

## 5 Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Einfluß der Oberflächenveränderungen von PMMA-Nanopartikeln durch die Adsorption von amphiphatischen Tensiden hinsichtlich ihrer Anreicherung in Tumoren zu untersuchen. Die Partikelpräparationen wurden zuvor auf - für den *in vivo*-Einsatz wichtige - physikochemische Eigenschaften hin charakterisiert. In anschließenden *in vivo*-Untersuchungen wurde geprüft, welche der Partikelpräparationen in der Lage sind, hohe Konzentrationen im tumorösen Gewebe zu erzielen, um als potentes Drug Delivery System für Tumorerkrankungen dienen zu können.

### 1. *in vitro*-Ergebnisse

Von entscheidender Bedeutung für den Einsatz kolloidaler Systeme, die intravenös appliziert werden sollen, sind die **Größe** und das **Aggregationsverhalten** der Partikel. Die Partikel wurden nach ihrer Resuspendierung im Ultraschallbad behandelt. Nach einer zwanzigminütigen Beschallzeit kam es zu keiner nennenswerten Veränderung in der Größe der tensidbeschichteten Partikel. Die von Tröster (1990) und Borchard (1993) beschriebenen Beschallzeiten von 5min pro Zubereitung wurden als nicht ausreichend befunden. Beide Autoren beschäftigten sich ebenfalls mit durch  $\gamma$ -Bestrahlung hergestellten PMMA-Partikeln. Die Größenreduktion ist als eine durch Ultraschallbehandlung und den Einsatz oberflächenaktiver Polymere, Verkleinerung der Partikelaggregate zu verstehen. Besonders gut ist das im Volumenverteilungs-Diagramm (Abb. 5) der Gruppe **a** im Vergleich zu den Diagrammen der anderen Gruppen zu erkennen. Desweiteren kann mit bloßem Auge eine erneute Aggregation unmittelbar nach der Ultraschallbehandlung bei den unbeschichteten Partikeln beobachtet werden. Alle nanopartikulären Systeme neigen aus energetischen Gründen zur Flockung oder Aggregation. Durch den Ultraschalleinsatz kommt es zur Herauslösung einzelner Partikel und Partikelgruppen aus den Aggregaten. Nach Einsatz der oberflächenaktiven Polymere (Tenside) kam es zu einer deutlichen Verkleinerung der Partikelaggregate mit einem Minimum von 117 nm (Modalwert) für die Präparation **b** (Polysorbat 80). Interessant ist, daß die Tenside der Zubereitungen **c** und **d** nicht in der Lage sind, den Durchmesser der Aggregate ebenfalls so weit zu verkleinern und damit soviel Partikel wie möglich voneinander zu lösen. In den Volumenverteilungs-Diagrammen (Abb. 6, 7, 8,) der Gruppen **b**, **c** und **d** wird deutlich, wie nach Tensidzugabe die großen Aggregate, repräsentiert durch den hohen rechten Peak im Diagramm der Gruppe **a**, verringert (**d**) oder vollständig (**b**, **c**) aufgehoben werden.

Die in den Verlaufsuntersuchungen zur *Stabilität* der beschichteten Präparationen (**b, c, d**) gefundenen Ergebnisse zeigen, daß nach einer einmaligen Ultraschallbehandlung (20 min) keine weiteren Beschallungen nötig sind, um über einen Zeitraum von 3 Tagen stabile, reproduzierbare Aggregatgrößen zu erzielen. Dies ist eine wesentliche Voraussetzung, um die Ergebnisse aus den Tierversuchen vergleichend interpretieren zu können. So sind die von Tröster (1990) und Borchard (1993) beschriebenen Beschallungen vor jeder einzelnen Applikation nur für die einfachen Partikel (**a**) nötig, nicht aber für die übrigen Zubereitungen. Nach **Inkubation der Partikel im Plasma** konnte eine deutliche Verminderung der Aggregatdurchmesser gefunden werden. Der Durchmesser der Aggregate liegt bis auf einen ganz geringen Anteil von 0,002% bei **a** und **d**, für alle vier Zubereitungen bei 107 nm (Modalwert). Die Verminderung der Aggregatdurchmesser ist wahrscheinlich durch den Oponisierungsprozeß bedingt. Wahrscheinlich kommt es durch die Adsorption der Protein zu einer weiteren Verkleinerung der Aggregate mit anschließender, durch die adsorbierten Plasmaproteine bedingten, gleichsinnigen Aufladung der Partikel. Auch Tröster (1990) und Borchard (1993) fanden bei ihren Untersuchungen nach Inkubation der Partikel im Plasma eine Größenreduktion bei den unbeschichteten Zubereitungen. Für die mit Tensiden beschichteten Partikel kam es dagegen aber zu einer Zunahme der mittleren Aggregatdurchmesser. Die Ursache für die Größenreduktion der Partikelaggregate in den eigenen Untersuchungen liegt wahrscheinlich einmal in einer längeren und stärkeren Ultraschallbehandlung. Desweiteren wurden die Partikel erst nach einer Inkubationszeit von fünf Minuten im Plasma vermessen und nicht, wie bei Tröster (1990) und Borchard (1993), unmittelbar nach der Injektion der Partikel ins Plasma.

