutlichen inneren Periodizität.^[24]

Kleinere Partikel wurden in Proben mit einem größeren Polymeranteil gefunden. Handa und Mitarbeiter^[25] berichteten über eine Abnahme der Partikelgröße bei einer Zunahme des Polymer/Lipid-Gewichtsverhältnisses bis zu 10%. Bei noch höheren Polymeranteilen erfolgte keine weitere Abnahme der Partikelgröße. Differenzielle Interferenzkontrast-Mikroskopbilder (aufgenommen mit und ohne gekreuzte Polarisatoren) der kubischen Nanopartikel sind in Abbildung 6 gezeigt.^[9] Trotz ihres Gelzustands und ihrer großen Abmessungen im Vergleich zu den Dimensionen der kubischen Elementarzelle nehmen die Teilchen eine deutlich kubische Form an, wobei ihre Kanten entlang den Hauptachsen der kubischen Elementarzelle verlaufen. Obwohl die innere kubische Morphologie optisch isotrop ist, existiert eine doppelbrechende Oberflächenstruktur, die eine nichtkubische Schicht auf den Teilchen, wahrscheinlich eine lamellare Phase, nahelegt.

SAXS-Daten ergaben, dass die innere Struktur der kubischen Partikel in zwei verschiedenen, koexistenten

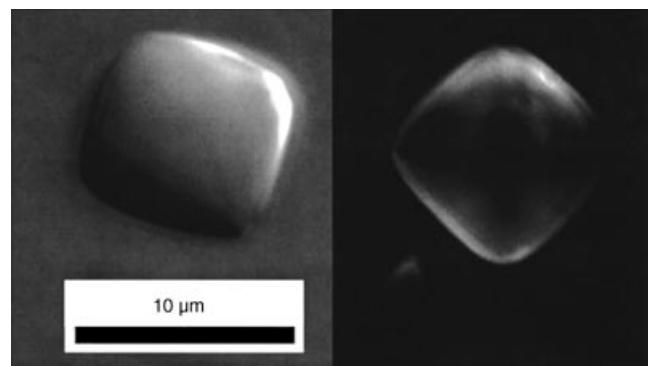


Abbildung 6. Optische Mikrophotographie von kubischen Partikeln aus einer wässrigen Dispersion des Monoolein-Poloxamer 407-Wasser-Systems, aufgenommen mit gekreuzten Polarisatoren (rechts) und ohne gekreuzte Polarisatoren (links). Die Partikel haben eine kubische innere Morphologie und eine optisch doppelbrechende (wahrscheinlich lamellare) Oberflächenschicht.^[9]

kubischen Phasen vorliegt: die Doppeldiamant-Phase und die Primitive Phase (D- und P-Phase). Das Röntgenbeugungsmuster zeigte, dass die kubische D-Phase bei niedrigem Polymergehalt vorherrscht und die kubische P-Phase erst bei höheren Polymer/Lipid-Verhältnissen auftritt.^[24] Nakano et al.^[25] schlugen vor, dass bei niedrigem Polymeranteil das Poloxamer 407 größtenteils an der Partikeloberfläche adsorbiert ist, während die kubische D-Phase im Partikelinneren hauptsächlich aus hydratisiertem Monoolein besteht. Sobald die Oberfläche völlig mit dem Polymer gesättigt ist, wird dieses auch in die Monoolein-Doppelschicht eingefügt, und die kubische P-Phase bildet sich (Abbildung 7). Man weiß, dass die kubische P-Phase eine weniger negative Krümmung aufweist als die kubische D-Phase.^[26] Der D-P-Übergang kann daher auf das stark hydrophile Poloxamer 407 zurückgeführt werden; dieses induziert eine positive Krümmung in der Lipid-Doppelschicht, wodurch die Bildung der kubischen P-Phase mit der weniger negativen Krümmung begünstigt wird.

Ein ähnliches Verhalten wurde bei der Mischung von Ölsäure (einer Fettsäure mit der gleichen Acylkette wie Monoolein und einer negativen spontanen Krümmung) mit dem Lipidbereich der kubischen Partikel aus einem Monoolein-Wasser-System beobachtet. Das Röntgenbeugungsmuster zeigte mit zunehmendem Ölsäureanteil einen Übergang von einer bikontinuierlichen kubischen Phase zu einer inversen hexagonalen Phase.^[27] Die innere Mikrostruktur dieser dispergierten Partikel wurde auch mit ¹³C-NMR-Relaxationsmessungen untersucht.^[28] Ein Vergleich der ¹³C-NMR-Relaxationsraten von Monoolein in den dispergierten Partikeln mit den Raten in den entsprechenden nicht dispergierten kubischen Proben ergab, dass die Lipidstrukturen und dynamischen Eigenschaften des ursprünglichen kubischen Systems beibehalten wurden. Diese dispergierten Proben blieben stabil für einen Zeitraum von bis zu sechs Monaten.

