

5 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, auf der Basis neuartiger, nanostrukturierter diagnostischer und therapeutischer Arzneistoffträgersysteme eine flexible Oberflächenmodifikation zu erzielen und den Einfluss auf die Charakteristik der Partikel *in vitro* und *in vivo* zu untersuchen. Zur Umsetzung dieser Thematik wurden zwei verschiedene Arten kolloidaler Arzneistoffträgersysteme verwendet, welche beide eine flexible Oberflächenmodifikation auf der Grundlage elektrostatischer Wechselwirkungen ermöglichten:

- (I) Selbstaggregierende nanopartikuläre Systeme auf Polyelektrolytbasis
- (II) Feste Polymernanopartikel

Ia) Selbsaggregierende diagnostische Systeme

Wasserlösliche Cyaninfarbstoffe (TSC, TSC-CS) konnten durch Komplexierung mit entgegengesetzt geladenen Polyelektrolyten (PEI, PEG-PEI, kationische Stärke) in nanopartikuläre Ladungskomplexe überführt werden. Die Größe der Komplexe wurde durch das Ladungsverhältnis der eingesetzten Komplexpartner sowie durch das Molekulargewicht des Polymers beeinflusst, wobei ein Polymerladungsüberschuss eine ausreichende elektrostatische Stabilisierung gewährleistete. Eine stabile Funktionalisierung der Partikeloberfläche konnte durch die kombinierte Titration mit einem sterisch stabilisierenden Blockcopolymer (Glu(10)-b-PEG(110)) und einem potentiellen Rezeptor-Liganden (NADP) erzielt werden. Der resultierende Stabilitätsgewinn wurde durch eine Inkubation der Partikel in Mausplasma als biorelevantes Testmedium eindeutig aufgezeigt. Genutzt werden konnte dafür die sehr charakteristische Analytik dieser Nanopartikel, basierend auf der Bildung von J-Aggregaten im Zuge der Komplexherstellung. Mit Hilfe dieser speziellen molekularen Packungsordnung der Farbstoffe im Komplex können Aussagen zu physikochemischen Veränderungen, wie sie durch eine Ladungstitration auftreten, gemacht werden. Aufgrund der J-Aggregat-spezifischen Eigenschaften konnte gezeigt werden, welchen Einfluss Ladungsstärke, Molekülgröße und sterisch stabilisierende Effekte der zur Modifikation eingesetzten Verbindungen auf die Komplexstabilität haben können.

Dieses vollkommen neue System bietet den Vorteil, hydrophile Substanzen effizient in die Matrix eines wasserunlöslichen Komplexes zu verkapseln. Die Formulierung überzeugt durch

einen geringen Aufwand bei der Partikelpräparation, Tensidfreiheit sowie elektrostatisch vielseitig modifizierbare Oberflächen. Besonders die Möglichkeit der strahlungsfreien, fluoreszenzbasierten Detektion durch Optical Imaging macht diese Nanopartikel zu einem interessanten diagnostischen Testsystem *in vitro* als auch *in vivo*.

Ib) Selbsaggregierende therapeutische Systeme

Die schwache Arzneistoffbase Vatalanib succinat konnte mit Hilfe des anionisch modifizierten Cyclodextrins β CDPO₄ in einen nanopartikulären Komplex überführt werden. Größe und Wirkstoffbeladung der Partikel waren vor allem über das Verhältnis der Komplexpartner während der Herstellung steuerbar, wobei nur durch Überschuss der nicht stabilisierenden Komponente Vs eng verteilte Nanopartikel präpariert werden konnten. Für die Komplexstabilität ist die Art und vermutlich auch die Anzahl der ladungstragenden Gruppen am CD entscheidend, wie durch einen Vergleich mit Vs-SB β CD-Komplexen deutlich gemacht werden konnte. Anhand verschiedener physikochemischer Untersuchungen (FTIR, DSC und XR-PD) und wurde gezeigt, dass es sich sehr wahrscheinlich um eine Kombination aus Ladungs- und Einschlusskomplex handelt. Die Untersuchung der Komplexe in den biorelevanten Medien FaSSIF und FeSSIF lässt den Schluss zu, dass *in vivo* eine ausreichende Stabilität der Komplexe gewährleistet werden kann. An diesem therapeutisch einsetzbaren System konnte eine Oberflächenmodifikation, basierend auf elektrostatischen Wechselwirkungen, erfolgreich umgesetzt werden. Eine Umladung der Partikeloberflächenladungen durch Überschuss des Blockcopolymers gewährleistete dabei eine ausreichende Stabilität nach der Titration. Bei Ladungskompensierung auf 0 mV wurde dagegen eine Destabilisierung des Systems beobachtet.