Die in den Untersuchungen anderer Autoren (Kreuter et al., 1979; Tröster, 1990) gefundenen hohen Lungenkonzentrationen von PMMA-Nanopartikeln, bis zu 43% (Polysorbat 80 beschichtet PMMA-Partikel) der gesamt applizierten Dosis, sind nach Kreuter (1983) auf Partikelaggregationen zurückzuführen. In den eigenen Untersuchungen konnten keine hohen Lungenwerte (1-3%) beobachtet werden. Diese geringen Lungenkonzentrationen sind ein weiteres Indiz für eine ausreichend lange Beschallzeit und ein Hinweis darauf, daß die Partikel nach ihrer Herstellung stabil sind und es zu keinen Aggregationen unter den Nanopartikeln und/oder mit zellulären Bestandteilen im Blutstrom kommt.

Da die Partikelformulierungen im Plasma einen einheitlichen Durchmesser zeigten, kann vermutet werden, daß nur die Konformation der Tenside auf der Oberfläche mit der daraus

resultierenden Proteinadsorption, für die unterschiedlichen Körperverteilungen verantwortlich ist, nicht aber die im Wasser gemessenen unterschiedlichen Partikelgrößen.

Die durch die **Elektronenmikroskopie** gewonnenen Aussagen zur Größe der PMMA-Partikel stimmen mit den Ergebnissen, die mit Hilfe der Laserdiffraktometrie/PIDS-Technologie gewonnen wurden, überein. Die Form der Partikel ist nicht wie vermutet rund, sondern oval bis eiförmig. Für die mathematischen Berechnung der Partikelgröße im LS230 wird eine Kugelform angenommen. Diese Information spielt aber bei der Beurteilung der Gesamtpartikelpopulation nur eine untergeordnete Rolle, da für den *in vivo*-Einsatz (besonders intravenöse Applikation) nanopartikulärer Systeme neben der Partikelgrößenverteilung immer der Maximaldurchmesser von entscheidender Bedeutung ist.

Die **Ladung** der Partikelzubereitungen wurde über die elektrophoretische Motilität ermittelt und als Zeta-Potential (mV) angegeben. Der Wert von -17,7 mV für die Präparation **a** kann als kritisches Potential bezeichnet werden, da es bei dieser Präparation unmittelbar nach jeder Ultraschallbehandlung zu einer erneuten, mit bloßem Auge sichtbaren Flocken- und Aggregatbildung kam. Erst durch die Zugabe von Schutzkolloiden (Tenside), kam es zu einer Abnahme des Potentials und damit zu einer Bildung eines stabilen kolloidalen Systems. Die Stärke der Zeta-Potentialreduktion kann als ein Maß für die Schichtdicke der, auf der Oberfläche adsorbierten Tenside betrachtet werden. Eine eindeutige Aussage ist aber aufgrund der unterschiedlichen Aggregatgrößen der einzelnen Präparationen nicht möglich, da die Tensidkonformation nachhaltig durch den Aggregatdurchmesser mit beeinflusst wird (Müller, 1996). Blunk (1994) konnte nachweisen, daß die Schichtdicke und die Hydrophobie nur bedingt mit der Proteinadsorption korrelieren. Entscheidend ist die Oberflächendichte der PEO-Ketten in Verbindung mit der Kettenlänge. Je kleiner die Partikelgröße, desto größer ist aus energetischen Gründen die Schichtdicke der PEO-Ketten (Jeon et al., 1991).

Die Partikelformulierungen mit dem geringsten Zeta-Potential (Poloxamer 407: -8,1mV; Poloxamin 908: -4,47mV) zeigten auch im Tierversuch die längste Blutzirkulationszeit. Diese Ergebnisse stimmen mit den Untersuchungen von Wilkins u. Myers (1966) sowie Kissel u. Roser (1991) überein.

Das Zeta-Potential ist sehr schwierig mit den *in vivo*-Daten in Verbindung zu setzen, da es immer vom umgebenden Milieu abhängig ist (Müller, 1996) und soll im Rahmen der eigenen

Untersuchungen nur als ein Maß für die Lagerungsstabilität der Zubereitungen aufgefaßt werden.

Das **Proteinadsorptionsvermögen** der Nanopartikelzubereitungen wurde mit der zwei-dimensionalen Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach einer fünfminütigen Inkubationszeit in humanem Plasma und Serum untersucht.

Von entscheidender Bedeutung für die Vergleichbarkeit der PMMA-Nanopartikelzubereitung war, daß bei allen Präparationen eine einheitliche Größe im Plasma (Modalwert: 107 nm) gefunden werden konnte. Schon lange wird vermutet, daß die Plasmaproteine eine entscheidene Rolle bei der Verteilung der Partikel im Organismus spielen (Blunk et al., 1993; Blunk, 1994; Lück, 1997, Armstrong et al., 1997). Da bis jetzt keine Methoden zur Untersuchung kolloidaler Systeme im Vollblut oder besser im Versuchstier vorhanden sind, war es nötig, das Adsorptionsverhalten der Proteine auf den Partikeln sowohl im Plasma, als auch im Serum zu analysieren. Da z.B. die Faktoren der Komplementkaskade, die eine essentielle Bedeutung im Eliminationsprozeß körperfremder Materialien spielen, durch das bei der Plasmagewinnung eingesetzte Natriumzitrat inaktiviert werden, konnte die Adsorption dieser Proteine nur im Serum untersucht werden. Durch die Veränderung der Partikeloberflächeneigenschaften durch die Adsorption von Schutzkolloiden (Tenside) der Präparationen **b**, **c** und **d** konnte eine deutliche Reduktion der gesamtadsorbierten Proteinmenge beobachtet werden. Präparation **b** zeigte im Plasma und im Serum die geringste Proteinmenge auf den Partikeln. Die Präparationen A und B wurden schon nach einer sehr kurzen Verweildauer im Blut durch die Zellen des RES aufgenommen, 91-96% der applizierten Gesamtpartikelmenge waren bereits nach fünf Minuten (Versuch II) entfernt. Damit kann die Aussage von Blunk (1994), daß der Grad der Proteinadsorptionsreduktion kein Hinweis auf die Verweildauer im Blut sowie die Art der Körperverteilung ist, bestätigt werden. Sowohl die Präparation mit der höchsten (**a**) und die mit geringsten Proteingesamtmenge (**b**) zeigten ein fast identisches *in vivo*-Verhalten. Die radioaktiv markierten Präparationen C und D zirkulierten bis zu 24 Stunden in hohen Konzentrationen im Blut und die nicht markierten (**c**, **d**) zeigten Proteinadsorptionsmuster, die in ihrer Gesamtmenge zwischen **a** und **b** lagen.