¹³C-NMR-Experimente von Nakano et al. mit einem paramagnetischen Ion als Sonde ergaben, dass Metallionen in die Wasserkänele der kubischen Partikel eindringen können.^[25] Bei Zugabe von Europiumionen (Eu^{3+}) wurde eine

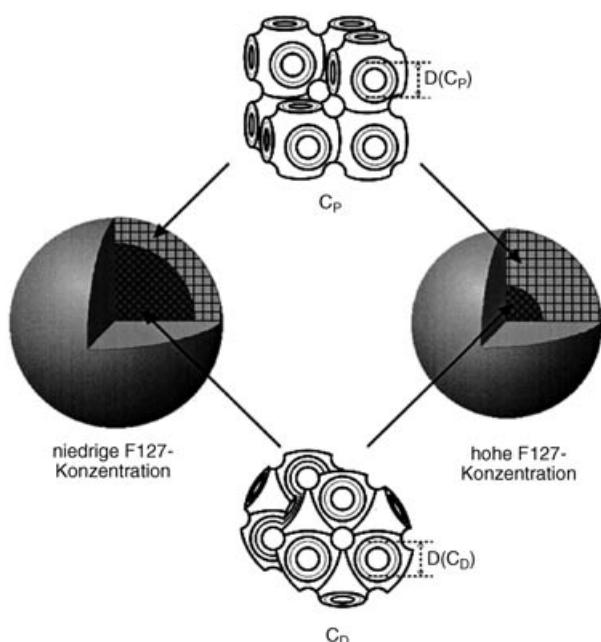


Abbildung 7. Interne Strukturveränderung der kubischen Partikel in Abhängigkeit von der aufgenommenen Menge Poloxamer 407 (F127). a) Bei niedrigem Polymergehalt ist die kubische D-Phase (C_D) die vorherrschende Struktur. b) Die kubische P-Phase (C_P) dominiert bei hohem Polymergehalt.^[25]

Verschiebung des Signals des Carbonylkohlenstoffatoms der [1^{13}C]Ölsäure, die dem Lipidaggregat beigemischt wurde, beobachtet. Stationäre Fluoreszenzspektroskopiemessungen legen die Existenz zweier getrennter, Wasser enthaltender Hohlräume in den kubischen Partikeln nahe: Ein Hohlraum ist verbunden mit der äußeren Wasserumgebung, der zweite ist geschlossen.^[29] Die kubischen Kolloidpartikel wurden *in situ* durch Rasterkraftmikroskopie untersucht,^[16] wobei eine enge Größenverteilung um 300 nm beobachtet wurde (Abbildung 8). Eine Analyse der Größenverteilung der gleichen Probe mit quasielastischer Lichtstreuung (QELS) ergab einen mittleren Teilchendurchmesser von 254 nm. Die *in situ*-Untersuchungstechnik ermöglicht die direkte Beobachtung von Modifikationen in der flüssigkristallinen Struktur unter verschiedenen Bedingungen, wie Zugabe und/oder

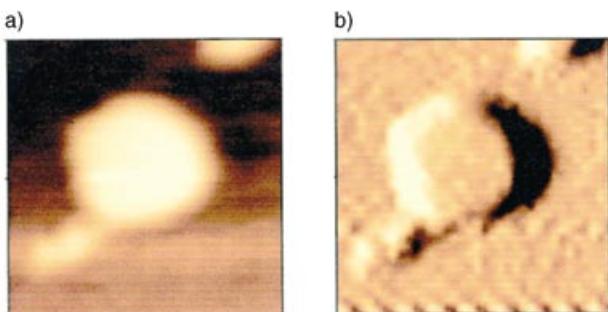


Abbildung 8. Noncontact-Rasterkraftmikroskopie-Bild einer Dispersion kubischer Partikel auf Glimmer: a) topographisches Bild, b) Internal-Sensor-Bild. Das Teilchen in diesen Bildern hat ungefähr die Abmessungen $300 \times 300 \times 23 \text{ nm}^3$.^[16]