Derartige nanopartikuläre Vs- β CDPO₄-Komplexe wurden erstmals im Rahmen dieser Arbeit beschrieben und stellen ein neues Drug Delivery System zur Überbrückung der Problematik der pH-abhängigen Löslichkeit von Arzneistoffbasen dar.

IIa) Feste Polymernanopartikel aus Polyalkylcyanoacrylat (PACA)

Basierend auf einer Verkapselung von Polyaminen in eine Polymermatrix konnten kationisch funktionalisierte PBCA-Nanopartikel mittels Nanopräzipitation hergestellt werden. Voraussetzung dafür war die Verwendung von Polykationen mit ausreichend hohem Molekulargewicht, wie anhand von zwei verschiedenen Systemen fester Polymernanopartikel

(PBCA-PEI und PBCA-P[DMAEMA]) gezeigt werden konnte. Auch gut wasserlösliche Farbstoffe wie TSC konnten in den Partikelkern verkapselt werden, sofern der niedrigmolekulare Farbstoff und das hochmolekulare Polykation als Ionenkomplex in das Matrixpolymer PBCA durch einen schlagartigen Fällungsprozess eingeschlossen wurden. Durch die zusätzliche Verkapselung von Fluoreszenzfarbstoffen wurde eine Detektionsmöglichkeit im Rahmen von Zellkultur- oder Tierversuchen gewährleistet. Die funktionalisierten, festen Polymernanopartikel zeichneten sich gegenüber den Ladungskomplexen durch eine bessere Kolloidstabilität aus. Mittels elektrostatischer Wechselwirkungen wurden verschiedene Modifikationen der kationisch funktionalisierten Partikeloberfläche durchgeführt, wobei die unterschiedlichen Farbstoffe keinen Einfluss auf die Titration besaßen. Als entscheidende Parameter für eine erfolgreiche Modifikation wurden identifiziert: (i) die Stärke der Ladungswechselwirkungen, (ii) die Löslichkeit des Titranten im umgebenden Medium sowie (iii) eine sterisch stabilisierende Komponente zum Ausgleich der geminderten elektrostatischen Stabilisierung. Ihre Eignung in biologischen Systemen wurde durch anschließende Zellkulturversuche geprüft.

Iib**) HeLa-Zellkulturversuche mit funktionalisierten PBCA-Nanopartikeln**

Die kationisch funktionalisierten Partikeloberflächen der zuvor charakterisierten PBCA-P(DMAEMA)-Nanopartikel führten zu einer starken Haftung auf HeLa-Zellen, vermutlich durch elektrostatische Wechselwirkungen mit anionischen Membranbestandteilen. Entsprechend den höheren Partikelkonzentrationen auf der Zelloberfläche wurde eine Internalisierung in die Zelle begünstigt, wie durch Vergleich der Zellaufnahme unmodifizierter Partikel, Folsäure und Glu(10)-b-PEG(110) modifizierter Partikel festgestellt werden konnte. Die Internalisierung in die Zelle ist anhand von Glu(10)-b-PEG(110) modifizierten PBCA-P(DMAEMA)-Nanopartikeln näher untersucht worden. Der vorwiegende Aufnahmeprozess in die Zelle fand offensichtlich über eine nicht-rezeptorvermittelte Endozytose statt, nachweisbar durch punktförmig fluoreszierende Endosomen bzw. Endolysosomen. Eine Anreicherung der Partikel in der Zelle erfolgte verstärkt kernnah und im Bereich von Zellorganellen wie Mitochondrien, wobei Ursachen wie aktive, Energie verbrauchende Transportvorgänge über Mikrotubuli in Richtung Zellkern nur vermutet werden können. Die flächige Fluoreszenz im Vergleich zu den sehr stark leuchtenden Endosomen und Endolysosomen ist eindeutiges Zeichen für eine Freisetzung der Partikel in das Zytoplasma. Längere Inkubationszeiten oder höhere Konzentrationen führten