Es wurden auf den vier Partikelzubereitungen fast immer die gleichen Proteine detektiert, was nach Blunk (1994) ein Hinweis darauf ist, daß die Proteine auf die Partikeloberfläche, nicht aber auf die unterschiedlichen Tenside adsorbieren.

Die in der Literatur als spezifische Opsonine definierten Proteine, wie die Komponenten des Komplementsystems und IgG konnten auf allen Partikelzubereitungen detektiert werden. Interessanterweise wurde aber auf der Präparation **a** die geringste Konzentration gefunden. Für Fibrinogen und Transferrin zeigte sich eine ähnliche Situation.

Das *in vivo*-Verhalten der Partikelpräparationen scheint somit nicht nur von der Anwesenheit einzelner Proteine, sondern vielmehr von ihrer Konformation und gegenseitigen Beeinflussung untereinander abhängig zu sein (Blunk et al., 1993; Storm et al., 1995).

Auch für die mengenmäßig stark auf den Partikeln vertretenen Apolipoproteine konnten keine Hinweise für einen Zusammenhang zwischen Art und Menge sowie Körperverteilung gefunden werden. Auch die von Lück (1997) beschriebene präventielle Adsorption von APO E auf mit Polysorbat 80 beschichteten Partikeln (PMMA, PBCA) konnte nicht bestätigt werden.

Eine mögliche Erklärung für die unterschiedlichen Adsorptionsmuster auf gleichen Partikelzubereitungen (PMMA mit Polysorbat 80) in verschiedenen Untersuchungen (Lück, 1997) könnte in der Verwendung unterschiedlicher Chargen der Tenside verschiedener Hersteller liegen. Über ähnliche Ergebnisse berichteten auch Porter et al. (1992), die das von Illum u. Davis (1987) beschriebene Knochenmark-Targeting für PS-Partikel nur mit einer von drei untersuchten Poloxamer 407-Chargen unterschiedlicher Hersteller erreichen konnte. Als Ursache für diese Differenzen wurden nach gelpermeationschromatographischen Untersuchungen Unterschiede in der Konformation und in der Oberflächendichte der verschiedenen Poloxamer-Chargen angenommen.

Als weiterer kritischer Punkt muß berücksichtigt werden, daß die Daten aus *in vitro*-Experimenten mit humanem Plasma stammen. Da es bis heute aber keine Referenzgele außer für das menschliche Plasma gibt, wurden alle Untersuchungen nur mit humanem Plasma durchgeführt, um im Anschluß eine qualitative und quantitative Aussage über die Proteinadsorption treffen zu können. In künftigen Studien sollte versucht werden, das Proteinadsorptionsvermögen von Partikeln im Vollblut oder unter *in vivo*-Bedingungen zu bestimmen, um z.B. die Wechselwirkungen der Partikel mit zellulären Blutbestandteilen mit berücksichtigen zu können. Die Ergebnisse aus diesen Experimenten könnten u. a. eine Grundaussage über die Vergleichbarkeit von *in vivo*- und *in vitro*-Proteinadsorptionsdaten geben. In der Arbeitsgruppe "Drug Targeting" des Max-Delbrück-Centrum Berlin-Buch wird momentan an einer *in vivo*-Methode gearbeitet, die es ermöglicht, ins Blutgefäßsystem applizierte Partikel zurückzugewinnen und die adsorbierten Plasmaproteine zu analysieren.

## **2. *in vivo*-Ergebnisse**

Um über die *in vivo*-Verteilung und die mögliche Anreicherung der PMMA-Zubereitungen in Tumoren eine umfassende Aussage machen zu können, kamen drei unterschiedliche **Tumormodelle** (Lokalisation, Wachstumsgeschwindigkeit, Angiogenese) zum Einsatz. Dabei wurden die eingesetzten Tumoren nach ihrer Bedeutung für den Menschen (Inzidenzrate und Therapierbarkeit) ausgewählt. Im Versuch I wurde ein i.m. transplantiertes murines Melanommodell (B16-Melanom auf B6D2F1-Mäusen) gewählt, das sich durch sein schnelles Wachstum (nach 14 d ein Tumorgewicht von 1110 mg) und seine hohe Metastasierungsneigung auszeichnet. Als weiteres Modell wurde ein humanes Mammakarzinom (MaTu) nach s.c. Transplantation auf nude-Mäusen eingesetzt. Dieser Tumor weist ein relativ langsames Wachstum (nach 21 d ein Tumorgewicht von 259 mg) und eine feste Konsistenz mit geringer, makroskopisch sichtbarer Angiogenese auf. Das dritte Tumormodell (U373-Glioblastom) mußte erst durch entsprechende Vorversuche standardisiert werden. Dabei war es zur Einbeziehung der Blut-Hirn-Schranke von ganz entscheidender Bedeutung, daß die Tumorzellen i.c. wuchsen. Jain (1997) konnte an einem humanen Glioblastom (HGL21), das sowohl s.c. als auch i.z. in immundefizienten Mäusen wuchs, nur bei der i.c.-Gruppe die Ausprägung von glioblastomtypischen Blut-Tumorschranken-Eigenschaften beobachten, während die tumorversorgenden Blutgefäße der s.c.-Gruppe eine starke Permeabilitätssteigerung zeigten. Der Sinn des neu etablierten Tumormodells war es, sich den Verhältnissen am hirntumorekranken Menschen so weit wie möglich anzunähern.