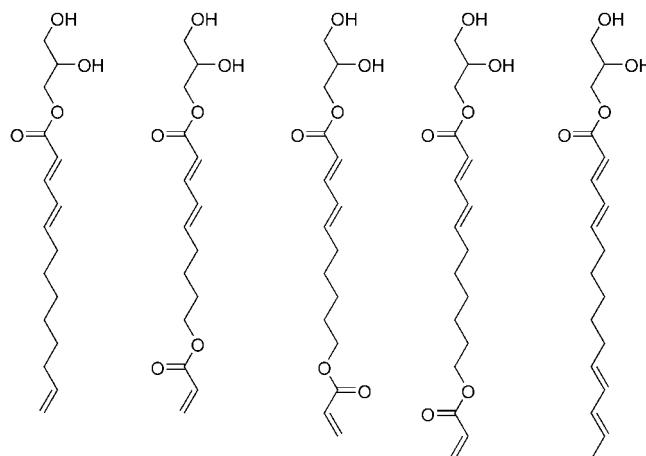
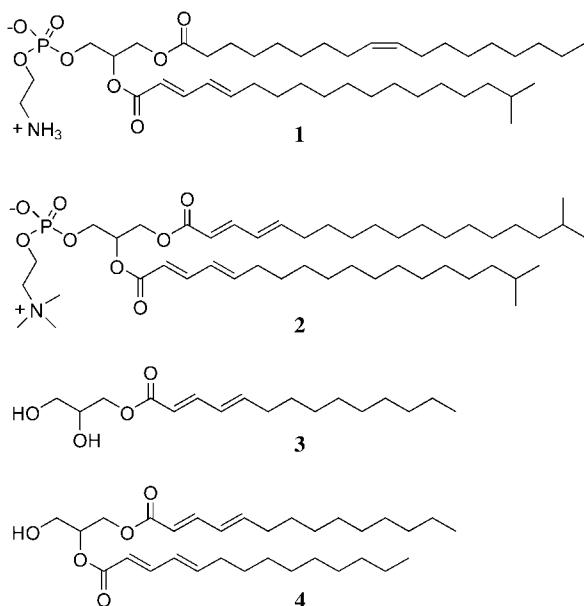
Freisetzung der gelösten Moleküle, Veränderungen der Temperatur oder Konzentration etc.

Kubische Nanopartikel wurden nicht nur von Monoolein-Wasser, sondern auch in wässrigen Dispersionen anderer Lipid-Wasser-Systeme hergestellt. Johnsson und Edwards^[30] berichteten über kubische Nanopartikel aus wässrigen Dispersionen eines Systems aus Dioleoylphosphatidylethanolamin (DOPE) und PEG-derivatisierten Phospholipiden (PEG-Lipid-Wasser-Systeme), wobei die PEG-Lipide als Dispersionsmittel dienten. Kubische Nanopartikel wurden auch aus synthetischen reaktiven Monoglyceriden hergestellt, wie im folgenden Abschnitt beschrieben wird.

4. Polymerisierte kubische flüssigkristalline Nanopartikel

Die inverse bikontinuierliche kubische Phase kann als ein Bindeglied zwischen der lamellaren und inversen hexagonalen Phase angesehen werden (siehe Abschnitt 2). Lipidsysteme bilden kubische Phasen nur innerhalb recht enger Lipidkonzentrations-, Temperatur- und Druckbereiche. Für eine mögliche Anwendung flüssigkristalliner Lipidsysteme muss eine Stabilität dieser Phasen auch in größeren Temperatur- und Konzentrationsbereichen erzielt werden. Ein wichtiger Ansatz für stabile selbstaggregierende Materialien beruht auf der Polymerisation von flüssigkristallinen Phasen reaktiver Lipide.^[31,32] Seit Ende der achtziger Jahre wurde die Polymerisation verwendet, um die chemischen und physikalischen Eigenschaften von lamellaren^[33,34] und nicht lamellaren^[35,36] flüssigkristallinen Lipidsystemen zu modifizieren. Lee et al. beschrieben die Polymerisation einer vorgeformten inversen kubischen Phase und auch einer inversen hexagonalen Phase aus einem Paar synthetischer polymerisierbarer Lipide: einem monodienoylsubstituierten Phosphatidylethanolamin (**1**, Mono-DenPE) und einem bisdienoylsubstituierten Phosphatidylcholin (**2**, Bis-DenPC).^[35] SAXS- und Kryo-TEM-Daten ergaben, dass eine Lipidmischung (**1/2** = 3:1) oberhalb von 60 °C eine kubische D-Phase bildet. Das bei ^{31}P -NMR-Messungen beobachtete Signal einer isotropen Verbindung bei 60 °C ist im Einklang mit diesen Ergebnissen. Eine Redoxpolymerisation der kubischen Phase bei 65 °C führte zu einer Verbreiterung des ^{31}P -NMR-Signals. Dies deutet auf die Erhaltung der nicht lamellaren Phase hin. Das NMR-Signal war sogar nach Abkühlung und längerer Aufbewahrung des Materials bei Raumtemperatur zu beobachten. Dies weist darauf hin, dass die Polymerisation die Stabilität der nicht lamellaren Phase dieser Mischung signifikant erhöht hat.