zu einer veränderten, sehr kernnahen Verteilung innerhalb der Zelle. Mit Hilfe von Falschfarbendarstellungen konnten Unterschiede in der Intensitätsverteilung der angereicherten Partikel gut veranschaulicht werden.

Die Ergebnisse der Zellkulturversuche belegen, dass die funktionalisierten und oberflächenmodifizierten PBCA-Nanopartikel sehr effizient in die Zelle internalisiert und ins Zytoplasma freigesetzt werden, weshalb sie ideale Voraussetzungen für eine Anwendung als diagnostisches oder therapeutisches kolloidales Trägersystem besitzen.

IIc) In vivo Untersuchung Glu(10)-b-PEG(110) modifizierter PBCA-P(DMAEMA)-Nanopartikel mittels Optical Imaging

Der abschließende Tierversuch konnte zeigen, dass Glu(10)-b-PEG(110) modifizierte PBCA-P(DMAEMA)-Nanopartikel nach i.v. Applikation unter bestimmten Voraussetzungen in der Lage sind, sich über passive Anreicherungsmechanismen wie den EPR-Effekt in Tumorgewebe anzureichern. Die Untersuchung der Tumoren ex vivo belegte bei insgesamt drei von vier Tieren eine deutliche Verstärkung des Fluoreszenzkontrastes im behandelten Tumorgewebe. An einem Versuchstier konnte der Tumor in vivo mittels Optical Imaging eindeutig nachgewiesen werden, wobei eine mehrfache, zeitversetzte Detektion der Fluoreszenz möglich war. Demzufolge konnte ein Teil der Partikel in vivo ausreichend lange zirkulieren und sich entsprechend im Tumor anreichern, weshalb davon ausgegangen wird, dass die pegylierte Oberfläche stabil genug mit der Partikeloberfläche verbunden war. Eine schnelle biliäre Eliminierung nicht-tumorassoziierter Partikel wird anhand der Versuchsdaten vermutet und wäre optimale Voraussetzung für ein nebenwirkungsarmes System.

Anhand dieses neuen diagnostischen Drug Delivery Systems konnte mittels einer nicht-invasiven externen Imaging-Technik belegt werden, dass durch Ausnutzung passiver Anreicherungsmechanismen partikuläre Arzneistoffträgersysteme im Tumorgewebe aufgenommen werden.

Ausblick

Die in dieser Arbeit entwickelten, neuartigen diagnostischen und therapeutischen Nanopartikel stellen potentielle Drug Delivery Systeme für eine verbesserte Arzneistofftherapie dar. Aufgrund der hohen Modularität der Systeme sind vor allem hinsichtlich der Partikeloberfläche vielfältige Anpassungen für optimierte pharmazeutische

Anwendungen am Patienten möglich. Vor allem die gewonnenen Erkenntnisse zur Nutzung von elektrostatischen Wechselwirkungen für Oberflächenmodifikationen bilden eine wertvolle Basis, um zukünftig passive und aktive Anreicherungsmechanismen kolloidaler Arzneistoffträgersysteme besser anpassen und somit auch besser steuern zu können. Auf der Basis von selbstaggregierenden Polyelektrolytkomplexen und festen Polymernanopartikeln wurden sehr unterschiedliche Systeme entwickelt und charakterisiert, wodurch mit dieser Arbeit ein breites Spektrum übertragbarer Daten für ähnliche kolloidale Systeme zur Verfügung gestellt wird.