Die Ergebnisse der Körperverteilungsstudien (Versuch I, II, III) werden für die einzelnen Organe vergleichend betrachtet. Aus Gründen der Standardisierbarkeit (z.B. unterschiedlich schwere Tumore) war es nötig, die gefundenen Konzentrationen in ng PMMA pro mg Organ-gewicht anzugeben. Zusätzlich wurden die Ergebnisse als prozentualer Anteil der Gesamtdosis dargestellt (siehe Anhang).

### **PMMA-Partikelkonzentrationsverläufe im Tumor**

In den Versuchen I und II sind nur die Partikelzubereitungen C und D in der Lage, sich in signifikant höheren Konzentrationen im Tumor anzureichern. Im I. Versuch konnten dabei nach 2 Stunden Maximalwerte für C von 23,4 ng pro mg und für D von 21,4 ng pro mg Tumor (14,5% und 15,6% der Gesamtdosis) gefunden werden. Diese Konzentrationen lassen sich nur mit wenigen Angaben aus der Literatur vergleichen, da häufig nicht die

Konzentration im Tumorgewebe bestimmt wurde, sondern überwiegend nur der Effekt auf das Tumorstadium, einschließlich Überlebenszeit und der toxischen Nebenwirkungen (Brasseur et al., 1980; Morimoto et al., 1980; Couvreur et al., 1986; Sharma et al., 1996). Die von anderen Autoren erzielten maximalen Tumorkonzentrationen schwanken von 1,4% (14d-Wert) im auf nude-Mäusen transplantierten humanen Osteosarkom (Gipps et al., 1986) und 12% (1h-Wert) im B16-Melanom (Reszka et al., 1997). Eine mögliche Ursache für die geringen Tumor-konzentrationen der Präparationen A und B sind die sehr kurzen Blutzirkulationszeiten. Schon nach 5 min (Versuch II) sind 91-96% der Gesamtdosis aus dem Blutstrom durch die Zellen des RES, hauptsächlich in die Leber aufgenommen. Der Unterschied zwischen den Tumoren der Versuchsreihe I und II ist wahrscheinlich in tumorindividuellen Eigenschaften, wie z.B. der Angiogeneseintensität zu suchen. Die im Rahmen der Charakterisierung der Tumorangiogene gefundenen Ergebnisse untermauern dies. Das schnell wachsende B16-Melanom zeigt zum Zeitpunkt der Nanopartikelapplikation eine hohe VEGF- und Flk-1-Expression. Da sich die Tumorangiogenese durch eine Reihe von strukturellen und physiologischen Besonderheiten, wie starke Gefäßwandfenestration, inkomplette Basalmembran (Endrich et al., 1979) und erhöhte Endozytoseaktivität der Endothelzellen auszeichnet (Kreuter, 1994), ist es gut vorstellbar, daß die Neoangiogeneseaktivität des Tumors für die unterschiedlich hohe Nanopartikelkonzentration mit verantwortlich ist.

Aus den eigenen Untersuchungen kann kein Rückschluß auf die genaue Lokalisation der Partikel im Tumor (Zellen und/oder Gefäßsystem) gezogen werden. Basierend auf der langen Verweildauer wird eine Aufnahme der Partikel in die Tumorzellen vermutet.

Da der im Versuch III verwendete Gehirntumor nicht isoliert werden konnte, wurde versucht, die tumortragende mit der tumorfreien Großhirnhemisphäre zu vergleichen. Die gefundenen Ergebnisse zeigen eindeutig, daß keine der Präparationen in der Lage ist, die Konzentration im Tumor gegenüber dem umliegenden Gewebe zu erhöhen. Ursache eines solchen *in vivo*-Verhaltens könnte die Ausbildung einer glioblastomtypischen Blut-Hirntumor-Schranke sein, die sich nur bei intrazerebral inokulierten Gehirntumoren findet (Jain, 1997). So könnten die Ergebnisse indirekt als ein Beweis für die Modellqualität betrachtet werden.

Interessanterweise konnte in den Gehirnschnitten keine VEGF- und Flk-1-Expression gefunden werden, wohl aber eine starke VEGF-Expression in U-373 Zellen aus der Kultur. Eine Erklärungsmöglichkeit ist, daß es zum Zeitpunkt der Untersuchung zu keiner VEGF-

Expression kam. Ob es vor oder nach dem Untersuchungszeitpunkt (18 d nach Tumorzellinokkulation) zu einer solchen Wachstumsfaktorproduktion und Ausschüttung kam oder kommen würde, bleibt spekulativ. Nach der WHO-Klassifikation der malignen Gliome wird eine massive Neoangiogenese erst im Grad IV beschrieben, so daß denkbar wäre, daß der Tumor zum Zeitpunkt der Versuchsdurchführung noch kein Glioblastoma multiforme (Grad IV) war, was auch durch die fehlende Nekrose im Tumorzentrum untermauert wird. Diese fehlende Angiogeneseaktivität (nicht nachgewiesene) könnte auch erklären, warum sich die Nanopartikel nicht im Tumor verstärkt anreichern konnten.