Auch polymerisierbare Monoglyceride wurden synthetisiert, um die von ihnen gebildeten kubischen Lipidsysteme zu untersuchen.^[37] Nach Srisiri et al. bildet eine 9:1-Mischung aus monodienoylsubstituiertem Monoacylglycerin **3** und bisdienoylsubstituiertem Diacylglycerin **4** ein optisch klares Gel in einer kubischen G-Phase.^[38] Röntgenuntersuchungen der Lipidmischung und ^2H -NMR-spektroskopische Messungen eines Analogons von **3** mit einer deuterierten Glycerinkopfgruppe sowie Untersuchungen mit polarisiertem Licht ergaben eine wohldefinierte kubische Phase zwischen 5 und 45 °C. Die Polymerisation der reaktiven Lipide erhöhte die



Schema 1. Reaktive Monoglyceride für die Polymerisation stabilisierter kubischer Nanopartikel. Die Dienoyleinheit, die mit der Glycerinkopfgruppe verknüpft ist, kann durch Bestrahlung mit UV-Licht (254 nm) selektiv polymerisiert werden, während die Acryloylgruppe am Ende der hydrophoben Kette mithilfe von Redoxinitiatoren polymerisiert wird.

Stabilität des Aggregats unter Beibehaltung der kubischen Phase. Das Signal einer isotropen Verbindung wurde bei Temperaturen bis zu 70°C beobachtet, während die nicht polymerisierte Probe nur unterhalb von 45°C stabil war. Der Diffusionskoeffizient von Wasser in der polymerisierten kubischen Phase wurde durch NMR-Spektroskopie unter dem Einfluss gepulster Feldgradienten bestimmt: Der gemessene Wert von $1.2 \pm 0.2 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{s}^{-1}$ war um eine Größenordnung kleiner als der Wert von reinem Wasser ($2 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{s}^{-1}$), aber so gut wie identisch mit dem Wert in der nicht polymerisierten kubischen Phase. Ähnliche Ergebnisse wurden für die kubischen Phasen des Monoolein-Wasser-Systems gefunden.^[39]

Die oben beschriebenen Lipidsysteme belegen, dass kubische Phasen durch Polymerisation stabilisiert werden können. Allerdings erfordern diese Systeme entweder eine komplizierte Lipidsynthese (PE-PC-System), oder es fehlt ihnen die erforderliche Funktionalität zur Herstellung von vernetzten, stabileren Lipidsystemen (Monoacyl-Diacyl-Glycerinsysteme). Daher entwickelten Yang et al. eine allgemeine Strategie für die Aggregation vernetzter kubischer Phasen aus reaktiven Lipiden. Das Phasenverhalten einer Reihe reaktiver Monoglyceride, einer Gruppe leicht synthetisierbarer Lipide, wurde untersucht.^[40,41] Jedes dieser Monoglyceride hat zwei reaktive Gruppen, die sich an derselben Acylkette befinden (Schema 1). Die Copolymerisation mit einem Vernetzungsreagens für kleine Moleküle führte zur Bildung eines stabilen vernetzten Lipidaggregats. Der Vernetzer beeinflusst auch die Bildung von kubischen Phasen, indem er den hydrophoben Anteil des Systems vergrößert. Dies hat einen ähnlichen Effekt wie die Erhöhung der spontanen negativen Krümmung, was aber in diesen Fällen vorteilhaft für die Bildung kubischer Phasen ist. Bei Hydratisierung der Lipide in Gegenwart von 10–15 Mol-% des Vernetzers Divinylbenzol wurde ein Gel in einer kubischen Phase erhalten. Das kubische Gel wurde dann mit Poloxamer 407 als Dispersionsmittel in Nanopartikel dispergiert. Die folgende, durch UV-

Licht eingeleitete Redoxpolymerisation führte zu einer Reaktion der Dienoyl- und Acryloyl-Gruppen und ergab vernetzte Lipidsysteme, die bei Zugabe organischer Lösungsmittel und Solubilisierung durch Tenside stabil blieben. ^2H -NMR-Spektroskopie ergab für die Proben mit kubischen Nanopartikeln vor der Polymerisation das Signal einer isotropen Verbindung, das nach der Polymerisation verbreitert war – eine erwartete Konsequenz aus der verringerten lateralen Diffusion der polymerisierten Lipide. Diese vernetzten kubischen Nanopartikel sind wahrscheinlich ebenso nützlich wie ihre nicht polymerisierten Vorstufen, und sie sind möglicherweise besser geeignet für Anwendungen unter schwierigen Bedingungen.

5. Herstellung kubischer flüssigkristalliner Nanopartikel

Eine gebräuchliche Methode zur Herstellung kubischer flüssigkristalliner Nanopartikel ist die Hochenergiedispersion kubischer Gele. Kubische Partikel aus Monoolein-Wasser-Systemen werden meist hergestellt, indem Monoolein, Dispersionsmittel und Wasser gemischt und 24 h inkubiert werden. Das so hergestellte kubische Gel wird dann mithilfe von mechanischer Energie oder Ultraschall in nano- und mikrometergroße Teilchen dispergiert. Häufig werden Homogenisatoren für den Dispersionsprozess verwendet, was hohe Drücke und zahlreiche Zyklen erfordert, bis homogene Dispersionen kubischer Partikel erreicht sind.^[42] Die Partikelgröße kann mit einem Hochdruckemulgator weiter reduziert werden.^[25,27] Zur Homogenisierung ist jedoch eine hohe mechanische Energie erforderlich, was das Zersetzungsrisko für das kubische Lipid-Wasser-Aggregat erhöht. Außerdem macht die Viskosität des kubischen Gelintermediats eine Herstellung in größerem Maßstab sehr schwierig. In diesem

Abschnitt beschreiben wir einige Niedrigenergieverfahren als Alternative zu den geläufigen Dispersionsmethoden mit langen Inkubationszeiten, viskosen Gelzwischenprodukten und hohem Energiebedarf.

Spicer et al. berichteten über die Entwicklung eines „Hydrotrop“-Verfahrens zur spontanen Bildung von kubischen Partikeln durch die Verdünnung eines Monoolein-Ethanol-Wasser-Systems.^[9] Hier wird als Hydrotrop ein Molekül bezeichnet, das zwar sowohl hydrophobe als auch hydrophile Eigenschaften hat, aber kein Tensid-Verhalten aufweisen kann. Solche Hydrotrope können flüssigkristalline Phasen auftrennen, die Dispergierung von flüssigkristallinen Partikeln erleichtern, aber selbst keine Flüssigkristallphasen bilden. Wenn sie in ausreichender Menge zugemischt werden, können sie die Löslichkeit wasserunlöslicher Lipide wie Monoolein (die Monooleinlöslichkeit in Wasser beträgt ca. 10^{-6} M) erhöhen. Ein Hydrotrop-Verfahren zur Herstellung lamellarer flüssigkristalliner Vesikel durch die Verdünnung einer flüssigen Vorstufe mit Wasser wurde bereits von Friberg et al. publiziert.^[43,44]

Aus Monoolein und dem Hydrotrop Ethanol erhält man eine flüssige Vorstufe, die bei Verdünnung mit Wasser spontan – vermutlich über eine homogene Keimbildung – kubische Nanopartikel bildet. Die Verdünnung des Monoolein-Wasser-Hydrotrop-Systems kann zu kleinen Partikeln in der Größenordnung um 50 nm oder größeren Teilchen mit Abmessungen bis zu 20 µm führen. Kleinere kubische Nanopartikel wurden mit diesem Verdünnungsverfahren zuverlässiger hergestellt als mit den konventionellen Methoden. Im Prinzip kann jede Kombination von Lipid und Hydrotrop, die kubische Flüssigkristallphasen bildet, mit dieser einfachen Methode dispergiert werden. Kolloidal stabilisierte Dispersionen zur kontrollierten Wirkstofffreisetzung können mit diesem Verfahren hergestellt werden, wenn die Wirkstoffe und die kolloidalen Stabilisatoren direkt in eine der beiden Lösungen integriert werden. Dieses Verfahren könnte bei Anwendungen verwendet werden, die eine Bildung kubischer Nanopartikel *in situ* erfordern.

Der niedrige Energiebedarf und die einfache Handhabung sprechen zwar für das Hydrotrop-Verfahren, für viele Anwendungen wären aber trockene Pulver oder granulare Materialien vorteilhafter als flüssige Produkte. Gefriertrocknung ist eine geläufige Methode zur Herstellung von Liposomen für Anwendungen im Bereich des Wirkstofftransports. Auf diese Weise wurden pulverförmige Vorstufen wirkstoffhaltiger Vesikel für die Zufuhr von DNA und Proteinen durch Inhalation hergestellt.^[45] Kim et al. versuchten, mit Gefriertrocknung pulverförmige Vorstufen von kubischen Nanopartikeln herzustellen.^[46] Allerdings veröffentlichten sie keine Kryo-TEM- oder SAXS-Daten, sodass die kubische Struktur der Partikel nicht eindeutig belegt ist. Eine weitere Methode zur Herstellung pulverförmiger Vorstufen von Lipidpartikeln ist die Sprührohrtechnik (Abbildung 9). Freitas und Müller berichteten über die Herstellung von Lipidnanopartikelpulvern aus nicht flüssigkristallinen Lipiden durch Sprührohrtechnik.^[47] Zwei unterschiedliche pulverförmige Vorstufen kubischer Nanopartikel wurden von Spicer und Mitarbeitern mithilfe dieser Methode hergestellt: 1) eine in Stärke eingekapselte Monoolein-Vorstufe aus einer Dispersion von