### **PMMA-Partikelkonzentrationsverläufe in der Leber**

Die in der Leber gefundenen PMMA-Konzentrationen spiegeln die aus der Literatur bekannten Ergebnisse wieder, daß unbeschichtete partikuläre Systeme schon nach kurzer Zeit von den Zellen des RES erkannt und hauptsächlich in der Leber (70-90%) aufgenommen werden (Kreuter, 1983). Die Werte von 150-200 ng PMMA pro mg Leber entsprechen einem prozentualen Anteil von 60-75% der Gesamtkonzentration. Weitere Besonderheiten der Leber, die für eine hohe Anreicherung von körperfremden Materialien prädestiniert sind, sind 1) die Größe der Leber mit einer daraus resultierenden starken Durchblutung, 2) das Vorhandensein stark fenestrierter Kapillaren (100nm) und 3) die hohe Anzahl von Kupfferschen Sternzellen (O'Mullane et al., 1987). Die Beschichtung der Nanopartikel mit Tensiden führt zu einer Veränderung der Oberflächeneigenschaften (siehe *in vitro*-Experimente) und damit zu einer "Maskierung" der Partikel für die Zellen des RES. Die Konzentrationen der Gruppe B differieren nur geringgradig von denen der Gruppe A, sind aber in allen drei Versuchen deutlich sichtbar erniedrigt, wenn auch nicht immer, bedingt durch die geringe Tieranzahl, statistisch signifikant. Erst der Einsatz der Tenside Poloxamer 407 und Poloxamin 908 vermag die Aufnahme in die Leber effektiv zu verhindern. Dabei waren die Unterschiede zwischen den Gruppen C und D in allen Versuchen minimal. Die Ergebnisse stimmen, bis auf Gruppe C, mit den Untersuchungen von Tröster (1990) überein. Tröster (1990) fand für Poloxamer 407 überzogene PMMA-Partikel Leberkonzentrationen von bis zu 56% (7d-Wert). Eine mögliche Erklärung könnte die Verwendung einer anderen Versuchstierart (Ratte) und der Einsatz anderer Tensidchargen und Partikelpräparationsabläufe sein. Dunn et al. (1997) fanden für PLGA und PS-Partikel, die mit Poloxamer 407 und Poloxamin 908 beschichtet wurden, im *in vivo*-Verhalten (Ratten) nur minimale Differenzen zwischen den beiden Tensidgruppen.

### **PMMA-Partikelkonzentrationsverläufe in der Milz**

Die in der Milz gefundene Rangfolge unter den Präparationen zeigt ein umgekehrtes Bild im Vergleich zur Leber. Während sich die Konzentrationsverläufe der Gruppen A und B fast über den gesamten Untersuchungszeitraum konstant verhalten, kommt es bei den Gruppen C und D zu einem sprunghaften Anstieg der Milzwerte innerhalb der ersten 4-8 Stunden, die sich dann, mit einer Ausnahme (I.Versuch, Gruppe C, 72 u. 168 Stunden), plateauartig über die weiteren Meßzeitpunkte fortsetzen. Der gravierende Unterschied zwischen den Gruppen A u. B und C u. D in der Milzanreicherung könnte mit Hilfe der langen Blutzirkulationszeit von C u. D erklärt werden. Die Leber als Anreicherungsorgan Nummer 1 für die Zubereitungen A und B zeigt einen fast horizontalen Konzentrationsverlauf, was durch die massive Aufnahme in den ersten Minuten (siehe Blut, 5- u. 15-Minuten-Werte im Versuch II) bedingt ist. Da die Hauptmenge der applizierten Dosis also schon aus dem Blut eliminiert wurde, kann es zu keinem starken Anstieg in der Milz für A und B kommen. Besonders in Versuch II und III wird deutlich, daß die im Blut zirkulierenden Partikelzubereitungen C und D hauptsächlich durch die Milz aufgenommen werden, was in einem kontinuierlichen Anstieg der Milzwerte (aber auch der Leberwerte) sichtbar wird.

### **PMMA-Partikelkonzentrationsverläufe in der Niere**

Die Konzentrationen in der Niere zeigen für alle Zubereitungen einen synchronen Verlauf und unterscheiden sich nur durch die Höhe der Werte. Interessanterweise zeigt die Gruppe B einen Verlauf, der sich nicht gravierend von C und D unterscheidet, was auch durch die statistischen Berechnungen deutlich wird. In allen Versuchen liegen die Werte von A signifikant unter denen der anderen Zubereitungen. Innerhalb der Gruppen B, C und D können solche eindeutigen Ergebnisse über den gesamten Untersuchungszeitraum nicht gefunden werden. Die Nierenwerte sind besonders zu den späteren Meßzeitpunkten nur sehr gering, da die Nanopartikel durch die Niere nur mit einer Rate von ungefähr 1% (Kreuter, 1983c) ausgeschieden werden. Auf Grund ihrer nur sehr langsamen Biodegradierbarkeit verbleiben die Partikel bis zum Abbau hauptsächlich in den Organen des RES.