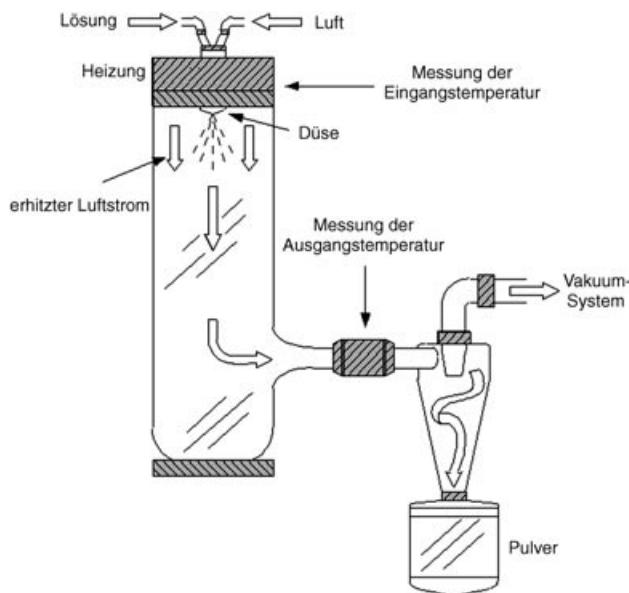


Abbildung 9. Sprührohrtrocknungsapparatur für die Herstellung trockener Pulvervorstufen von kubischen Nanopartikeln.^[48]

kubischen flüssigkristallinen Partikeln in einer wässrigen Stärkelösung und 2) eine in Dextran eingekapselte Monoolein-Vorstufe durch Sprührohrtrocknung einer Emulsion eines Ethanol-Dextran-Monoolein-Wasser-Systems.^[48] Die Kapselstoffe wurden eingeführt, um die Pulverkohäsion während der Sprührohrtrocknung herabzusetzen und um als lösliche kolloidale Stabilisatoren bei der Hydratisierung der pulverförmigen Vorstufen zu wirken. Beide Vorstufen bilden bei der Hydratisierung des Pulvers 600 nm große (volumengewichteter Mittelwert), kolloidal stabile, kubische Nanopartikel. Das dextranstabilisierte System wies eine engere Größenverteilung des Pulvers auf, da sich eine Emulsion einfacher dispergieren und versprühen lässt als eine Dispersion. Die Verwendung pulverförmiger Vorstufen macht die Anwendungen kubischer Nanopartikel einfacher und vielfältiger: Kubische Nanopartikel können nun in einfacher Weise von Produktions- und Entwicklungspersonal hergestellt und verarbeitet werden; dies ist nicht mehr auf Forscher mit Zugang zu speziellen Instrumenten begrenzt. Allerdings bedeutet der große Polymeranteil, der für die Einkapselung notwendig ist (75 Gew.-% für Stärke und 60 Gew.-% für Dextran), eine gewisse Einschränkung dieses Verfahrens. Der geringere Anteil an eingekapseltem Lipid führt dazu, dass nur eine begrenzte Wirkstoffmenge für die nachfolgende Zufuhr aufgenommen werden kann. Das Verfahren mit trockenen pulverförmigen Vorstufen eignet sich daher eher für hochwirksame Stoffe wie Medikamente, Enzyme, Vitamine etc.

6. Zusammenfassung und Ausblick

Kubische flüssigkristalline Nanopartikel wurden aus wässrigen Dispersionen kubischer Lipid-Wasser-Phasen hergestellt. Bei Anwesenheit bestimmter Dispersionsmittel sind diese Teilchen kinetisch stabil, und ihre Eigenschaften

wurden mit verschiedenen experimentellen Techniken untersucht. Die meisten Arbeiten betreffen Monoolein-Wasser-Systeme, aber kubische Nanopartikel anderer Lipid-Wasser-Systeme wurden ebenfalls untersucht. Die kubischen Nanopartikel können durch Polymerisation reaktiver Lipide in den kubischen Lipidsystemen weiter stabilisiert werden. Verschiedene Niedrigenergiemethoden wurden entwickelt, um die Herstellung und Anwendung kubischer Nanopartikel zu vereinfachen.

Zum Abschluss dieses Kurzaufsatzen diskutieren wir kurz die potentiellen Anwendungen kubischer Nanopartikel aus Lipidsystemen. Die Anwendbarkeit bikontinuierlicher kubischer Gele beim Wirkstofftransport wurde seit etwa 1990 untersucht.^[49,50] Die Möglichkeit, verschiedene Wirkstoffe kontrolliert aufzunehmen und abzugeben, lässt kubische Gele als universelles Werkzeug zum Wirkstofftransport geeigneter erscheinen als Liposomen und Hydrogele. Die hohe Viskosität kubischer Gele erschwert jedoch ihre direkte Anwendung, beispielsweise die Verabreichung über eine Spritze. Kubische Nanopartikel aus wässrigen Dispersionen kubischer Gele eignen sich besser als Transportsysteme für eine gleichmäßige Wirkstofffreisetzung. Die Nanostruktur der kubischen Lipidaggregate, die auch in den entsprechenden Nanopartikeln erhalten bleibt, hat ähnlich vorteilhafte Eigenschaften wie jene von nicht dispergierten kubischen Gelen, die Nanopartikel sollten sich aber im Unterschied zu den nicht dispergierten Gelen viel einfacher handhaben und verarbeiten lassen. Ein Vorteil der kubischen Nanopartikel gegenüber den Liposomen besteht in dem großen Verhältnis von Doppelschichtfläche zu Teilchenvolumen. Dies ermöglicht eine höhere relative Beladung mit lipophilen und amphiphilen Wirkstoffen. Die Beladung mit den Wirkstoffen kann entweder vor der Bildung der kubischen Phase durch direkte Zugabe zu den geschmolzenen Lipiden und/oder zur wässrigen Phase erfolgen oder nach deren Bildung durch Diffusion in die Lipid-Wasser-Struktur. Amphiphile oder lipophile Wirkstoffe sollten in der Lipidmatrix stabil bleiben, und auch ihre Freisetzung wird durch die Struktur gesteuert. Eine Beladung mit wasserlöslichen Wirkstoffen ist wegen der offenen Wasserkanäle in kubischen Phasen schwierig zu realisieren. Lynch et al. haben jedoch nachgewiesen, dass der Einbau kationischer Tenside in die flüssigkristalline Phase zu einer erhöhten Beladung mit negativ geladenen wasserlöslichen Wirkstoffen führt.^[51]

Eingegangen am 15. Juli 2003

Online veröffentlicht am 15. Juli 2004

- [1] M. J. Lawrence, *Chem. Soc. Rev.* **1994**, 23, 417-423.
- [2] K. Larsson, *J. Phys. Chem.* **1989**, 93, 8453-8467.
- [3] V. Luzzati, A. Tardieu, T. Gulik-Krywicki, E. Rivas, F. Reiss-Husson, *Nature* **1968**, 220, 485.
- [4] L. E. Scriven, *Nature* **1976**, 263, 123-125.
- [5] A. D. Benedicto, D. F. O'Brien, *Macromolecules* **1997**, 30, 3395-3402.
- [6] A. H. Schoen, *NASA Tech. Note* **1970**, D-5541, 1-98.
- [7] S. T. Hyde, B. Ericsson, S. Andersson, K. Z. Larsson, *Z. Kristallogr.* **1984**, 168, 213-219.
- [8] H. Qiu, M. Caffrey, *Biomaterials* **2000**, 21, 223-234.