### **PMMA-Partikelkonzentrationsverläufe in der Lunge**

Die Lunge ist als ein Indikatororgan für die Teilchengröße zu betrachten, da es hier aufgrund des sehr feinen Kapillarnetzes zum Herausfiltern großer Partikel und zu Embolien kommen kann, wenn die applizierten Partikel die kritische Größe der Gefäße überschreiten. So sind die

in Versuch III gefundenen 2-Stunden-Werte der Gruppe A von 44,7 ng PMMA pro mg Lungengewebe auf eine nicht ausreichende Beschallung oder eine zu schnelle Applikationsgeschwindigkeit (Leu et al., 1984) zurückzuführen.

Die in den Untersuchungen von Tröster (1990) gefundenen Lungenkonzentrationen (30-Minuten-Werte) für mit Polysorbat 80 (43,2%), Poloxamer 407 (42,2%) und Poloxamin 908 (12,6%) beschichteten PMMA-Partikel weichen gravierend von den eigenen Untersuchungen ab und sind wahrscheinlich auf die Bildung großer Aggregate zurückzuführen. Die in den eigenen Untersuchungen gefundenen geringen Lungenkonzentrationen (1-4%) zeigen, daß eine Beschallzeit von 20 min in einem Ultraschallbad (35 kHz) und eine langsame Injektionsgeschwindigkeit (1 ml/min) (Leu et al., 1984) zu keiner kritischen Aggregatbildung führt und eine entscheidende Voraussetzung für eine störungsfreie Partikelzirkulation (keine Lungenembolie) ist.

#### **PMMA-Partikelkonzentrationsverläufe im Herz**

Die Präparation B zeigt überraschenderweise eine besondere Affinität zum Herz. In allen Versuchen (I, II, III) liegen die Konzentrationen mit denen der Gruppen C und D gleich auf oder, wie besonders im I. Versuch deutlich, über diesen. Damit ist das Herz das einzige Organ, in dem es zu einer Anreicherung der mit Polysorbat 80 beschichteten PMMA-Partikel kommt, die auch über einen längeren Zeitraum (72- u. 168-Stunden-Werte) bestehen bleibt. Auch Tröster (1990) fand in ihren Untersuchungen, daß Polysorbat 80 zu den höchsten Herzkonzentrationen führte. Wahrscheinlich kommt es durch dieses Tensid zum Anhaften und zur Aufnahme der Nanopartikelzubereitung in die Herzendothelzellen, vielleicht sogar in die Kardiomyozyten. Welche Mechanismen für diese selektive Anreicherung verantwortlich sind, ist nicht bekannt. Der im Versuch I im Vergleich zu II und III etwas abweichende Kurvenverlauf ist eventuell auf die Verwendung eines anderen Mausstammes (B6D2F1-Mäuse im Vergleich zu nude-Mäusen) zurückzuführen.

#### **PMMA-Partikelkonzentrationsverläufe im Gehirn**

Die von anderen Autoren (Alyautdin et al., 1995; Kreuter et al., 1995; Schröder u. Sabel, 1995) beschriebenen Ergebnisse einer maximalen Anreicherung der mit Polysorbat 80 überzogenen Partikel im Gehirn können nicht bestätigt werden. Dabei muß berücksichtigt werden, daß einmal andere Partikel (PBCA) verwendet wurden und zum anderen nicht die eigentliche Konzentration der Partikel im Gehirn bestimmt wurde, sondern der Effekt von an

mit Polysorbat 80 beschichteten Partikeln gebundenen Pharmaka (siehe 2.3.4.2). In den eigenen Untersuchungen unterscheidet sich die Gruppe B nicht von der Kontrollgruppe A. Die Gruppen C u. D zeigten die höchsten Werte mit einem Maximum (Versuch II: 2,8-3 ng PMMA pro mg Gehirn) bei 1 Stunde. Die gefundenen geringen Konzentrationen für die mit Polysorbat 80 beschichteten Partikeln im Gehirn im Vergleich zu anderen Autoren (Tröster, 1990; Borchard, 1993) können nur bedingt miteinander verglichen werden, da diese Partikel einmal vor ihrem *in vivo*-Einsatz anders behandelt wurden (5 min Ultraschallbehandlung, andere Tensidchargen) und die bestimmten physikochemischen Eigenschaften (Partikelgrößen: effektiver Durchmesser 8,825 µm) und Körperverteilungsdaten (Lungenkonzentrationen von bis zu 43,2%) nicht mit denen der eigenen Experimente verglichen werden können.

#### **PMMA-Partikelkonzentrationsverläufe im Os femoris**

Auffällig an den Knochenmarkwerten ist, daß sich keine der Zubereitungen von den anderen wesentlich unterscheidet. Lediglich im Versuch III liegen die Werte der Gruppe C im gesamten Untersuchungszeitraum über denen der anderen Gruppen. Betrachtet man alle Ergebnisse zusammen, dann kommt man zu der Beobachtung, daß es nach einem initialen Anstieg, der wahrscheinlich vor dem ersten Meßzeitpunkt liegt, zu einem plateauartigen Verlauf über die Zeit kommt. Die gefundenen Ergebnisse stimmen mit denen von Tröster (1990) insoweit überein, daß sich die untersuchten Tensid-Nanopartikelpräparationen nicht oder nur geringfügig unterscheiden.