- [9] P. T. Spicer, K. L. Hayden, M. L. Lynch, A. Ofori-Boateng, J. L. Burns, *Langmuir* **2001**, 17, 5748-5756.
- [10] G. Lindblom, L. Rilfors, *Biochim. Biophys. Acta* **1989**, 988, 221-256.
- [11] L. B.-Å. Johansson, G. Lindblom, *J. Chem. Phys.* **1983**, 78, 1519-1522.
- [12] C. Czeslik, R. Winter, G. Rapp, K. Bartels, *Biophys. J.* **1995**, 68, 1423-1429.
- [13] A. Nilsson, A. Holmgren, G. Lindblom, *Biochemistry* **1991**, 30, 2126-2133.
- [14] H. Chung, M. Caffrey, *Biophys. J.* **1995**, 69, 1951-1963.
- [15] V. Razumas, Z. Talaikyte, J. Barauskas, K. Larsson, Y. Miezis, T. Nylander, *Chem. Phys. Lipids* **1996**, 84, 155-164.
- [16] C. Neto, G. Aloisi, P. Baglioni, K. Larsson, *J. Phys. Chem. B* **1999**, 103, 3896-3899.
- [17] J. S. Patton, M. C. Carrey, *Science* **1979**, 204, 145-148.
- [18] M. Lindström, H. Ljusberg-Wahren, K. Larsson, B. Borgström, *Lipids* **1981**, 16, 749-754.
- [19] J. Gustafsson, T. Nylander, M. Almgren, H. Ljusberg-Wahren, *J. Colloid Interface Sci.* **1999**, 211, 326-335.
- [20] W. Buchheim, K. Larsson, *J. Colloid Interface Sci.* **1987**, 117, 582-583.
- [21] P. Alexandidis, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **1997**, 1, 490-501.
- [22] T. Landh, *J. Phys. Chem.* **1994**, 98, 8453-8467.
- [23] J. Gustafsson, H. Ljusberg-Wahren, M. Almgren, K. Larsson, *Langmuir* **1996**, 12, 4611-4613.
- [24] J. Gustafsson, H. Ljusberg-Wahren, M. Almgren, K. Larsson, *Langmuir* **1997**, 13, 6964-6971.
- [25] M. Nakano, A. Sugita, H. Matsuoka, T. Handa, *Langmuir* **2001**, 17, 3917-3922.
- [26] P. Stroem, D. M. Anderson, *Langmuir* **1992**, 8, 691-709.
- [27] M. Nakano, T. Teshigawara, A. Sugita, W. Leesajakul, A. Taniguchi, T. Kamo, H. Matsuoka, T. Handa, *Langmuir* **2002**, 18, 9283-9288.
- [28] M. Monduzzi, H. Ljusberg-Wahren, K. Larsson, *Langmuir* **2000**, 16, 7355-7358.
- [29] L. Q. Zhang, J. Y. Um, H. Chung, I. C. Kwon, G. Z. Li, S. Y. Jeong, *J. Dispersion Sci. Technol.* **2003**, 24, 123-128.
- [30] M. Johnsson, K. Edwards, *Biophys. J.* **2001**, 80, 313-323.
- [31] D. F. O'Brien, B. Armitage, A. D. Benedicto, D. E. Bennett, H. G. Lamparski, Y.-S. Lee, W. Srisiri, T. M. Sisson, *Acc. Chem. Res.* **1998**, 31, 861-868.
- [32] A. Mueller, D. F. O'Brien, *Chem. Rev.* **2002**, 102, 727-758.
- [33] D. F. O'Brien, *Trends Polym. Sci.* **1994**, 2, 183-188.
- [34] H. Ringsdorf, B. Schlarb, J. Venzmer, *Angew. Chem.* **1988**, 100, 113-162; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1988**, 27, 113-158.
- [35] Y.-S. Lee, J. Yang, T. M. Sisson, D. A. Frankel, J. T. Gleeson, E. Aksay, S. L. Keller, S. M. Gruner, D. F. O'Brien, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 5573-5578.
- [36] W. Srisiri, T. M. Sisson, D. F. O'Brien, K. M. McGrath, Y. Han, S. M. Gruner, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 4866-4873.
- [37] W. Srisiri, H. G. Lamparski, D. F. O'Brien, *J. Org. Chem.* **1996**, 61, 5911-5915.
- [38] W. Srisiri, A. D. Benedicto, D. F. O'Brien, T. P. Trouard, G. Orädd, S. Persson, G. Lindblom, *Langmuir* **1998**, 14, 1921-1926.
- [39] G. Lindblom, K. Larsson, L. B.-Å. Johansson, K. Fontell, S. Forsén, *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, 101, 5465-5470.
- [40] D. Yang, D. F. O'Brien, S. R. Marder, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 13388-13389.
- [41] D. Yang, S. Liu, D. F. O'Brien, S. R. Marder, *Polym. Mater. Sci. Eng.* **2003**, 88, 100-101.
- [42] H. Ljusberg-Wahren, L. Nyberg, K. Larsson, *Chim. Oggi* **1996**, 14, 40-43.
- [43] S. E. Friberg, S. Campell, L. Fei, H. Yang, R. Patel, P. A. Aikens, *Colloids Surf. A* **1997**, 129-130, 167-174.

- [44] S. E. Friberg, H. Yang, L. Fei, S. Sadasivan, D. H. Rasmussen, P. A. Aikens, *J. Dispersion Sci. Technol.* **1998**, *19*, 19-30.
- [45] F. C. Szoka, A. Rolland, J. Wang, US Patent 5811406, **1998**.
- [46] J. S. Kim, H. K. Kim, H. Chung, Y. Y. Sohn, I. C. Kwon, S. Y. Jeong, *Proc. Int. Symp. Controlled Release Bioact. Mater.* **2000**, *27*, 1118-1119.
- [47] C. Freitas, R. H. Müller, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **1998**, *46*, 145-151.
- [48] P. T. Spicer, W. B. Small, M. L. Lynch, J. L. Burns, *J. Nanopart. Res.* **2002**, *4*, 297-322.
- [49] C. J. Drummond, C. Fong, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2000**, *5*, 449-456.
- [50] J. C. Shah, Y. Sadhale, D. M. Chilukuri, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2001**, *47*, 229-250.
- [51] M. L. Lynch, A. Ofori-Boateng, A. Hippe, K. Kochvar, P. T. Spicer, *J. Colloid Interface Sci.* **2003**, *260*, 404-413.

Quality counts...

The best of chemistry every week

12180404_gu

Wiley-VCH
P.O. Box 10 11 61
69451 Weinheim
Germany
Phone +49 (0) 6201-606-400
Fax +49 (0) 6201-606-184
e-mail: angewandte@wiley-vch.de
www.angewandte.org

Angewandte Chemie International Edition is a journal of the GDCh,
the German Chemical Society

GDCh

WILEY-VCH