#### **PMMA-Partikelkonzentrationsverläufe im Blut**

Die Partikel der Gruppen C u. D sind im Vergleich zu A u. B in der Lage, relativ lange (bis zum 24h-Wert) in hohen Konzentrationen im Blut zu zirkulieren. Die 5-Minuten-Werte von A/B liegen etwa auf gleicher Höhe, wie die 24-Stunden-Werte von C u. D. Interessanterweise waren die Partikel der Präparation B trotz der geringsten Proteinadsorption (siehe 4.1.4) nicht in der Lage, über einen längeren Zeitraum im Blut zu zirkulieren; schon nach 5 Minuten waren 91% der applizierten Gesamtmenge durch die phagozytierenden Zellen des RES (hauptsächlich Kupffersche Sternzellen in der Leber) eliminiert. Damit kann die Aussage von Blunk (1994) bestätigt werden, daß nicht die Proteingesamtmenge auf der Partikeloberfläche für die Blutzirkulationszeit und die Körperverteilung verantwortlich ist, sondern wahrscheinlich vielmehr die Konformation der Proteine und die Wechselwirkungen der

adsorbierten Proteine untereinander. Weiterhin konnten Blunk (1994) sowie Allemann et al. (1997) in ihren Untersuchungen von einer Dynamik der Proteine auf den Partikeln über die Zeit berichten. Ihre Studien zeigen, daß es Proteine gibt, die sehr schnell und in großer Menge auf den Partikeln adsorbieren und andere, die anfänglich nur in geringen Mengen mit der Partikeloberfläche in Kontakt treten, aber durch Verdrängungsmechanismen von Nachbarproteinen ihre Konzentrationen über die Zeit ausbauen (z.B. Komplementfaktor C3, Apolipoprotein E). Diese Proteindynamik auf den Partikeln könnte eine Erklärungshinweis für die zum Teil sehr langen Zirkulationszeiten einzelner Präparationen sein. Tröster (1990) fand für mit Poloxamer 407 und Poloxamin 908 überzogenen PMMA-Nanopartikeln nur geringe Blutkonzentrationwerte (30-Minuten-Werte: 1,8% und 28%; 2-Stunden-Werte: 0,14% und 6,38%) im Vergleich zu den eigenen Untersuchungen (8-Stunden-Werte: bis zu 20%). Auffällig in den Untersuchungen der Autorin sind im Gegensatz dazu die sehr hohen Lungenwerte von bis zu 42% für Poloxamer 407/PMMA. Dunn et al. (1997) konnten dagegen mit denselben Tensiden auf PS- und PLGA-Nanopartikeln hohe und lange Blutzirkulationszeiten (3-Stunden-Werte: 39% und 28% im Rattenmodell) erreichen. Im Kaninchenmodell dagegen war nur Poloxamer 407/PLCA in der Lage, lange im Blut zu zirkulieren.

Die Partikelkonzentrationen in Leber, Milz, Knochenmark und Tumor bleiben über einen langen Zeitraum konstant oder verändern sich nur langsam. Das kann als eine Indiz für eine Aufnahme der Partikel in die Zellen (je nach Organ, hauptsächlich Makrophagen oder Tumorzellen) des jeweiligen Gewebes angesehen werden. Im Gegensatz dazu scheint es in Organen, wie Niere, Gehirn und Herz (mit Ausnahme von Gruppe B) nur zu einer zeitweisen Adhäsion der Partikel an den Gefäßendothelien der entsprechenden Organe zu kommen, da die zum Teil hohen Anfangskonzentrationen schnell wieder absinken. Die nicht aufgenommenen Partikel werden durch den Blutstrom vom Ort ihrer Adhäsion wieder entfernt. Untermauert wird dies durch die besonderen Gefäßendothelstrukturen in Leber, Milz, Knochenmark (fenestrierter diskontinuierlicher Gefäßtyp) (Thews et al., 1989) und Tumor (Besonderheiten der Tumorangiose, siehe 2.1.4.1). In diesen Organen bestehen für die Partikel ideale Bedingungen, um das Gefäßsystem zu verlassen. Der sich in den anderen Organen befindende kontinuierliche Gefäßtyp bietet den Partikeln im intakten Zustand kaum die Möglichkeit, aus dem Blutgefäßsystem auszutreten.

Die eigenen Ergebnisse lassen sich nur sehr begrenzt vergleichen mit den Untersuchungen anderer Autoren aufgrund der Unterschiede in den verwendeten:

- Partikelarten (PBCA, PLGA; PS u.s.w.),
- Versuchstierarten (Ratten, Mäuse, Kaninchen),
- Partikelchargen unterschiedlicher Hersteller und
- Zubereitungsbedingungen.

Selbst beim Einsatz derselben Partikel (PMMA) (Tröster, 1990), die auf dieselbe Art und Weise hergestellt wurden ( $\gamma$ -Bestrahlung) kommt es durch Unterschiede in der Partikelvorbereitung (Ultraschallbehandlung) zu ganz verschiedenen Körperverteilungen.

Die pharmakokinetischen Berechnungen aus den Blutwerten wurden durchgeführt, um das Verhalten der Partikel im Körperkreislauf besser beschreiben zu können. Bedingt durch die geringen Erkenntnisse über die Verteilung und den Abbau nanopartikulärer Systeme wurden die pharmakokinetischen Parameter mit Hilfe des sich am besten an die Meßwerte anpassenden Modells (Drei-Kompartimentmodell) berechnet. Nachteilig wirkt sich die Verwendung des Kompartimentmodell auf die Bestimmung der Halbwertszeit aus, da diese von der entsprechenden Software für jedes Kompartiment extra berechnet wird. So konnte keine Halbwertszeit für den gesamten Konzentrationsverlauf der PMMA-Partikel im Blut angegeben werden. Da die Auflistung der einzelnen Halbwertszeiten je Kompartiment und Präparation nur zu einem verwirrenden Bild führen würde, wurde auf ihre Darstellung im Rahmen dieser Arbeit verzichtet.

Die hohen AUC-Werte der Gruppen A u. B des II. und III. Versuchs resultieren aus den relativ konstant hohen Werten der letzten Zeitmeßpunkte. Durch die Verwendung des Kompartimentmodells berechnet das Programm die AUC bis zum theoretischen Nullpunkt der Kurve. Lediglich für C u. D konnten vergleichbare Ergebnisse (Versuch I, II, III) erzielt werden.

Um die Ergebnisse der Untersuchungen an Nanopartikeln pharmakokinetisch exakt zu berechnen, wäre es nötig, ein speziell den Partikeln angepaßtes Computerprogramm zu entwickeln.

Um eine Aussage über die **Verträglichkeit** der Partikelzubereitungen zu machen, wurden die Körpergewichte der Tiere zu Beginn und zum Ende der Versuche aufgezeichnet und im Anschluß miteinander verglichen. Zu keinem Zeitpunkt (maximale Gewichtsreduktion in

allen Versuchen zum 8-Stunden-Meßzeitpunkt) kam es zu einer Abnahme von über 20%, welches nach den Empfehlungen der UKCCCR (1998) als ein deutliches Zeichen einer pharmakonbedingten Toxizität zu werten ist. Die geringen Unterschiede (siehe prozentuale Gewichtsabnahme am 8h-Meßwert) zwischen den Tieren des I. Versuchs und denen der Versuche II und III könnten auf eine größere Streßanfälligkeit der immundefizienten Mäuse zurückzuführen sein, zumal sich die B6D2F1-Mäuse auch schneller nach der Partikelapplikation erholten (72 Stunden nach Versuchsbeginn eine statistisch signifikante Gewichtszunahme).

Die Ergebnisse der Untersuchungen über den Einfluß veränderter Oberflächeneigenschaften von PMMA-Nanopartikeln auf die Anreicherung in Tumoren zeigen erhebliche Unterschiede zwischen den einzelnen Partikelpräparationen und den verschiedenen Tumorarten. Die im Vorfeld der *in vivo*-Experimente durchgeführten Untersuchungen dienten der physikochemischen Charakterisierung der Zubereitungen unter besonderer Berücksichtigung des späteren, intravenösen Einsatzes der Präparationen. Die i.v. Injektion bietet eine Reihe von Vorteilen gegenüber anderen Applikationswegen (z.B.: s.c.), wie z.B. die Zirkulation der kolloidalen Systeme im Gesamtorganismus und damit der Möglichkeit nicht sichtbare, verborgene Mikrometastasen mitzuthereapieren. Das Ziel in der Drug Targeting-Forschung ist es, Arzneistoffe, Gene und andere Substanzen mit Hilfe eines geeigneten nebenwirkungsfreien Trägersystems an einen gewünschten Ort (z.B. Tumor) zu transportieren, um dort eine maximale Wirkeffizienz zu erzielen und um den Gesamtorganismus so wenig als möglich zu schädigen.

Die in den Modelluntersuchungen gefundenen Ergebnisse zeigen, daß nur bestimmte tensidbeschichtete Partikel in der Lage sind, über einen längeren Zeitraum im Körperkreislauf zu zirkulieren und damit eine wichtige Voraussetzung für ihre Anreicherung im tumorösen Gewebe erfüllen. Erst durch den Einsatz von Poloxamer 407 und Poloxamin 908 kam es zu einer spezifischen Veränderung der Partikeloberflächen, die eine hohe Anreicherung (14,5-15,6% der Gesamtdosis) in einem Tumormodell (B16-Melanom auf BDF1-Mäusen) ergaben. Die mit den beiden Tensiden der Poloxamer- und Poloxaminserie erzielten ersten Ergebnisse bilden eine gute Grundlage, um die Verwendung von oberflächenmodifizierten Partikeln in der Onkologie weiter zu untersuchen. Die charakteristischen Eigenschaften der Tumoren haben einen entscheidenden Einfluß auf die Absoluthöhe der Partikelkonzentration im entarteten Gewebe. Diese tumorspezifischen Besonderheiten müssen weiter untersucht

werden, um den Aufnahmemechanismus der Partikel ins tumoröse Gewebe und damit den Schlüssel für effektivere Therapien auf der Basis kolloidaler Systeme zu erforschen. In den *in vivo*-Studien ist deutlich geworden, daß die Verlängerung der Blutzirkulationszeit ein entscheidender Faktor für die Anreicherung der Partikel im Tumor ist. Es kann vermutet werden, daß eine weitere Verlängerung der Verweildauer der Nanopartikel im Blut zu einer Steigerung der Partikelkonzentration im Tumor führt.

Vor einer klinischen Übertragbarkeit der gewonnenen Ergebnisse sind folgende weitere Untersuchungen nötig:

1. Aufklärung des Aufnahmemechanismus der tensidbeschichteten Nanopartikel ins Gewebe,
2. Definition der Partikelkonzentrationen in anderen Tumorarten,
3. Verlängerung der Blutzirkulationszeit,
4. Überprüfung der Übertragbarkeit auf andere Tiermodelle,
5. Beladungskapazität der Partikel für Zytostatika und Therapiegene und
6. Aufklärung des Partikelabbauweges.
7. Es bleibt abzuwarten, ob sich die langsame Abbaugeschwindigkeit und die hohen Konzentrationen in Leber und Milz nicht negativ auf den Gesamtorganismus auswirken.